

Utilisation de la spectrométrie de masse isotopique en physiologie végétale

Jaleh GHASHGHAIE¹, Guillaume TCHERKEZ¹, Gabriel CORNIC¹
& Eliane DELEENS²

¹ Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale (Bât. 362)
Université de Paris-XI, 91405-Orsay

Email : jaleh.ghashghaie@eco.u-psud.fr

² Laboratoire de Métabolisme et Structure des Plantes (IBP)
Université de Paris-XI, 91405-Orsay

Introduction

Les éléments principaux des composés biologiques (C, N, O, H, ...), comme tous les autres éléments, existent sous plusieurs **formes isotopiques stables** qui possèdent un même nombre de protons et diffèrent par le nombre de neutrons. Les isotopes **légers** (contenant le moins de neutrons) sont **abondants** tandis que les isotopes **lourds** sont souvent présents sous formes de **traces**. Ils existent cependant en proportions telles qu'il est possible d'en mesurer la quantité de manière précise. C'est le cas des éléments comme le carbone (¹³C : 1,1% du ¹²C+¹³C), l'azote (¹⁵N : 0,36 % du ¹⁴N+¹⁵N), l'oxygène (¹⁸O : 0,2 % et ¹⁷O : 0,04 % du ¹⁶O+¹⁷O+¹⁸O) et l'hydrogène (D : 0,015 % du H+D). Nous illustrerons le présent exposé en utilisant principalement les isotopes du carbone.

L'abondance naturelle des isotopes (par exemple celle du carbone) varie entre les différents compartiments organiques et inorganiques de la biosphère (air, matière organique végétale ou animale), les types de plantes (C₃ et C₄), les niveaux des chaînes trophiques, les individus, les organes, les fractions métaboliques et même, pour une molécule donnée, entre les différents atomes qui la constituent. Ces différences sont très petites (de l'ordre de quelque ‰) mais mesurables à l'aide d'un Spectromètre de Masse Isotopique (SMI) (voir plus bas).

Ces variations naturelles sont dues à un phénomène dit de **fractionnement** ou de **discrimination** isotopique qui se produit lors d'une transformation, entre les molécules de différentes masses constituées d'isotopes différents (par exemple entre ¹³CO₂ et ¹²CO₂). La **différence de masse isotopique** modifie les **propriétés physiques** (ex. coefficient de diffusion) et **chimiques** (ex. constantes de vitesse de réactions enzymatiques, constantes d'équilibre) de ces molécules. Par conséquent, lors d'une réaction

enzymatique par exemple, le rapport isotopique du produit formé est différent de celui du substrat de départ. Le fractionnement ou la discrimination isotopique se mesure par la variation de la composition isotopique d'un composé avant et après sa transformation. En fait, c'est la *rareté* des isotopes *lourds* qui permet de déterminer avec précision le fractionnement isotopique. Ceci est également vrai lors des marquages isotopiques au niveau naturel (marquage de l'ordre de ± quelques ‰ avec l'isotope lourd). Par contre, il est difficile de mesurer avec précision le fractionnement isotopique lors d'un fort marquage : la discrimination vis-à-vis de l'isotope lourd étant de l'ordre de quelques ‰, le fractionnement isotopique, lors d'un marquage de quelques % avec l'isotope lourd, serait noyé dans le *bruit de fond*.

Pour certains processus primordiaux en physiologie végétale (par exemple : photosynthèse, transpiration, assimilation de l'azote...), les modèles de fractionnement isotopique ont été établis, ce qui permet d'interpréter les variations de l'abondance isotopique naturelle en fonction du fonctionnement physiologique des plantes.

Quelques définitions

Rapport isotopique. L'abondance naturelle des isotopes stables du carbone se caractérise par le rapport isotopique (*R*). Ce rapport pour les isotopes de carbone, variable d'un composé à l'autre, est défini par :

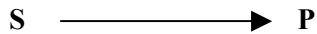
$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$$

Effet isotopique. L'effet isotopique α se produit lors de la transformation d'un substrat (**S**) en un produit (**P**) et se définit comme le rapport entre le *R* de la **source (substrat)** et celui du **produit** :

$$\alpha = \frac{R_{\text{source}}}{R_{\text{produit}}} \quad (E1)$$

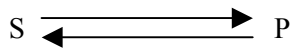
On distingue les effets isotopiques dits **cinétiques** des effets dits **thermodynamiques** :

• **Les effets isotopiques cinétiques** traduisent les vitesses de réaction différentes des formes isotopiques liées à leur différence de masse. Lors de la transformation de **S** en **P**,



par exemple lors de la création d'une liaison covalente C-C, si $\alpha_{cin} > 1$ car l'isotope lourd (^{13}C) a tendance à réagir plus lentement que l'isotope léger (^{12}C), alors le produit **P** sera plus léger (plus pauvre en isotope lourd) que le substrat **S**.

