



**HAL**  
open science

# Variations temporelles de la composition isotopique en carbone des sucres phloémiens, de la respiration et de la cellulose du xylème du tronc en relation avec le fonctionnement de l'arbre

Marion Devaux

## ► To cite this version:

Marion Devaux. Variations temporelles de la composition isotopique en carbone des sucres phloémiens, de la respiration et de la cellulose du xylème du tronc en relation avec le fonctionnement de l'arbre : Application au Pin maritime adulte en peuplement. Milieux et Changements globaux. Université des Sciences et Technologies (Bordeaux 1), 2010. Français. NNT: . tel-02811556

**HAL Id: tel-02811556**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02811556>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



N° d'ordre :

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE « SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS »

Par **Marion DEVAUX**

POUR OBTENIR LE GRADE DE **DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : Physique de l'Environnement

---

**VARIATIONS TEMPORELLES DE LA COMPOSITION ISOTOPIQUE  
EN CARBONE DES SUCRES PHLOÉMIENS, DE LA RESPIRATION ET  
DE LA CELLULOSE DU XYLÈME DU TRONC EN RELATION AVEC  
LE FONCTIONNEMENT DE L'ARBRE**  
- Application au Pin maritime adulte en peuplement -

---

Directeur de thèse : Denis LOUSTAU

Co-directeur : Jérôme OGÉE

Soutenue le 23 avril 2010

Devant la commission d'examen formée de :

Mme BREDA, Nathalie  
M. SIEGWOLF, Rolf  
Mme GHASHGHAIE, Jaleh  
M. PONTON, Stéphane  
M. BERTRAND, Philippe  
M. LOUSTAU, Denis

DR. INRA Nancy  
DR. Paul Scherrer Institut - Suisse  
Prof. Université Paris Sud XI  
CR INRA Nancy  
DR. CNRS  
DR INRA Bordeaux

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur



À Martine et Guy, mes parents,

À Emeline et Guillaume, mes frères et sœurs,

À Laurent, alias Mamour,



# Avant-propos

Ce doctorat a été mené dans le cadre de l'Ecole Doctorale « Sciences et Environnement » de l'Université Bordeaux 1 au sein de l'unité de recherche Ephyse (Ecologie fonctionnelle et PHYsique de l'Environnement) de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Bordeaux. La thèse fut cofinancée par le département EFPA (Ecologie des Forêts, des Prairies et des milieux Aquatiques) de l'INRA et par la région Aquitaine. Les recherches effectuées pour ce travail sont partie prenante du projet régional « Durabilité du système de production forêt-bois d'Aquitaine »<sup>1</sup> coordonné par C. Meredieu et du projet européen « CARBOEUROPE »<sup>2</sup>. Ce projet de recherche de thèse fut également impliqué dans deux projets ANR « Blanc », le projet MIST<sup>3</sup>, « Modeling Isotopic Signals in Trees », coordonné par J. Ogée et le projet CATS<sup>4</sup>, « Carbon Allocation in Tree and Soil », coordonné par D. Epron.

Ce mémoire de doctorat est rédigé sous forme de thèse sur publications.

---

<sup>1</sup> [www.bordeaux.inra.fr/durabilite\\_foret\\_bois\\_aquitaine](http://www.bordeaux.inra.fr/durabilite_foret_bois_aquitaine)

<sup>2</sup> [www.carboeurope.org](http://www.carboeurope.org)

<sup>3</sup> [www.inra.fr/projet\\_anr\\_mist](http://www.inra.fr/projet_anr_mist)

<sup>4</sup> [www.esu-psud.fr/cats](http://www.esu-psud.fr/cats)



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble du personnel de l'unité Ephyse pour m'avoir accueillie dans ses locaux à Pierroton et à la Ferrade pendant ces 3 années de thèse.

J'aimerais sincèrement remercier Denis Loustau, mon directeur de thèse, qui m'a fait découvrir la passion de la recherche. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée et ton soutien. Je t'en suis très reconnaissante.

Je remercie également Jérôme Ogée, mon co-directeur de thèse pour son aide.

Un grand merci à mon comité de thèse, Galeh Shashghaie, Valérie Masson-Delmotte et Erwin Dreyer qui se sont intéressés à mon sujet de thèse et m'ont prodigué de nombreux conseils.

J'exprime également ma reconnaissance aux membres du jury de ma thèse qui m'ont fait le plaisir de faire partie de ce jury : Nathalie Bréda, Rolf Siegwolf, Galeh Shashghaie, Stéphane Ponton et Philippe Bertrand.

J'aimerais remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de mon travail, que soit une aide matérielle, technique, scientifique ou morale. Je ne vous tenterai pas de tous vous citer pas car la liste n'en finirait pas. Sachez simplement que je vous dis un grand « Merci ».

Merci également à tous les personnes (et la liste est longue) avec qui j'ai pu travailler ou discuter de mon sujet de thèse et que j'ai pu rencontrer dans les couloirs ou au grès des conférences.

Je voudrais remercier tous mes colocataires de bureau: Marie, Tovo, Virginie et Cathy. Un grand merci à Cathy, ma collègue de bureau à Pierroton pour les missions terrain et le travail au laboratoire qui furent un réel plaisir et merci de m'avoir tant épaulée dans le travail mais aussi moralement. Comme mon prédécesseur, je recommande vivement ce bureau au prochain doctorant ! Merci aux thésardes, Marie et Virginie, avec qui j'ai passé de très bons moments et qui m'ont beaucoup écoutée et soutenue. Et merci à Tovo de m'avoir accueillie dans son bureau, et désolée si j'ai finalement dû aller 2 ou 3 fois maximum au volley en 3 ans de thèse 😊.



Je tiens à remercier tout le personnel non-permanent qui n'a cessé d'augmenter année après année. Merci pour cette magnifique entente. Je n'oublierai pas les repas non-permanents ... même si je n'étais malheureusement pas présente aux derniers.

Je n'oublierai pas non plus le Coin café, fait de rires et de discussions scientifiques, les pauses Pim's et gâteaux au chocolat (sans ça, ça n'aurait pas été pareil !), les missions terrains tardives avec Didier, Régis, Christophe, Alex et Denis et surtout Michel, les expérimentations de jour ... et de nuit avec Cathy et Didier ... et parfois le WE (Merci Miti et Mamour) qui ont parfois mené à faire déclencher l'alarme. Je m'en excuse d'ailleurs auprès des gardiens ☺

Plus personnellement, merci à Dadou & Gérard et Julie. Merci à Miti avec qui j'ai partagé la thèse (Courage à toi pour la fin !) et un grand merci à ma belle-famille : Cathy & Patou, Chouchou, Eliane & Yves, Aurore & Super Jéjé, Saria, Miti & Juju que je remercie également. Merci à tous de m'avoir toujours soutenue et d'être toujours présents pour moi.

Je finirais tout simplement par remercier du fond du cœur ma famille : Papa et Maman ainsi que Emeline et Guillaume qui m'ont tellement soutenue et qui ont toujours cru en moi. En plus de leur grand soutien, merci à eux d'avoir contribué d'aussi près à ma thèse : les heures supplémentaires au laboratoire et sur le terrain avec ma sœur, le WE du 14 Juillet à enfiler des perles et de perles pour mes échantillons de bois, entre autres moments mémorables ...

Et Mamour, merci à toi d'être là et de m'avoir tant soutenue pendant ma thèse. ♥ ♥ ♥

# Résumé

L'intérêt de ma thèse fut d'utiliser l'atome de carbone comme traceur isotopique en abondance naturelle ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ou  $\delta^{13}\text{C}$ ) dans la plante afin de mieux comprendre comment la plante fonctionne en relation avec ces conditions environnementales. Par conséquent, mes recherches visent à améliorer les connaissances actuelles du cycle du carbone dans les écosystèmes forestiers dont leur rôle de puits ou source de carbone dans les prochaines années reste une question ouverte compte tenu de l'augmentation croissante du  $\text{CO}_2$  d'origine anthropique dans l'atmosphère.