• **Les effets isotopiques thermodynamiques** se produisent lors des processus qui sont à l'équilibre. Ils traduisent les différences de constantes d'équilibre des deux formes isotopiques ^{12}C et ^{13}C . Lors de l'équilibre entre **S** et **P**,



généralement l'isotope lourd se concentre dans l'état le plus « stable », *i.e.* celui où il y a le plus de liaisons (dans la molécule la plus complexe). Si $\alpha_{therm} < 1$, le produit **P** sera plus lourd (plus riche en isotope lourd) que le substrat **S**. C'est le cas de l'équilibre entre le CO_2 et l'ion bicarbonate (HCO_3^-) où le nombre de liaisons au niveau du carbone est plus important pour le HCO_3^- : le ^{13}C se concentre dans le HCO_3^- et $\alpha_{therm} = 0,9910$. Cette réaction d'équilibre (hydratation du CO_2) est accélérée en présence de l'enzyme anhydrase carbonique. Si $\alpha_{therm} > 1$, le produit sera plus léger que le substrat. C'est le cas de la dissolution du CO_2 dans l'eau ($\alpha_{therm} = 1,0011$).

Discrimination isotopique (Δ). Pour une question de pratique, on utilise le « fractionnement » ou la « discrimination », Δ , au lieu de « l'effet isotopique » :

$$\Delta = \alpha - 1 \quad (E2)$$

D'après l'équation (E2), si $\alpha < 1$, alors $\Delta < 0$ (négative), et si $\alpha > 1$, alors $\Delta > 0$ (positive).

Exemples :

1. Lors de la transformation de CO_2 en HCO_3^- , $\alpha = 0,991$, la discrimination est :

$$\Delta = 0,991 - 1 = -0,009 = -9 \cdot 10^{-3} = -9 \text{ ‰}$$

Cela veut dire que lors de l'hydratation du CO_2 , le produit de la transformation (HCO_3^-) est plus riche en ^{13}C comparé au substrat (CO_2) de l'ordre de 9 ‰. Par contre, lors de la dissolution,

le CO_2 dissous est appauvri en ^{13}C de l'ordre de 1,1 ‰ comparé au CO_2 gazeux.

2. L'effet isotopique lors de la carboxylation par la Rubisco mesuré *in vitro* est $\alpha = 1,0309$, la discrimination est :

$$\Delta = (1,0309 - 1) = 0,0309 = 30,9 \cdot 10^{-3} = 30,9 \text{ ‰}$$

Cela veut dire que si la quantité de substrat fourni à la Rubisco n'est pas limitante, les produits photosynthétiques seront appauvris en ^{13}C par rapport au substrat de l'ordre de 30,9 ‰. Ceci est vrai lors des mesures *in vitro* (si assez de substrat est fourni) mais pas lors de mesures *in vivo* où la fourniture de CO_2 est limitée par l'ouverture stomatique et sa diffusion vers les chloroplastes.

Etape limitante. Lorsqu'un processus se déroule en plusieurs étapes successives (actes élémentaires) ayant chacune un fractionnement isotopique différent, le fractionnement global du processus a généralement la signature isotopique de l'étape limitante. Par exemple, lors de l'assimilation photosynthétique de CO_2 chez les plantes en C_3 , la diffusion du CO_2 de l'air ambiant vers l'intérieur de la feuille à travers l'ouverture stomatique et la carboxylation par la Rubisco sont deux étapes principales qui discriminent (4,4 ‰ et 30 ‰ respectivement) contre l'isotope lourd (^{13}C) favorisant l'assimilation de l'isotope léger (^{12}C). Si les stomates sont ouverts, la discrimination globale est proche de l'étape de carboxylation, par contre si les stomates se ferment (par exemple lors d'une sécheresse), la discrimination globale diminue se rapprochant de plus en plus de celle de la diffusion (voir plus loin).

De la même manière lors des réactions enzymatiques qui se déroulent en plusieurs actes élémentaires, si l'étape limitante est l'activation de l'enzyme ou du substrat ou la formation du complexe enzyme-substrat qui est l'étape thermodynamique (réversible) et en général peu fractionnante, le fractionnement global sera faible. C'est par exemple le cas de la carboxylation par la PEPC (phosphoénol-pyruvate carboxylase). Par contre, si l'étape limitante est l'étape finale, irréversible et fortement fractionnante, le fractionnement global sera élevé. C'est le cas du fractionnement lors de la carboxylation par la Rubisco.

Composition isotopique. Afin d'homogénéiser les mesures effectuées dans différents laboratoires, la composition isotopique est déterminée par rapport

à un standard international. Ainsi, la composition isotopique en ^{13}C d'un échantillon est défini par :

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \quad (E3)$$

Le standard international pour le carbone est un fossile calcaire, un rostre de Bélemnite, issue de la formation rocheuse Pee Dee en Caroline du sud, il est appelé **PDB**. Ce fossile est riche en ^{13}C et son rapport isotopique, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, est de 0,0112372. En réalité il n'existe plus de standard PDB mais d'au-

tres standards ont été calibrés par rapport au PDB, ce qui permet de continuer à exprimer le $\delta^{13}\text{C}$ d'un produit par rapport au PDB. Le standard international pour l'azote est le N_2 atmosphérique et pour l'oxygène et l'hydrogène, c'est l'eau océanique.

Les échantillons organiques et inorganiques étant pauvres en ^{13}C par rapport au standard PDB, $\delta^{13}\text{C} < 0$ (négatif). Ainsi, le $\delta^{13}\text{C}$ d'un composé est d'autant plus négatif que ce produit est pauvre en ^{13}C comparativement au PDB

Exemples calculés à partir de l'équation (E3) :

$$R^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ du } \text{CO}_2 \text{ atmosphérique} = 0,0111473$$

$$R^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ des plantes } \text{C}_3 \text{ en moyenne} = 0,0109338$$

$$R^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ des plantes } \text{C}_4 \text{ en moyenne} = 0,0111136$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2 \text{ air}} = -8 \text{ ‰}$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{plante } \text{C}_3} = -27 \text{ ‰}$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{plante } \text{C}_4} = -11 \text{ ‰}$$

Discrimination isotopique. En combinant les équations (E1), (E2) et (E3) on obtient :

$$\Delta = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{source}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{produit}}}{1 + \delta^{13}\text{C}_{\text{produit}}} \quad (E4)$$

or $\delta^{13}\text{C}_{\text{produit}}$ est négligeable par rapport à l'unité, nous pouvons donc écrire l'approximation :

$$\Delta \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{source}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{produit}} \quad (E5)$$

Exemple :

$$\Delta \text{ plantes } \text{C}_3 \text{ (‰)} \cong \delta^{13}\text{C} \text{ (air)} - \delta^{13}\text{C} \text{ (matière organique des plantes en } \text{C}_3)$$

$$\Delta \text{ plantes } \text{C}_3 \text{ (‰)} \cong (-8 \text{ ‰}) - (-27 \text{ ‰}) \cong 19 \text{ ‰}$$

Méthodes de préparation et d'analyse des échantillons

Principe de mesure du Spectromètre de Masse Isotopique (SMI). Le spectromètre de masse isotopique mesure le rapport isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) du gaz pur (CO_2 , N_2 , O_2) et le compare à celui d'un gaz de référence (étalonné par rapport au standard international).

Le gaz pur (gaz échantillon ou gaz de référence) est introduit dans la source du SMI où il est bombardé par les électrons. Le gaz ainsi ionisé est chargé positivement. Il est accéléré et projeté sous forme d'un faisceau très fin dans un champ magnétique et les ions sont déviés sur les trajectoires circulaires en fonction de leur masse.

Les ions ainsi séparés arrivent dans 3 collecteurs réglés pour collecter les masses 44, 45 et 46 pour le CO_2 ou les masses 28, 29 et 30 pour le N_2 et masses 32, 33 et 34 pour le O_2 . Un amplificateur relié aux collecteurs permet d'amplifier les signaux électriques qui dépendent de la quantité d'ions collectés. Ces signaux sont transmis à un ordinateur où ces données sont analysées et les rapports de masses isotopiques (45/44 et 46/44 pour le CO_2 , 29/28 et 30/28 pour N_2 , 33/32 et 34/32 pour O_2) sont déterminés et comparés à ceux du gaz de référence (Figure 1). La précision de mesure est de 0,2 %.

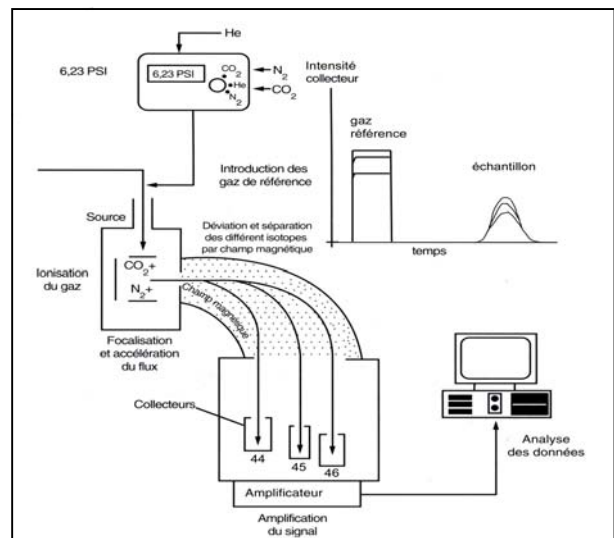


Figure 1. Spectromètre de Masse Isotopique. d'après Deléens et al., 1997.

Plusieurs systèmes couplés au SMI permettent l'analyse isotopique des échantillons solides,

liquides et gazeux avec ou sans purifications préalables. Ils sont décrits ci-dessous.

Analyseur élémentaire (analyse de CO₂ et N₂ de la matière organique). Le rapport isotopique (¹³C/¹²C ou ¹⁵N/¹⁴N) d'un échantillon de matière organique est mesuré sur le CO₂ (ou N₂) moléculaire qui rassemble sous la forme gazeuse la totalité du carbone (ou de l'azote) de l'échantillon soumis à l'analyse. Cette transformation solide-gaz est effectuée par un analyseur élémentaire qui permet la combustion de l'échantillon solide en présence de l'oxygène dans une atmosphère d'hélium (pour plus de détails, voir Deléens *et al.* 1997). Les gaz issus de cette combustion sont séparés dans une colonne de chromatographie de gaz intégrée dans l'analyseur élémentaire et le pic d'intérêt passe ensuite, poussé par le **flux continu d'hélium**, dans le spectromètre de masse isotopique (Figure 2). L'analyse isotopique du carbone se fait sur 1 mg de matière organique (3 mg pour l'azote) sous forme d'une poudre séchée. Un carrousel permet le passage automatique de 50 échantillons.