L'objectif de ma thèse fut de comprendre comment fonctionnent les pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) au niveau de son axe principal, le tronc, sachant que récemment des processus de discrimination isotopique après photosynthèse, soit des processus post-photosynthétiques ont été révélés. Dans ce but, on a cherché à construire un bilan simple et partiel de masse isotopique au niveau du tronc qui prend compte des principaux compartiments et processus associés suivants : (1) les sucres phloémiens qui sont transférés depuis leur assimilation photosynthétique jusque dans le tronc, (2) le  $\text{CO}_2$  « respiré » au niveau du tronc dans l'atmosphère qui utilise les sucres phloémiens comme substrat et (3) la cellulose déposée dans les cernes annuels du xylème dont le substrat est également les sucres phloémiens.

Notre approche s'est décomposée en deux phases. Une première étape fut l'analyse temporelle et à haute résolution des compositions isotopiques en carbone des 3 principaux compartiments pendant 2 années consécutives, 2007 et 2008, en présupposant que ces 2 années permettraient de capturer les effets d'événements climatiques tels qu'une sécheresse sur le fonctionnement des arbres. Cette expérimentation a été menée sur le site de pins maritimes en Landes de Gascogne au Sud Ouest de La France, Le Bray, site atelier du projet Carboeurope pour lequel un suivi intensif des paramètres climatiques et physiologiques de l'écosystème a été mené depuis 1987. La mesure simultanée des  $\delta^{13}\text{C}$  des trois compartiments a nécessité d'importantes mises au point méthodologiques, telles que la méthode d'extraction des sucres phloémiens ou la mesure des isoflux  $^{12}\text{CO}_2$  et  $^{13}\text{CO}_2$  par un spectromètre à diode laser modulable (TDLAS). La seconde phase fut la vérification de ce modèle simplifié de fonctionnement par l'analyse du  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes annuels à différentes résolutions et pour deux sites à conditions hydriques contrastées caractéristiques de la lande humide, Le Bray et de la lande sèche, Vielle Soubiran pendant 7 années consécutives, de 2001 à 2007.

Nos résultats montrent des variations saisonnières du  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres du phloème, du  $\text{CO}_2$  respiré par le tronc et de la cellulose des cernes annuels. De plus, on démontre l'existence de processus post-photosynthétiques lors de la respiration du tronc et la synthèse de nouveaux tissus xylémiens. En effet, le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré est appauvri en  $^{13}\text{C}$  de 0,8 à 1,8 ‰ et le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes annuels est par contre enrichi en  $^{13}\text{C}$  de 0,5 à 2,7 ‰ comparé aux substrats, les sucres phloémiens, pendant la période de croissance. Hors période de croissance le fractionnement isotopique lors de la respiration du tronc devient nul. Par le bilan de masse, on montre que les flux isotopiques de carbone alloué aux deux processus se compensent. Ce modèle simple de fonctionnement a été testé dans le cas de 2 années qui se sont avérées humides et reste à évaluer dans le cas d'années sèches. La mesure du  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes annuels sur 2 sites à caractère hydrique contrasté a mis en évidence que le  $\delta^{13}\text{C}$  moyenné n'est étonnamment pas significativement différents entre les deux sites. Les dynamiques intra-annuelles du  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes présentent un pattern périodique pour toutes les années étudiées dont l'amplitude varie de 1 ‰ en année humide et de 4 ‰ en année sèche. Ce pattern semble être directement représentatif de la discrimination isotopique de l'assimilation photosynthétique. Cependant, l'hypothèse que le stockage et la remobilisation des réserves influent sur le  $\delta^{13}\text{C}$  du cerne annuel reste ouverte.

# Sommaire

Avant-propos .....	5
Remerciements.....	7
Résumé.....	9
Table des Figures .....	13
Table des Annexes .....	16

## Chapitre 1: Introduction

1 Contexte général : Partie continentale du cycle biogéochimique du carbone.....	18
1.1 Bilan de carbone global.....	18
1.2 Bilan de carbone à l'échelle des écosystèmes forestiers .....	19
2 Le traçage isotopique en abondance naturelle.....	21
2.1 Généralités sur les isotopes stables .....	21
2.3 Isotopes stables dans le cycle biogéochimique .....	24
2.4 Variabilité de la composition isotopique du carbone de l'écosystème à la plante .....	25
3 Les processus de discrimination isotopique du carbone dans l'arbre .....	28
3.1 La photosynthèse.....	28
3.2 Les processus post-photosynthétiques .....	31
3.2.1 Pourquoi étudier les processus après-photosynthèse?.....	31
3.2.2 Les sucres phloémiens.....	33
3.2.3 La respiration au niveau du tronc .....	34
3.2.4 La formation du bois .....	36
4 Objectif de thèse .....	39

## Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1 Les sites expérimentaux.....	46
1.1 Les Landes de Gascogne .....	46
1.2 Site expérimental « Le Bray ».....	47
1.3 Site expérimental « Vielle Soubiran ».....	47
2 Stratégie d'échantillonnage .....	48
2.1 Les sucres phloémiens.....	48
2.1.1 Technique d'exsudation .....	49
2.1.2 Technique de centrifugation.....	49
2.2 Les cernes annuels.....	49
2.3 Le CO <sub>2</sub> « respiré » par le tronc.....	51
2.3.1 Caractéristiques des chambres de mesures de respiration de tronc.....	52
2.3.2 Système de mesures d'échanges gazeux .....	53
3 Mesure de teneur en sucres phloémiens .....	58

---

3.1 Teneur en sucres totaux .....	58
3.2 Teneur en saccharose, glucose, fructose et pinitol .....	59
<b>4 Mesure de la composition isotopique en carbone .....</b>	<b>59</b>
4.1 Les sucres phloémiens.....	59
4.2 La cellulose des cernes .....	59
4.3 Le CO <sub>2</sub> « respiré » par le tronc.....	59
<b>Chapitre 3: Les sucres phloémiens</b>	
Variations temporelles de la teneur en sucres phloémiens et leur composition isotopique en carbone .....	65
<b>Chapitre 4 : Les fractionnements isotopiques post-photosynthétiques</b>	
Fractionnement isotopique post-photosynthétique lors des processus de « respiration » du tronc et de synthèse de cellulose du xylème du tronc .....	79
<b>Chapitre 5 : Les cernes annuels</b>	
Contrôle biologique et environnemental des variations spatiales et temporelles de la composition isotopique de la cellulose des cernes annuels .....	109
<b>Chapitre 6 : Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>137</b>
Références bibliographiques.....	149
Annexes .....	157