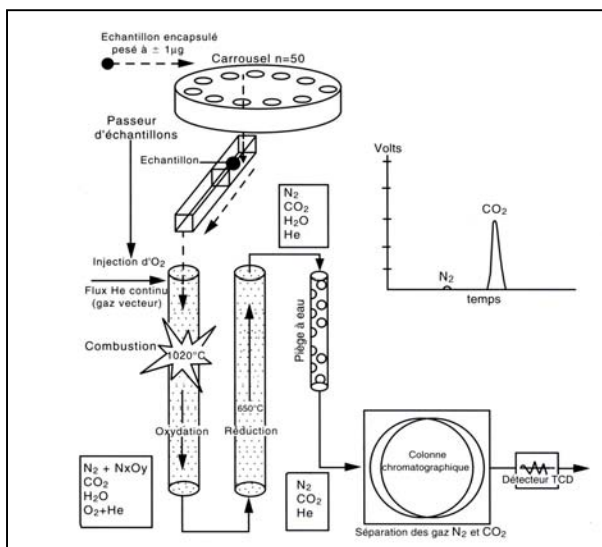


Figure 2. Analyseur élémentaire. d'après Deléens *et al.*, 1997.

Remarque : En ce qui concerne les échantillons liquides (extraits liquides), les métabolites d'intérêt sont purifiés à l'aide de la HPLC, lyophilisés et analysés ensuite comme la matière organique.

Système Dual-Inlet (analyse de CO₂ pur). Les échantillons de gaz, prélevés dans les systèmes de mesure d'échanges gazeux lors de la photosynthèse ou de la respiration sont purifiés au préalable sur une *ligne* comprenant une pompe à vide et des pièges successifs pour la vapeur d'eau et le CO₂. Le CO₂ ainsi purifié est récupéré dans une ampoule et introduit ensuite dans la *source* du SMI et

analysé en alternance avec le CO₂ pur d'une bouteille de référence. Ce système de Dual-Inlet permet un passage automatique dans le SMI de 10 ampoules d'échantillons de CO₂ pur.

Triple piège (analyse de CO₂ non purifié). Les échantillons de gaz non purifiés peuvent être introduits dans le SMI mais pas directement dans la source. Ces gaz doivent d'abord être dirigés vers un système de *triple piège* pour purifier le CO₂ avant de l'introduire dans la source. Le *triple-piège* est en réalité une *ligne* de purification *miniaturisée* incorporée dans le SMI. Un échantillon de 250 mL avec 350 ppm CO₂ est suffisant pour cette mesure.

Système de boucle (analyse de CO₂ ou de O₂ en-ligne). Une boucle (le volume de la boucle est de l'ordre de 30 mL) installée avant la colonne de chromatographie de gaz de l'analyseur élémentaire et couplée avec le système d'échanges gazeux (ouvert ou fermé) permet l'analyse dite *en-ligne* (i) de la discrimination isotopique du carbone lors de la photosynthèse ou (ii) de la signature isotopique du CO₂ respiratoire sur les feuilles intactes. L'échantillon d'air piégé dans ce système de boucle passe ensuite dans la chromatographie de gaz de l'analyseur élémentaire poussé par le flux continu d'hélium. Le pic de CO₂ est ainsi séparé et dirigé ensuite vers la source du SMI. Un système de couplage similaire avec l'électrode à oxygène (boucle de 100 µl) permet de mesurer la discrimination isotopique *en-ligne* de l'oxygène (¹⁸O/¹⁶O) lors de la respiration par la voie alternative oxydase.

GCIRMS (analyse de CO₂ ou N₂ des échantillons liquides). Il s'agit d'un SMI relié à un système de chromatographie de gaz. Une petite quantité (quelques µL) d'échantillon liquide (extrait de plante par exemple) est injectée directement dans le GCIRMS. Cet appareil permet la vaporisation de l'échantillon liquide qui est ensuite dirigé vers la colonne de chromatographie de gaz pour séparation des pics de différents métabolites (sucres, acides organiques, acides aminés, les composés aromatiques). Le pic de métabolite d'intérêt est ensuite dirigé vers le four et les gaz issus de la combustion passent dans le spectromètre de masse isotopique réglé pour l'analyse isotopique de l'azote ou de CO₂. Cette combinaison de la spectrométrie de masse isotopique en flux continu (hélium) avec la chromatographie phase gazeuse permet d'éviter les techniques préparatives (ex. HPLC).

Quelques exemples d'application des isotopes du carbone

Discrimination isotopique contre le ^{13}C lors de l'assimilation photosynthétique du CO_2 chez les plantes en C_3 . Les plantes C_3 et C_4 discriminent contre le ^{13}C lors de l'assimilation photosynthétique du CO_2 . Cette discrimination a été modélisée. Une version simple de ces modèles chez les plantes en C_3 décrit par Farquhar *et al.* (1982), représente la discrimination comme une fonction linéaire de p_i/p_a (p_i et p_a sont les pressions partielles de CO_2 dans les espaces intercellulaire et dans l'air ambiant, respectivement) :

$$\Delta = a \cdot \frac{p_a - p_i}{p_a} + b \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (E6)$$

d'où :

$$\Delta = a + (b - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (E7)$$

Ce modèle ne tient compte que de deux étapes principales de discrimination qui sont :

- La diffusion du CO_2 de l'air ambiant vers l'intérieur de la feuille *via* les stomates (*a*)
- La carboxylation (*b*)

et considère qu'il n'y a pas de gradient de CO_2 entre les espaces intercellulaires (p_i) et les sites de carboxylation dans les chloroplastes (p_c) donc $p_i = p_c$.

Le $^{13}\text{CO}_2$ diffuse et est carboxylé plus lentement (coefficient de diffusion et vitesse de réaction lors de la carboxylation plus faibles) que le $^{12}\text{CO}_2$. La plante est donc appauvrie en ^{13}C par rapport au CO_2 de l'air. La discrimination lors de l'étape de diffusion à travers les stomates (*a*) est de l'ordre de **4,4 ‰** et celle lors de l'étape de carboxylation (*b*) de l'ordre de **27 ‰**. En fait, *b* correspond au « fractionnement net » lors de la carboxylation par les deux enzymes (Rubisco et PEPC) chez les plantes en C_3 :

$$b = b_3 \cdot (1 - \beta) + \beta \cdot b_4 \quad (E8)$$

b_3 = fractionnement isotopique lors de la carboxylation par la Rubisco (29 ‰ ou 30 ‰, si on tient compte de la discrimination lors de la dissolution du CO_2 en phase liquide).

b_4 = fractionnement isotopique lors de la carboxylation par la PEPC (-5,7 ‰ si on tient compte de la dissolution et de l'hydratation du CO_2) (voir plus loin, équation E14).

β = fraction du carbone fixé par la PEPC chez les C_3 (β est de l'ordre de 5%).

Dans les conditions normales, $p_i/p_a = 0,7$ chez les C_3 , la discrimination sera alors :

$$\Delta = 4,4 + (27 - 4,4) \cdot 0,7 \cong 20 \text{ ‰}$$

On constate que le fractionnement isotopique global de la photosynthèse chez les plantes en C_3 dépend des paramètres isotopiques constants (*a* et *b*) et d'un paramètre physiologique variable, p_i/p_a . Le rapport p_i/p_a dépend de l'importance relative de la diffusion vis-à-vis de la carboxylation. L'augmentation de p_i/p_a peut être due soit à une ouverture stomatique plus importante, soit à une carboxylase moins active. On conçoit dans ces deux cas que la fixation du CO_2 ne sera pas la même. *Le classement des espèces, des génotypes et des variétés en fonction du fractionnement isotopique de la photosynthèse permet donc de rendre compte des différences spécifiques, génotypiques ou variétales des limitations d'origine stomatique ou non-stomatique.*

Ce modèle simple a été vérifié pour de nombreuses espèces C_3 (*i*) à l'échelle instantanée grâce aux mesures classiques de variable p_i/p_a dans le système ouvert d'échanges gazeux foliaires et de mesure de Δ par analyse de la variation de $\delta^{13}\text{C}$ de l'air à l'entrée et à la sortie de la chambre d'assimilation photosynthétique, (*ii*) à l'échelle d'une ou plusieurs journées par analyse isotopique des photoassimilats récents (sucres solubles) et (*iii*) à l'échelle intégrée en analysant la signature isotopique de la matière organique totale foliaire. Pour une revue récente sur la discrimination isotopique du carbone, voir Brugnoli & Farquhar (2000).

Mesure de la résistance interne foliaire à la diffusion de CO_2 dans le mésophylle chez les plantes en C_3 . La version simple du modèle de discrimination décrit ci-dessus ne prend pas en compte :

- La résistance du mésophylle à la diffusion du CO_2 à l'intérieur de la feuille (diffusion de CO_2 en phase liquide de l'espace intercellulaire jusqu'aux sites de carboxylation dans les chloroplastes).
- La discrimination qui pourrait exister lors des processus de respiration mitochondriale et de la photorespiration.

Le modèle simple de discrimination a été validé pour de nombreuses espèces C_3 . Cependant, chez certaines espèces (en particulier le blé et certains ligneux), on a observé que la discrimination isotopique mesurée *en ligne* appelée encore *la discrimination observée*, Δ_o était inférieure à celle prédite par la version simplifiée du modèle, appelée *la discrimination théorique*, Δ_t .

Une version complète du modèle de discrimination tenant compte de tous les processus, correspondant donc à la discrimination observée (Δ_o) a été décrite (Evans *et al.* 1986) :

$$\Delta_o = a \cdot \frac{p_a - p_i}{p_a} + s \cdot \frac{p_i - p_c}{p_a} + b \cdot \frac{p_c}{p_a} - d \quad (E9)$$

s (= 1,8 ‰) représente le fractionnement combiné lors de la dissolution ($b_s = 1,1$ ‰) et de la diffusion du CO_2 en phase liquide ($a_i = 0,7$ ‰ à 25°C, O'Leary, 1984).

d comprend les processus de **respiration** mitochondriale et de **photorespiration** et les fractionnements qui y sont liés.