# Table des Figures

- Figure 1. Évolution de la concentration en dioxyde de carbone durant les 10 000 dernières années (panneau large) et depuis 1750 (insert). Les mesures de concentration ont été effectuées sur des carottes glaciaires (symboles de différentes couleurs pour différentes études) et sur des échantillons de gaz atmosphérique (lignes rouges). Les forçages radiatifs correspondant relatif à 1750 sont aussi figurés (axe droit du panneau large). (source GIEC, Rapport de 2007, [www.ipcc.ch](http://www.ipcc.ch))..... 18
- Figure 2. Évolution (a) de la concentration de dioxyde de carbone entre 1960 et 2010 et (b) de la concentration moyenne mensuelle de dioxyde de carbone entre 2005 et 2010 mesurée à Mauna Loa (Hawaii). En rouge, sont représentées les valeurs moyennes mensuelles de concentration en CO<sub>2</sub>. En noir, sont indiquées les valeurs de concentration de CO<sub>2</sub> après correction du cycle saisonnier. (Pieter Tans, NOAA/ESRL ([www.ersl.noaa.gov/gmd/ccg/trends](http://www.ersl.noaa.gov/gmd/ccg/trends))) ..... 19
- Figure 3: Schéma d'un spectromètre de masse (IRMS)..... 23
- Figure 4. Variabilités de la composition isotopique en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de différents composés terrestres exprimée en partie par millier (‰) relativement au standard de référence (V-PDB) (Selon Deléens et al. 1976). ..... 25
- Figure 5. Représentation temporelle du siècle à  $10^{-6}$  seconde et spatiale depuis l'échelle de l'écosystème jusqu'à la molécule (en angström, Å) de la composition isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de quelques compartiments (Osmond *et al.*, 1988)..... 26
- Figure 6. Variabilités de la composition isotopique du carbone et de l'oxygène dans le cycle du carbone et de l'eau au sein d'un arbre. Les boîtes représentent les pools et les flèches les processus. Les valeurs sont approximatives et dépendantes de la localisation géographique et de conditions environnementales. Les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  sont exprimées selon V-SMOW et V-PDB pour l'oxygène et le carbone respectivement. (Dawson *et al.*, 2002). ..... 27
- Figure 7. Récapitulatif des compositions isotopiques en carbone de tous les constituants de la feuille d'une plante C<sub>3</sub> relativement au  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique totale. La ligne correspond au  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique totale de la feuille et la ligne en pointillé indique le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres (Bowling *et al.*, 2008). ..... 27
- Figure 8. Schéma conceptuel des processus mésophylliens d'échange de CO<sub>2</sub> (Wingate *et al.*, 2007)..... 29
- Figure 9. Evolution de la composition isotopique du CO<sub>2</sub> atmosphérique en Tasmanie entre 1980 et 2010 ([www.cmar.csiro.au](http://www.cmar.csiro.au)) ..... 30
- Figure 10. Différences entre  $\delta^{13}\text{C}$  de différents constituants de la plante (boxplot): A) souterrain – aérien, B) racines – feuilles pour les plantes C<sub>3</sub>, C) racines – feuilles pour les plantes C<sub>4</sub>, D) tiges non ligneuses - feuilles et E) tiges ligneuses - feuilles. (Badeck *et al.*, 2005)..... 31

Figure 11. Représentation simplifiée des flux de carbone dans les plantes en C <sub>3</sub> et des hypothèses pouvant justifier l'enrichissement en <sup>13</sup> C des tissus hétérotrophes en comparaison des tissus autotrophes. Voici un résumé : H1, composition biochimique variable ; H2, séparation saisonnière de la croissance ; H3, utilisation du saccharose jour vs. nuit ; H4, fractionnement respiratoire ; H5, fixation de carbone par la PEP carboxylase et H6, variation de la discrimination photosynthétique contre le <sup>13</sup> C (Cernusak <i>et al.</i> , 2009).....	32
Figure 12. Évolution de la composition isotopique en carbone de la matière organique phloémienne au niveau des rameaux et du tronc d'arbre (Brandes <i>et al.</i> , 2007) .....	33
Figure 13. Cinétique diurne de (a) la matière organique totale du tronc et (b) de la sève phloémienne le long de l'axe principal, le tronc de ricin (a à f). (Gessler <i>et al.</i> , 2008) .....	34
Figure 14. Mécanisme de respiration (Tcherkez <i>et al.</i> , 2003).....	35
Figure 15. Répartition du $\delta^{13}\text{C}$ de chaque carbone du glucose selon leur position pour le maïs et la betterave (Tcherkez <i>et al.</i> , 2004 ; Rossmann <i>et al.</i> , 1991) .....	35
Figure 16. Schéma en trois dimensions d'une section radiale de tronc de Pin maritime (Plomion <i>et al.</i> , 2001).....	37
Figure 17. Profil de variation du $\delta^{13}\text{C}$ de la matière organique totale de trois cernes de hêtres ( <i>Fagus sylvatica</i> ) à haute résolution (Helle <i>et al.</i> , 2004).....	37
Figure 18. Dynamique annuelle de la composition isotopique des sucres phloémiens (cercles) et de la cellulose (carrés) (Gessler <i>et al.</i> , 2009) .....	38
Figure 19. Schématisation des différents flux d'éléments (CO <sub>2</sub> et H <sub>2</sub> O) et des processus de fonctionnement d'un pin maritime depuis la photosynthèse jusqu'à l'utilisation des sucres phloémiens pour la respiration ou la synthèse de la cellulose déposée dans les cernes annuels. ....	41
Figure 20. Schéma conceptuel de la thèse. Les numéros de 1 à 3 (rouge) correspondent aux différents chapitres de la thèse. Le numéro 2 (en bleu) correspond à un article en co-auteur (Annexe 3) qui vient en complément du chapitre 2. ....	43
Figure 21. Photographie du site du Bray (2007, M. Devaux) .....	47
Figure 22. Photographies des deux placettes : « Vielle bas » (à gauche) et « Vielle haut » (à droite) (M. Sartore) .....	47
Figure 23. Photographie présentant l'exsudation de 3 morceaux de phloème dans 6mL d'eau distillée. ....	49
Figure 24. Photographie présentant un morceau de phloème dans un cône rempli de verre de filtration et la sève récoltée par centrifugation au fond du tube Eppendorf. ....	49
Figure 25. Représentation photographique du spectromètre à diode laser modulable (TGA100, Campbell Scientific, Inc.).....	54

---

Figure 26. Schéma de la mesure de gaz par spectrométrie à diode laser modulable (TDLAS)	54
Figure 27. Schéma de mesure d'échanges gazeux par spectrométrie à diode laser modulable (TDLAS) et par spectrométrie infrarouge (IRGA). .....	55
Figure 28. Schéma de l'expérimentation mené au Bray sur pin maritime: mesures de concentrations en CO <sub>2</sub> de la photosynthèse, de la respiration du tronc et de la respiration du sol en 2007 (Burllett et al., 2007, poster JEF, Annexe 4) .....	56
Figure 29. Séquence de mesure typique des concentrations en CO <sub>2</sub> par diode laser modulable de respiration et de photosynthèse (Wingate <i>et al.</i> , submitted).....	57