D'après la loi de Fick,

$$A = \frac{p_i - p_c}{r_i} \Leftrightarrow p_i - p_c = A \cdot r_i \quad (E10) \quad (E11)$$

où A est l'assimilation photosynthétique du CO_2 . En faisant la différence entre la discrimination théorique Δ_i et celle observée Δ_o et en combinant les équations (E9) et (E11) :

$$\Delta_i - \Delta_o = r_i \cdot (b - s) \cdot \frac{A}{p_a} + d \quad (E12)$$

On obtient ainsi une relation linéaire entre ($\Delta_i - \Delta_o$) et A/p_a avec une pente qui est proportionnelle à la résistance du mésophylle (r_i) et l'ordonné à l'origine (d) aux fractionnements isotopiques lors des processus respiratoires.

Les valeurs de la résistance du mésophylle ainsi calculées sont comparables à celles obtenues par les mesures simultanées d'échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne. Les valeurs de d étant très petites (d'après les données de la littérature), la discrimination lors de la respiration et photorespiration est considérée comme négligeable.

Ce modèle a permis de mettre en évidence une résistance du mésophylle importante chez les ligneux et quelques espèces herbacées en particulier celles avec les feuilles épaisses et/ou une structure compacte du mésophylle. De plus, il a été montré que la signature isotopique des différents génotypes de blé plus ou moins résistants à la sécheresse était corrélée avec la masse surfacique des feuilles (Merah, 1999).

Discrimination isotopique contre le ^{13}C lors de l'assimilation photosynthétique du CO_2 chez les plantes en C_4 . Les plantes C_4 discriminent beaucoup moins que les plantes C_3 . Cette

discrimination est de l'ordre de 3 à 4‰ chez les C_4 contre 19 à 20 ‰ chez les C_3 .

Le CO_2 est d'abord hydraté dans la solution du cytoplasme des cellules de mésophylle (réaction d'équilibre entre le CO_2 et le HCO_3^-). Lors de cette réaction, le HCO_3^- est enrichi en ^{13}C (de l'ordre de 9 ‰) par rapport au CO_2 . La PEPC fixe le carbone sous forme de HCO_3^- sur le substrat (PEP) pour former l'acide oxaloacétique (AOA) qui donnera ensuite le malate. Lors de la carboxylation, la PEPC discrimine seulement de l'ordre de 2,2 ‰ (mesurée *in vitro* en présence de l'enzyme et du substrat) au contraire de la Rubisco qui discrimine beaucoup plus (29 ‰). Le malate formé est ensuite transporté vers les cellules de la gaine périvasculaire où il est décarboxylé et le CO_2 dégagé est dissous dans la solution des cellules de la gaine et est ensuite carboxylé dans les chloroplastes de ces cellules par la Rubisco. Puisque les cellules de la gaine sont subérisées (très étanches), la Rubisco ne discrimine pas beaucoup (le CO_2 a très peu de *chance* de s'échapper de la gaine).

La fixation du carbone sous forme de HCO_3^- , le faible fractionnement par la PEPC et l'étanchéité de la gaine (faible fractionnement par la Rubisco) expliquent la très faible discrimination photosynthétique chez les C_4 .

Le modèle simple de discrimination photosynthétique chez les C_4 décrit par Farquhar *et al.* (1982) et Deléens *et al.* (1983) est :

$$\Delta = a + (b_4 + b_3 \cdot \Phi - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (E13)$$

$$b_4 = b_s + b_h + b_p = 1,1 - 9 + 2,2 = -5,7 \quad (E14)$$

b_s = fractionnement lors de la dissolution de CO_2 = 1,1 ‰

b_h = fractionnement lors de l'hydratation de CO_2 = -9 ‰ à 25°C (le signe négatif indique un enrichissement en ^{13}C coté HCO_3^-)

b_p = fractionnement lors de la carboxylation par la PEPC = 2,2 ‰

Φ = taux de fuite de CO_2 de la gaine vers le mésophylle

La discrimination par la Rubisco chez les C_4 dépendrait du taux de fuite de CO_2 de la gaine vers le mésophylle.

Exemple :

Pour un $p_i/p_a = 0,3$ chez les plantes en C_4 , si $\Phi = 0$ (gaine entièrement étanche : pas de discrimination par la Rubisco) :

$$\Delta = 4,4 + (-5,7 + 0 - 4,4) \cdot 0,3 = 1,3 \text{ ‰}$$

Si $\Phi=1$ (gaine entièrement perméable : la Rubisco discrimine comme chez les C_3) :

$$\Delta = 4,4 + (-5,7 + 30 - 4,4) \cdot 0,3 = 11,4 \text{ ‰}$$

Pour un $\delta^{13}\text{C}(\text{air}) = -8 \text{ ‰}$, les valeurs calculées ci-dessus correspondent aux compositions isotopiques de $-9,3 \text{ ‰}$ et $-19,4 \text{ ‰}$ respectivement (calculée à partir de l'équation E5). La valeur moyenne de $\delta^{13}\text{C}$ pour différents types de plantes C_4 est de l'ordre de -11 ‰ ce qui correspond à un faible taux de fuite (de l'ordre de 18 ‰) de la gaine vers le mésophylle.