# Table des Annexes

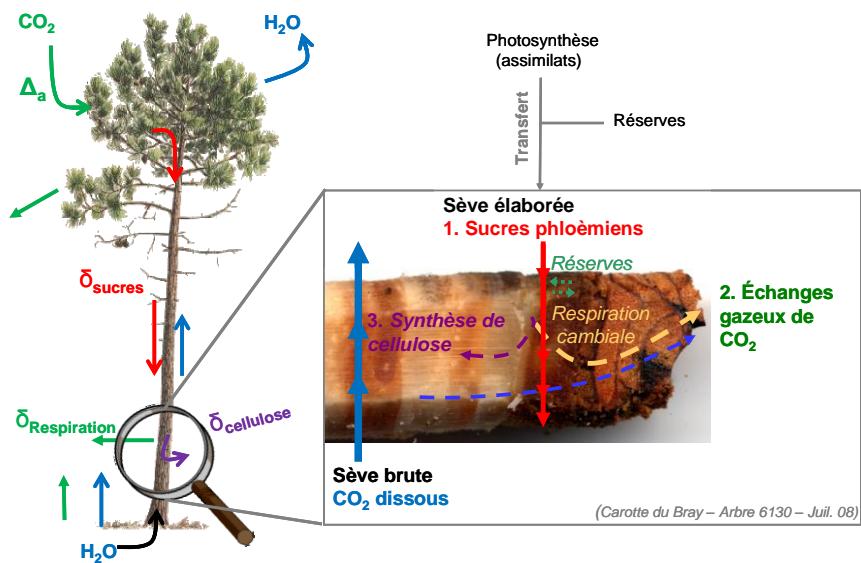
## Annexe 1

Article en co-auteur : Wingate et al., *New Phytologist* (2010)..... 161

## Annexe 2

Posters ..... 177

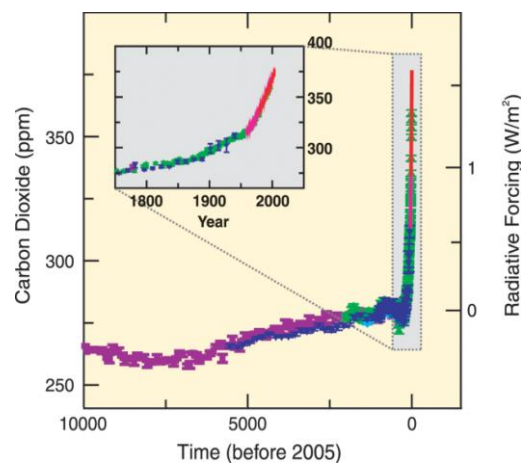
## Introduction



# 1 Contexte général : Partie continentale du cycle biogéochimique du carbone

## 1.1 Bilan de carbone global

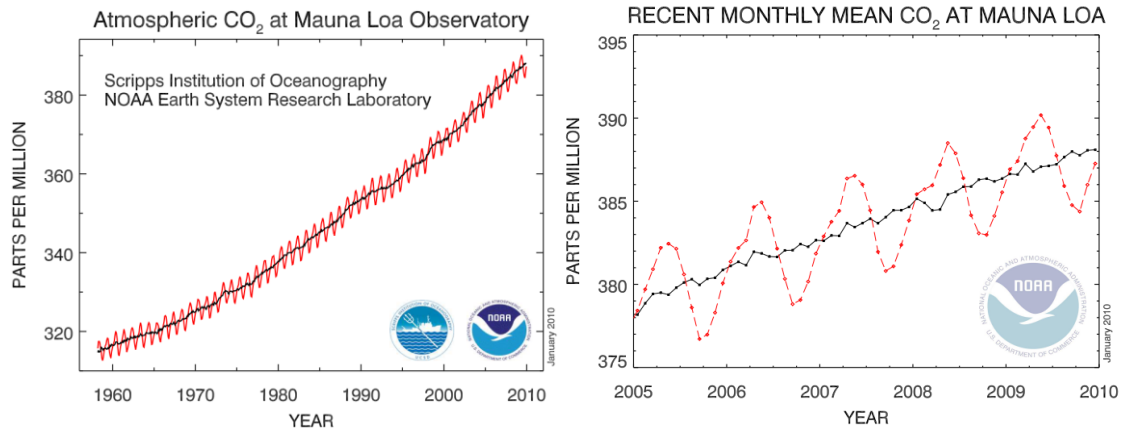
Depuis le début du XIX<sup>ème</sup> siècle, la concentration en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'atmosphère, ainsi que d'autres gaz à effet de serre d'origine anthropique tels que le méthane (CH<sub>4</sub>) et l'oxyde nitreux ou protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O), n'a cessé d'augmenter. Le rapport de 2007 du Groupe Intergouvernemental d'Experts sur le Climat (GIEC) montre que depuis 1750, la concentration en CO<sub>2</sub> a notablement augmenté avec l'augmentation de l'activité humaine. La concentration troposphérique mesurée à l'observatoire de Mauna Loa (Hawaii) dépassera 390 ppm en 2010 et excède donc largement les valeurs de concentration de CO<sub>2</sub> estimées de 280 ppm lors de la période préindustrielle (Figure 1).



**Figure 1.** Évolution de la concentration en dioxyde de carbone durant les 10 000 dernières années (panneau large) et depuis 1750 (insert). Les mesures de concentration ont été effectuées sur des carottes glaciaires (symboles de différentes couleurs pour différentes études) et sur des échantillons de gaz atmosphérique (lignes rouges). Les forçages radiatifs correspondant relatif à 1750 sont aussi figurés (axe droit du panneau large). (source GIEC, Rapport de 2007, [www.ipcc.ch](http://www.ipcc.ch))

La série historique des mesures de concentrations en CO<sub>2</sub> atmosphérique de l'observatoire de Mauna Loa initiées par Keeling C.D. en 1958 (Keeling *et al.*, 1976) présentent une augmentation croissante d'environ 65 ppm entre 1960 et 2010 et de 10 ppm depuis les 5 dernières années (Figure 2).

La quantification des concentrations des gaz émis à la surface de la terre peut être effectuée à partir des mesures par satellite (soit par télédétection). Par exemple, les émissions de monoxyde de carbone (CO) et de méthane (CH<sub>4</sub>) en Afrique ont été quantifiées à partir des mesures du satellite MOPITT (Measurements Of Pollution In The Troposphere) (Chevallier *et al.*, 2009).



**Figure 2.** Évolution (a) de la concentration de dioxyde de carbone entre 1960 et 2010 et (b) de la concentration moyenne mensuelle de dioxyde de carbone entre 2005 et 2010 mesurée à Mauna Loa (Hawaii). En rouge, sont représentées les valeurs moyennes mensuelles de concentration en  $\text{CO}_2$ . En noir, sont indiquées les valeurs de concentration de  $\text{CO}_2$  après correction du cycle saisonnier. (Pieter Tans, NOAA/ESRL ([www.ersl.noaa.gov/gmd/ccg/trends](http://www.ersl.noaa.gov/gmd/ccg/trends)))

Cette forte augmentation de dioxyde de carbone dans l'air est due à l'augmentation du déboisement et de la combustion du carbone fossile. On estime qu'en 2007, 8 Gt de carbone ont été rejetées par an dans l'atmosphère par les activités humaines (Falkowski *et al.*, 2000). Cette augmentation de concentration troposphérique en gaz à effet de serre d'origine anthropique est à l'origine de l'augmentation de la température moyenne globale (Rapport du GIEC, 2007) et par conséquent, la raison des changements climatiques en cours desquels on peut rapprocher des événements extrêmes comme l'épisode de canicule et la sécheresse de 2003 en Europe (Ciais *et al.*, 2005).

## 1.2 Bilan de carbone à l'échelle des écosystèmes forestiers

Dés 1991, Tans *et al.* (1991) ont montré qu'un puits de carbone présumé était nécessaire pour expliquer le bilan atmosphérique global du  $\text{CO}_2$  et les écosystèmes forestiers, susceptibles d'expliquer ce puits, ont dès lors été l'objet de mesures intensives. Les écosystèmes forestiers sont un des acteurs majeurs du cycle du carbone, par leur extension et par le faible turnover (d'un ordre de grandeur de 10 à 1000  $\text{an}^{-1}$ ) du carbone qu'ils accumulent dans la biomasse et sol. Les forêts représentent 80 % de la biomasse terrestre et leur assimilation de carbone représente 50 % du carbone fixé par tous les végétaux terrestres (Saugier *et al.*, 2001).

Deux interrogations importantes sont posées par ce contexte. La première concerne le devenir du fonctionnement des forêts et de leur rôle atténuateur de l'effet de serre dans un contexte environnemental changeant rapidement : changement climatique, pollutions locales (ozone), régionales (dépôts azotés) et globales ( $\text{CO}_2$ ), pressions anthropiques accrues (biomasse, fibre, énergie). On se demande alors comment évoluera le bilan de carbone à la fois à l'échelle globale et aux échelles régionales et locales. Les forêts seront-elles encore puits de carbone ou deviendront-elles source de carbone? La deuxième concerne les causes des changements observés dans la productivité forestière et les échanges forêts-atmosphère au cours des 50

dernières années et singulièrement des 20 dernières années. Cela concerne la décomposition et la quantification des effets respectifs des changements environnementaux d'une part et des effets de la gestion forestière de l'aménagement et de la conversion passée et actuelle d'usage des terres d'autre part (projet européen GHG-Europe, 7<sup>e</sup> PCRD).

Pour répondre à ces questions, la compréhension de l'écophysiologie des arbres et des écosystèmes forestiers est essentielle. L'étude intégrée des différents processus déterminant les flux de carbone dans l'écosystème, la photosynthèse, la respiration des différents organes autotrophes et hétérotrophes, le transport de carbone dans l'arbre et vers le sol, l'accumulation de carbone dans les tissus pérennes et notamment le bois est indispensable et demeure un champ thématique très actif d'écologie fonctionnelle moderne. L'intégration temporelle de ces processus est essentielle. Il ne s'agit plus en effet de comprendre les échanges instantanés du cycle du carbone mais aussi d'en comprendre les déterminants temporels et leur projection à long terme. Dans cette démarche, les isotopes stables sont devenus des outils de prédilection en tant que traceurs des processus biologiques au cours du fonctionnement des arbres et de leur réponse aux événements climatiques. En effet, les processus clés du cycle biogéochimique des éléments majeurs ne sont pas isotopiquement neutres et conditionnent les variations du rapport isotopique de différents éléments tels que l'hydrogène, le carbone, l'azote, l'oxygène, le soufre et le strontium dans différents compartiments. La composition isotopique des composés échangés ou accumulés dans les compartiments des systèmes étudiés sont donc autant d' « archives » où s'enregistrent les changements environnementaux passés. Ainsi la composition isotopique des gaz atmosphériques, tissus animaux et végétaux, de la matière organique du sol, des carbonates des coraux, de la matière organique déposée dans les sédiments océaniques, ou les sources d'eau dans l'hydrosphère et l'atmosphère sont largement utilisés pour l'analyse rétrospective du fonctionnement des cycles biogéochimiques ; il est confirmé que les variations isotopiques ont bien le potentiel de révéler comment les écosystèmes ont répondu aux changements climatiques du passé. Ces enregistrements isotopiques peuvent aussi servir à éprouver des modèles de fonctionnement qui permettent de prédire la réponse des écosystèmes aux changements climatiques.

De ce point de vue, le cas de la forêt de Pin maritime des Landes de Gascogne fournit un cadre de recherche particulièrement intéressant, à plus d'un titre. Le cycle du carbone et l'impact des changements climatiques et environnementaux y sont étudiés par différentes approches depuis plusieurs décennies. Il est établi qu'avant la tempête Martin de 1999, le bilan net annuel de carbone par l'écosystème mesuré sur le site international du Bray (projets Euroflux, carbo Euroflux, Carbo Age, Carboeurope, Fluxnet) était de  $-575 \text{ gC.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$  avec une production primaire brute (GPP) de  $2255 \text{ gC.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$  et une respiration totale de l'écosystème de  $1680 \text{ gC.m}^{-2}.\text{yr}^{-1}$  (Berbigier *et al.*, 2001; Kowalski *et al.*, 2003). Sur la décennie 1997-2007, Loustau *et al.* (2008) et Guillet *et al.* (2010), combinant des données mesurées de flux de  $\text{CO}_2$  et d'activité du carbone-14 ( $^{14}\text{C}$ ) dans les horizons organiques du sol et de l'humus ont montré que le flux annuel de carbone « séquestré » par ce peuplement,

NEE, soit  $344 \pm 51 \text{ gC.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$  serait alloué vers la biomasse des arbres ( $322 \pm 32 \text{ gC.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ ) et le sol ( $26 \pm 20 \text{ gC.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ ). Les sécheresses sont le principal facteur expliquant les variations interannuelles de ce bilan : la sécheresse de 2002 a réduit la NEE annuelle à  $+50 \text{ gC.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ .

N’Guyen-Queyrens *et al.* (1998) et Porté et Loustau (2001) ont aussi apporté des premiers éléments d’interprétation des variations de teneur isotopique du carbone de la cellulose des cernes annuels, montrant respectivement que celles-ci sont liées au bilan hydrique de l’écosystème et pour le bois d’été, au rapport GPP sur la transpiration des arbres annuels.

## 2 Le traçage isotopique en abondance naturelle

### 2.1 Généralités sur les isotopes stables

Les premiers travaux sur la théorie fondamentale de l’isotopie ont été réalisés dans des domaines variés : chimiques, physiques et biologiques, par plusieurs auteurs dont Alfred Nier, Harold Urey, Malcolm Dole, Samuel Epstein, Harmon Craig entre autres (Sharp, 2007). Les éléments les plus étudiés sont l’hydrogène (H), le carbone (C), l’oxygène (O) et l’azote (N) puisqu’ils composent la majorité de la matière vivante sur Terre. Leurs formes isotopiques sont utilisées comme traceur pour l’étude des cycles biogéochimiques.

Par définition, des isotopes sont des atomes qui possèdent le même nombre d’électrons mais un nombre de neutrons différents. Parmi ces isotopes, on différencie les isotopes dits stables des isotopes dits instables.

Les isotopes stables sont exprimés sous la forme d’un rapport isotopique du plus lourd isotope stable sur le plus léger, ou du plus rare sur le plus commun, l’isotope léger étant le plus abondant et l’isotope lourd le moins abondant (Tableau 1).

Atome	Isotope	Abondance	Ratio	Référence standard
Hydrogène	$^1\text{H}$	99.984	$^2\text{H}/^1\text{H}$ (D/H)	V-SMOW
	$^2\text{H}$ (D)	0.0156		
Carbone	$^{12}\text{C}$	98.982	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	V-PDB
	$^{13}\text{C}$	1.108		
Azote	$^{14}\text{N}$	99.630	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	$\text{N}_2$ -atm
	$^{15}\text{N}$	0.366		
Oxygène	$^{16}\text{O}$	99.763	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	V-SMOW, V-PDB
	$^{17}\text{O}$	0.0375		
	$^{18}\text{O}$	0.1995		

**Tableau 1.** Abondances naturelles et rapports isotopiques des isotopes des principaux atomes présents sur Terre ainsi que la référence standard correspondante. V-SMOW correspond à Vienna Standard Mean Ocean Water; V-PDB à Vienna Pee Dee Belemnite et  $\text{N}_2$  atm au gaz atmosphérique diazote (Dawson *et al.*, 2007).

On utilise une notation dite en « delta » dans laquelle le rapport isotopique d'une matière vivante ou échantillon (sample) est exprimé relativement à une référence standard internationale (STD) selon l'équation suivante :

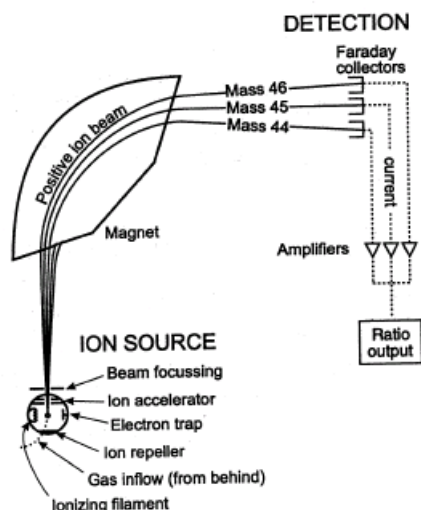
$$\delta^X Y = \left( \frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{STD}}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (1)$$

Dans laquelle  $R_{\text{Sample}}$  est le rapport isotopique de l'isotope lourd sur l'isotope léger de l'échantillon,  $R_{\text{STD}}$  est le rapport isotopique de la référence standard et  $\delta^X Y$  est la composition isotopique en isotope lourd X de l'atome Y.