Ce modèle de discrimination photosynthétique a été validé pour de nombreuses espèces C_4 (Henderson *et al.*, 1992) et on a pu mettre en évidence que la structure des différents types C_4 (subérisation de la gaine et la position des chloroplastes dans ces cellules permettant plus ou moins le CO_2 à s'échapper) était corrélée à la signature isotopique de la matière organique chez ces plantes.

Relation entre la discrimination isotopique et l'efficacité d'utilisation de l'eau chez les plantes en C_3 : Indicateur de la résistance à la sécheresse chez différents génotypes. L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE , pour *water use efficiency*) qui est le rapport *biomasse produite/eau consommée* est un indicateur de l'adaptation des plantes à la sécheresse. Pour les plantes C_3 , les processus foliaires qui déterminent WUE sont également ceux qui contrôlent Δ lors de l'assimilation photosynthétique du CO_2 , de sorte que la mesure de Δ peut être considérée comme une méthode d'évaluation indirecte de WUE (Farquhar *et al.*, 1989 ; Ehleringer, 1991). Il a été montré, pour un ensemble d'espèces herbacées cultivées ainsi que les arbres forestiers, que WUE et Δ (calculée sur la base de la matière organique) sont des traits présentant des différences interspécifiques et intraspécifiques importantes et une héritabilité élevée. Ceci permet d'utiliser WUE et Δ comme critère de sélection pour l'amélioration génétique des plantes.

A l'échelle d'une plante,

$$WUE = \frac{A}{E} \quad (E15)$$

où A et E sont les flux de CO_2 et de H_2O à travers les stomates. Ces flux sont décrits par :

$$A = \frac{g \cdot (c_a - c_i)}{1,6} \quad (E16)$$

$$E = g(w_i - w_a) \quad (E17)$$

où $c_a - c_i$ et $w_i - w_a$ sont les différences de concentrations en CO_2 et en H_2O entre l'air ambiant et les espaces intercellulaires et g est la conductance stomatique à la diffusion de vapeur d'eau. En combinant les équations E15, E16, E17 et l'équation donnant la discrimination (E7) on obtient la relation suivante entre WUE et Δ :

$$WUE = \frac{c_a \cdot (b - \Delta)}{1,6 \cdot (w_i - w_a) \cdot (b - a)} \quad (E18)$$

Cette relation a été vérifiée expérimentalement à l'échelle instantanée (mesure en ligne de discrimination), sur 2-3 jours (signature isotopique des sucres solubles) et à l'échelle intégrée du cycle de développement (signature isotopique de la matière organique totale) : on obtient pour différents génotypes, différentes variétés ou écotypes, une relation linéaire négative entre WUE et Δ . *Etant donné des difficultés de mesure de WUE sur le terrain, une simple mesure de la signature isotopique du carbone de la matière organique végétale permet de déterminer les génotypes (variétés...) plus ou moins résistants à la sécheresse.*

Est-ce que la discrimination isotopique lors de la respiration à l'obscurité chez les plantes en C_3 peut être un indicateur de l'activité relative des voies métaboliques ? La discrimination isotopique lors de l'assimilation photosynthétique du CO_2 est très étudiée et des modèles applicables aux plantes en C_3 et C_4 ont été développés et validés (voir ci-dessus). Par contre, les données de la littérature sont peu nombreuses et contradictoires sur la discrimination qui se produit lors de la respiration. Son rôle a donc été négligé jusqu'à maintenant dans les modèles de discrimination. Cependant, la matière organique intègre le fonctionnement de la plante non seulement à la lumière mais aussi à l'obscurité, par conséquent sa composition isotopique dépend à la fois de la photosynthèse et de la respiration. Toute discrimination lors de la respiration à l'obscurité rejetant le CO_2 enrichi ou appauvri en ^{13}C modifierait donc la composition isotopique ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de la matière organique restante par rapport aux valeurs prédites par ces modèles.

Si un travail récent (Lin & Ehleringer, 1997) montre qu'il n'y a pas de discrimination isotopique lors de la respiration à l'obscurité mesurée sur les protoplastes isolés de plantes C_3 et C_4 et incubés avec des sucres de composition isotopique connue, il n'en demeure pas moins qu'une discrimination isotopique lors de la respiration à l'obscurité est

possible sinon probable. En effet, non seulement la distribution de ^{13}C au sein des molécules d'hexoses est hétérogène mais il existe aussi un effet isotopique lors de la réaction catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Les carbones 3 et 4 du glucose sont en effet plus lourds (riches en ^{13}C) que les autres carbones de la molécule, et cela devrait entraîner l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 dégagé lors de cette réaction (les carbones légers forment l'acétyl-CoA).

La signature isotopique du CO_2 respiré, comparée à celle du glucose, dépendrait donc de la fraction du carbone consommée dans le cycle de Krebs et de celle déviée vers le métabolisme secondaire (synthèse des terpènes, des caroténoïdes, des acides gras : ainsi les lipides sont effectivement pauvres en ^{13}C). Par ailleurs, le pyruvate étant à un *point de branchement*, un changement de sa contribution à la réaction PDH ou à d'autres réactions modifierait la signature isotopique du CO_2 dégagé.