Les valeurs « delta » s'expriment en général en partie par millier (‰). L'intérêt de cette notation est donc de rendre plus facilement compréhensible les petites variations du rapport isotopique d'une substance. Une substance qui a une valeur de « delta » positive contient relativement plus d'isotope lourd que la référence standard. Par analogie, une substance qui a une valeur de delta négative contient relativement plus d'isotope léger que le standard.

Les standards utilisés sont des références choisies par l'IAEA (International Atomic Energy Agency), V-SMOW ou Vienna Standard Mean Ocean Water pour l'oxygène et V-PDB Vienna Pee Dee Belemnite pour le carbone. A l'origine, le standard PDB était un carbonate de calcium provenant de la formation géologique PeeDee en Caroline du Sud, dérivé du fossile marin du Crétacé, *Belemnitella americana*.

Les rapports isotopiques d'une substance sont quantifiés par spectrométrie de masse, IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer) qui mesure le rapport isotopique d'un gaz. Le gaz mesuré, par exemple le dioxyde de carbone, est soumis à un champ magnétique qui sépare les différents isotopologues selon leur masse molaire (Figure 3). C'est-à-dire qui sépare le  $^{12}\text{CO}_2$  de masse molaire (M) de 44 g.mol<sup>-1</sup> du  $^{13}\text{CO}_2$  de masse molaire de 45 g.mol<sup>-1</sup> et du  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$  de masse molaire de 46 g.mol<sup>-1</sup>. Pour la mesure du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , les masses molaires d'intérêt sont 44 g.mol<sup>-1</sup> et 45 g.mol<sup>-1</sup> et pour la mesure du rapport isotopique  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ , les masses molaires d'intérêt sont 44 g.mol<sup>-1</sup> et 46 g.mol<sup>-1</sup>. Cependant d'autres isotopes stables pour ces masses molaires existent : pour la masse molaire de 45 g.mol<sup>-1</sup>, le  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$  et pour la masse molaire de 46 g.mol<sup>-1</sup>,  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$  et  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ . Des corrections sont donc apportées afin d'éliminer leurs contributions dans le calcul du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  et  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ .



**Figure 3:** Schéma d'un spectromètre de masse (IRMS)

Lorsque l'échantillon est une substance solide, un analyseur élémentaire (EA) est placé juste avant le spectromètre de masse afin de décomposer le solide en gaz par combustion.

L'origine des variations de composition en isotopes stables de substances vivantes réside dans le fait que (1) les atomes lourds possèdent une fréquence de vibration plus faible que les isotopes légers et (2) que leur diffusivité est plus faible. En effet, les atomes lourds réagissent plus lentement que les atomes légers parce que l'énergie de liaison pour l'atome lourd est plus importante. Pour casser une liaison chimique qui contient au moins un atome lourd, il faudra dépenser beaucoup plus d'énergie que s'il avait fallu casser une liaison chimique comprenant un atome léger. Ces différences de propriétés physiques et chimiques entre isotopes est à l'origine du « fractionnement » isotopique observé dans le cycle biogéochimique d'un élément.

Un fractionnement isotopique se produit lors d'une réaction chimique ou de la diffusion d'une substance. Etant donné que l'isotope lourd est moins réactif que l'isotope léger, le taux d'isotope lourd sera par conséquent plus important dans le substrat que dans le produit : le substrat est dit « enrichi » et le produit « appauvri » en isotope lourd. On peut différencier deux types de fractionnement : les fractionnements cinétiques (fractionnement unidirectionnel) et les fractionnements à l'équilibre qui sont réversibles (par exemple, la diffusion). En biologie, les fractionnements cinétiques sont en général associés à des processus enzymatiques, comme par exemple, la photosynthèse où la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ou RuBisCO intervient dans la réaction de carboxylation du dioxyde de carbone. Ces fractionnements sont donc à l'origine des variations de composition isotopique que l'on cherche à mesurer afin de suivre les processus, de déterminer la source ou d'enregistrer les changements de composition isotopique.



À partir de ce fractionnement isotopique noté  $\alpha$ , on définit la discrimination isotopique notée  $\Delta$  relativement à la composition isotopique de l'échantillon selon l'expression suivante :

$$\Delta = \alpha - 1 \approx \frac{\delta_a - \delta_p}{1 + \delta_p} \quad (2)$$

dans laquelle  $\delta_a$  est la composition isotopique en carbone de la source, le  $\text{CO}_2$  atmosphérique par exemple dans le cas du processus photosynthétique et  $\delta_p$  est la composition isotopique en carbone de l'échantillon (le produit), par exemple la matière organique de la plante dans le cas de la photosynthèse. Comme  $\delta_p$  est très petit, l'expression devient :

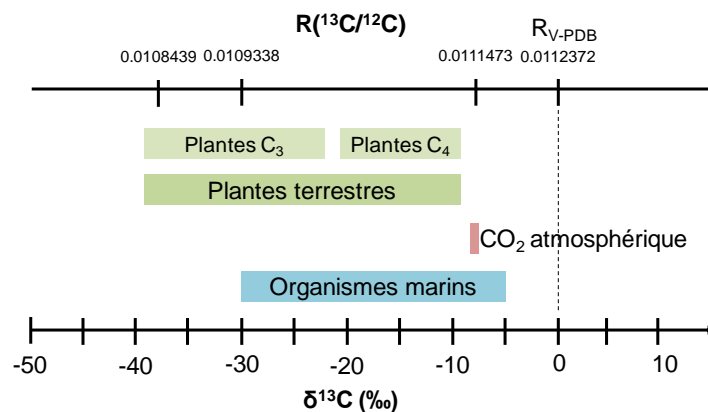
$$\Delta = \alpha - 1 = \delta_a - \delta_p \quad (3)$$

### **2.3 Isotopes stables dans le cycle biogéochimique**

La composition isotopique en carbone varie entre les pools de matière organique (Figure 4). Pour les organismes marins, le rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  varie entre -5 ‰ et -30 ‰ tandis que pour les végétaux, il s'étend de -10 ‰ à -39 ‰. La composition isotopique du  $\text{CO}_2$  atmosphérique est par contre d'environ -8 ‰, ce qui est bien différent des végétaux et varie de plus en plus depuis 1860 en raison de l'augmentation des activités des émissions de carbone fossile.