D'après ce *pattern*, on peut prévoir que la signature isotopique du CO_2 respiré comparée à celle du glucose variera selon les espèces, les conditions de l'environnement et l'activité relative des différentes voies métaboliques.

Les résultats récemment obtenus dans notre laboratoire montrent bien qu'il existe une discrimination substantielle entre le ^{12}C et le ^{13}C lors de la respiration de feuilles intactes (le CO_2 respiré à l'obscurité est enrichi en ^{13}C par rapport aux carbohydrates nouvellement issus de la photosynthèse) (Duranceau *et al.*, 1999). De plus cette discrimination n'est pas constante : Elle varie selon l'espèce (6 ‰ chez le haricot, 4 ‰ chez le tabac et 3 ‰ chez le tournesol) et l'état hydrique de la plante. Lors d'une sécheresse, la discrimination reste constante chez le haricot, augmente chez le tabac et diminue chez le tournesol (Ghashghaie *et al.*, 2001). Enfin, comme prévu, la matière organique est plus pauvre en ^{13}C que ce qui est prédit par les modèles de discrimination (voir la thèse de M. Duranceau, 2000).

Les travaux actuels ont donc pour objectif de vérifier, chez différentes espèces et dans différentes conditions d'environnement, si la discrimination isotopique lors de la respiration est modulée par le métabolisme respiratoire (substrat utilisé, taux de respiration, taille des réserves de carbohydrates, type de réserve et flux relatif des métabolites). Cette étude devrait permettre de vérifier si l'on peut raisonnablement penser que la discrimination isotopique lors de la respiration est

un « indicateur » des voies métaboliques qui sont actives chez les plantes.

Conclusion

Le fractionnement isotopique lors des processus biologiques et par conséquent la signature isotopique de la matière organique ainsi que celle des différents métabolites dépendent de la disponibilité (limitation) des pools de substrat, des flux relatifs des métabolites et des conditions environnementales. L'approche isotopique constitue donc un outil puissant d'analyse des mécanismes de fonctionnement biologique des plantes et ceci à différentes échelles physiologiques (métabolisme au niveau cellulaire, organe, individu, écosystème) et temporelles. Les modèles de fractionnement isotopique (au niveau de leur abondance naturelle) sont maintenant incontournables et complémentaires des modèles de fonctionnement physiologique et métabolique des plantes. De plus, les isotopes stables offrent un moyen de marquage à froid de longue durée (non-radioactif) notamment des produits de la photosynthèse et des réservoirs de substrats utilisés ensuite dans le développement (voir l'article de J.F. Morot-Gaudry dans ce volume).

Pour plus d'exemples sur l'utilisation des isotopes de carbone, de l'azote et de l'eau, voir les livres de Maillard & Bonhomme (1995) et de Griffiths (1998) et pour le marquage au ^{15}N voir Deléens *et al.* (1997).

Références

- Brugnoli E. & Farquhar G.D. (2000) Dans *Advances in Photosynthesis*, Leegood R.C., Sharkey T.D. & von Caemmerer S. (eds), Vol. 9, pp. 399-434, Kluwer Academic Publishers
- Deléens E., Morot-Gaudry J.F., Martin F., Thoreux A. & Gojon A. (1997) Dans *Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire*, J.F. Morot-Gaudry (ed) Edition INRA, 265-280
- Deléens E., Ferhi A. & Queiroz O. (1983) *Physiol. Vég.* **21**, 897-905
- Duranceau M., Ghashghaie J., Badeck F., Deléens E. & Cornic G. (1999) *Plant Cell & Environment* **22**, 515-523
- Duranceau M. (2000) Thèse de Doctorat en Science de l'Université de Paris-XI, Orsay
- Ehleringer J.R. (1991) Dans *Carbon Isotope Techniques*, Coleman D.C. et Fry B., eds., pp. 187-200, Academic Press Inc, San Diego, California

- Evans J.R., Sharkey T.D., Berry J.A. & Farquhar G.D. (1986) *Australian J. Plant Physiol.* **13**, 281-292
- Farquhar G.D., O'Leary M.H. & Berry J.A. (1982) *Australian J. Plant Physiol.* **9**, 121-137
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R. & Hubick K.T. (1989) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 503-537
- Ghashghaie J., Duranceau M., Badeck F., Cornic G. & Deléens E. (2001) *Plant Cell & Environment* **24**, 505-515
- Griffiths H. (1998) *Stable Isotopes: Integration of biological, ecological and geochemical processes.* Environmental plant biology series, Bios scientific publishers, Oxford, UK
- Henderson S.A., von Caemmerer S. & Farquhar G.D. (1992) *Australian J. Plant Physiol.* **19**, 263-285
- Lin G. & Ehleringer J.R. (1997) *Plant Physiol.* **114**, 391-394
- Maillard P. et Bonhomme R. (1995) *Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes.* INRA-Editions (Les Colloques n°70) Paris, 360 p
- Merah O. (1999) *Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes*
- O'Leary M.H. (1984) *J. Phys. Chem.* **88**