Les premiers travaux en isotopie sur les végétaux furent initiés par Craig en 1954. Depuis, de nombreux auteurs ont utilisés les isotopes stables pour améliorer nos connaissances en écophysiologie végétale. Notons, par exemple, la distinction entre les plantes en  $\text{C}_3$  et les plantes en  $\text{C}_4$  qui possèdent des signatures isotopiques distinctes. En effet, la matière organique des plantes en  $\text{C}_3$  possède une composition isotopique moyenne de -27 ‰ qui varie entre -21 ‰ et -37 ‰ alors que la composition isotopique de la matière organique des plantes en  $\text{C}_4$  est en moyenne de -11 ‰ comprise entre -9 ‰ et -20 ‰ (Figure 4). Cette distinction de composition isotopique en carbone est due aux différents processus de discrimination isotopique du carbone pendant l'assimilation photosynthétique (Deleens, 1976). Par définition, les plantes en  $\text{C}_3$  sont des plantes dont les produits de la fixation du carbone par la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ou RuBisCO, lors l'assimilation photosynthétique sont des composés à 3 atomes de carbone, 3-phosphoglycérate (APG). 98 % des espèces végétales terrestres notamment les arbres des forêts tempérées font partie des plantes en  $\text{C}_3$ . Par contre, les plantes en  $\text{C}_4$  sont des plantes dont le premier produit de la carboxylation par la Phosphoénol pyruvate carboxylase ou PEPCase est un composé à 4 atomes de carbone, l'acide oxaloacétique. Parmi les plantes en  $\text{C}_4$ , on compte des graminées, le maïs, la canne à sucre, le sorgho etc. La différence de composition isotopique en carbone des plantes en  $\text{C}_3$  et en  $\text{C}_4$  réside dans le fait qu'à concentration atmosphérique ambiante, la RuBisCO discrimine davantage le  $^{13}\text{C}$  que la PEPCase. Cependant, cette différence entre RuBisCO et PEPCase n'est pas la seule cause de différence isotopique entre  $\text{C}_3$  et  $\text{C}_4$ . Un

autre facteur important est que la gaine est étanche et le  $\text{CO}_2$  est piégé dedans et que la discrimination par la RuBisCO est réduite en fonction du taux de fuite de la gaine vers le mésophylle. Enfin, la source de carbone pour la PEPCase est le bicarbonate qui est enrichi en  $^{13}\text{C}$  par rapport au  $\text{CO}_2$  de 9 ‰ environ. Notons, qu'il existe un autre type de plantes intermédiaire entre les plantes  $\text{C}_3$  et les plantes  $\text{C}_4$ , les plantes CAM, Crassulacean Acid Metabolism. Cette différence notable de composition isotopique en carbone entre les types de plante permet par exemple d'étudier les changements floristiques majeurs passés, c'est-à-dire une transition entre plante en  $\text{C}_3$  et plante en  $\text{C}_4$ , en relation avec les changements climatiques et l'activité humaine (Deléens et al., 1976).

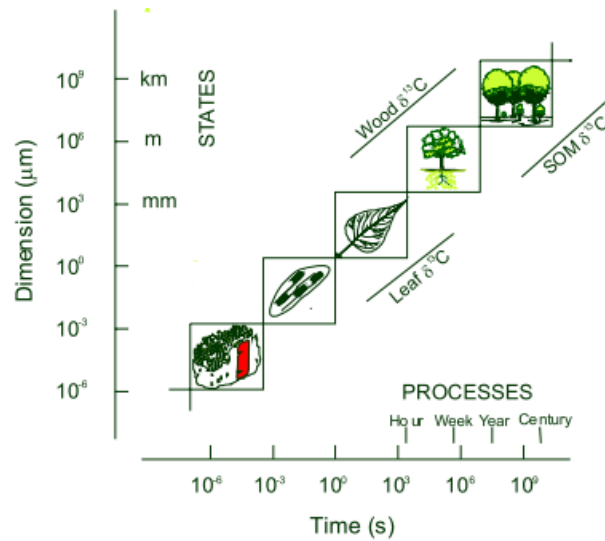


**Figure 4.** Variabilités de la composition isotopique en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de différents composés terrestres exprimée en partie par millier (‰) relativement au standard de référence (V-PDB) (Selon Deléens et al. 1976).

## 2.4 Variabilité de la composition isotopique du carbone de l'écosystème à la plante

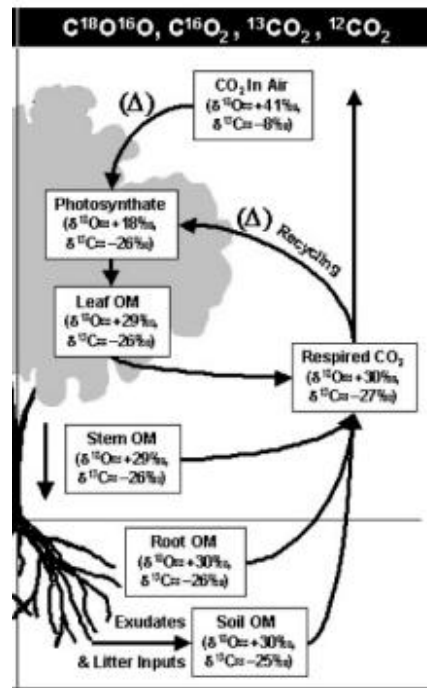
Au sein d'un écosystème, la composition isotopique du carbone varie à l'échelle temporelle et spatiale et d'un compartiment à l'autre. La Figure 5 représente cette variabilité de l'échelle de l'écosystème à l'échelle de la molécule et de l'échelle du siècle à l'échelle de  $10^{-6}$  seconde. Par exemple, l'étude du  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique du sol (SOM) permet d'accéder à l'analyse des processus à l'échelle de plusieurs années. Par opposition, la composition isotopique d'une feuille d'une plante renseignera des processus instantanés se produisant au cours d'une journée sur plusieurs heures. Les cernes des arbres sont d'excellents enregistreurs isotopiques des facteurs et événements climatiques annuels. Il est possible de retranscrire les événements passés datant de plusieurs siècles à partir du  $\delta^{13}\text{C}$  des cernes des arbres. L'étude du déterminisme du  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes constitue une voie de recherche en écologie. L'hypothèse est que la signature isotopique du carbone des cernes serait directement liée à la discrimination isotopique du carbone pendant l'assimilation photosynthétique. Cependant des processus de fractionnement post-photosynthétique envers le carbone-13 pouvant se produire par exemple lors du transfert des métabolites via le phloème, lors de la respiration du  $\text{CO}_2$  ou lors de la synthèse de la cellulose

ont été récemment mis en évidence (Badeck *et al.*, 2005; Cernusak *et al.*, 2009; Gessler *et al.*, 2009).



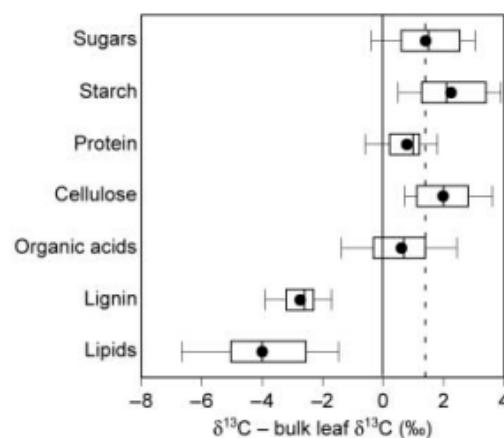
**Figure 5.** Représentation temporelle du siècle à  $10^{-6}$  seconde et spatiale depuis l'échelle de l'écosystème jusqu'à la molécule (en angström, Å) de la composition isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de quelques compartiments (Osmond *et al.*, 1988).

A l'échelle de l'**arbre**, la composition isotopique en carbone diffère selon les compartiments de la plante comme le montre la Figure 6. La composition isotopique en carbone du  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère est d'environ -8 ‰ (Dawson *et al.*, 2002). Par discrimination isotopique pendant l'assimilation photosynthétique, le  $\delta^{13}\text{C}$  des assimilats ou de la matière organique des feuilles est plus négatif que celui de l'atmosphère avec une valeur moyenne de  $\delta^{13}\text{C}$  de -26 ‰. La photosynthèse tend à enrichir l'atmosphère et à appauvrir la matière organique des feuilles (Farquhar *et al.*, 1989). De plus, comme le  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique du tronc et des racines sont identiques au  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique des feuilles, aucun fractionnement lié au transfert des sucres phloémiens dans le tronc n'est supposé dans cette synthèse (Dawson *et al.*, 2002). Cependant des études récentes mettent en avant l'hypothèse d'un fractionnement le long de l'axe principal de l'arbre. La matière organique du sol est aussi légèrement plus enrichie en  $^{13}\text{C}$  que celle des racines avec une valeur d'environ -25 ‰. Le  $\text{CO}_2$  respiré est appauvri en  $^{13}\text{C}$  comparé à la matière organique des feuilles, du tronc et du sol. En opposition à la photosynthèse, la respiration tend à appauvrir l'atmosphère et à enrichir la matière organique en  $^{13}\text{C}$ .



**Figure 6.** Variabilités de la composition isotopique du carbone et de l'oxygène dans le cycle du carbone et de l'eau au sein d'un arbre. Les boîtes représentent les pools et les flèches les processus. Les valeurs sont approximatives et dépendantes de la localisation géographique et de conditions environnementales. Les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  sont exprimées selon V-SMOW et V-PDB pour l'oxygène et le carbone respectivement. (Dawson *et al.*, 2002).

Au sein d'un **compartiment**, la composition isotopique de différents constituants de la plante diffère également. Dans la synthèse récente de Bowling *et al.* (2008), la composition isotopique des constituants de la feuille tels que les sucres, l'amidon, les protéines, la cellulose et les acides organiques, est plus enrichie en  $^{13}\text{C}$  de 1 ‰ à 3 ‰ en comparaison à la matière organique totale de la feuille. D'autres constituants, tels que la lignine et les lipides sont appauvris en  $^{13}\text{C}$  de 2 ‰ à 4 ‰. De plus, le  $\delta^{13}\text{C}$  de l'amidon et la cellulose est en moyenne plus élevé d'environ 2 ‰ que le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres.



**Figure 7.** Récapitulatif des compositions isotopiques en carbone de tous les constituants de la feuille d'une plante  $\text{C}_3$  relativement au  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique totale. La ligne correspond au  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique totale de la feuille et la ligne en pointillé indique le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres (Bowling *et al.*, 2008).

### 3 Les processus de discrimination isotopique du carbone dans l'arbre

#### 3.1 La photosynthèse

Chez les plantes en C<sub>3</sub>, la discrimination isotopique du carbone lors de la photosynthèse notée  $\Delta$ , a été formalisée par Farquhar *et al.* (1982 ; 1989) selon l'expression générale suivante:

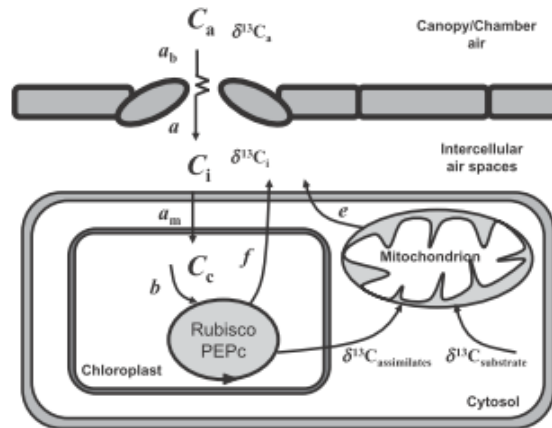
$$\Delta = a_b \cdot \frac{p_a - p_s}{p_a} + a \cdot \frac{p_s - p_i}{p_a} + (e_s + a_1) \cdot \frac{p_i - p_c}{p_a} + b_r \cdot \frac{p_c}{p_a} - \frac{e \cdot R_d}{p_a} - \frac{f \cdot \Gamma^*}{p_a} \quad (4)$$

dans laquelle :

- $p_a$ ,  $p_s$ ,  $p_i$ ,  $p_c$  sont respectivement les pressions partielles en CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère, dans la couche limite de la feuille, les espaces intercellulaires et au niveau des sites de carboxylation,
- $a_b$  est la discrimination isotopique correspondant à la diffusion du carbone à travers la couche limite ( $a_b = 2,9 \text{ ‰}$ ) (Farquhar, 1983),
- $a$  est la discrimination isotopique lors de la diffusion en phase gazeuse du CO<sub>2</sub> à travers le stomate ( $a = 4,4 \text{ ‰}$ ) (Craig, 1954),
- $e_s$  est la discrimination isotopique lors de la dissolution du CO<sub>2</sub> ( $e_s = 1,1 \text{ ‰}$ ) (O'Leary, 1984),
- $a_1$  est la discrimination isotopique lors diffusion du CO<sub>2</sub> en phase aqueuse ( $a_1 = 0,7 \text{ ‰}$ ) (O'Leary *et al.*, 1984),
- $b_r$  est la discrimination isotopique par l'enzyme ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase ou RubisCO ( $b_r = 29 \text{ ‰}$ )(Farquhar *et al.*, 1989),
- $k$  est l'efficacité de la carboxylation,
- $R_d$  est la respiration mitochondriale à la lumière,
- $e$  est la discrimination isotopique correspondante à la respiration mitochondriale à la lumière,
- $f$  est la discrimination isotopique lors de la photorespiration ( $f \sim 8 \text{ ‰}$ ) (Gillon *et al.*, 1997)
- $\Gamma^*$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) est le point de compensation pour le CO<sub>2</sub> en l'absence de respiration mitochondriale.

En négligeant certains processus tels que la diffusion dans la couche limite (premier terme de l'équation nul), le mésophylle (troisième terme nul car  $p_i = p_c$ ), la respiration mitochondriale (cinquième terme nul) et la photorespiration (sixième terme nul), la discrimination du carbone est donc simplifiée à deux étapes discriminantes majeures : la diffusion du CO<sub>2</sub> à travers les stomates ( $a = 4.4 \text{ ‰}$ ) et la carboxylation du CO<sub>2</sub> par le RubisCO ( $b = 27 - 29 \text{ ‰}$ ). L'expression (4) devient par conséquent :

$$\Delta = a \cdot \frac{p_a - p_i}{p_a} + b \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (5)$$



**Figure 8.** Schéma conceptuel des processus mésophylliens d'échange de CO<sub>2</sub> (Wingate *et al.*, 2007)

Ainsi l'expression simplifiée du modèle de discrimination isotopique du carbone est décrite par l'expression suivante (Farquhar *et al.*, 1982):

$$\Delta = a + (b - a) \cdot \frac{p_i}{p_a} \quad (6)$$

Par conséquent, la discrimination isotopique est directement reliée au rapport des pressions partielles en CO<sub>2</sub> dans les espaces intercellulaires et dans l'atmosphère ou par analogie au rapport des concentrations en CO<sub>2</sub> (ppm) au niveau des sites de carboxylation et de l'air extérieur ( $C_i/C_a$ ) (Farquhar *et al.*, 1982; Farquhar *et al.*, 1989). Cette concentration interne en CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) peut être exprimée en fonction du taux d'assimilation, A ( $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et de la conductance stomatique,  $g_s$  ( $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ):

$$A = \frac{g_s}{1.6} \cdot C_a \cdot \left(1 - \frac{C_i}{C_a}\right) \quad (7)$$

Dans laquelle la valeur de 1,6 correspond au rapport de la conductance stomatique de diffusion de la vapeur d'eau,  $g_s$  à la conductance stomatique pour le CO<sub>2</sub>,  $g_c$ .

L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE ou Water use Efficiency) peut être exprimée selon plusieurs échelles spatiales et temporelles. Elle est soit exprimée à l'échelle de la plante entière et intégrée dans le temps : elle correspond au rapport de la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau transpirée intégrée à la saison de végétation ; soit exprimée à l'échelle foliaire et instantanée en  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  et correspond donc au rapport de l'assimilation (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) sur la transpiration (E,  $\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ):

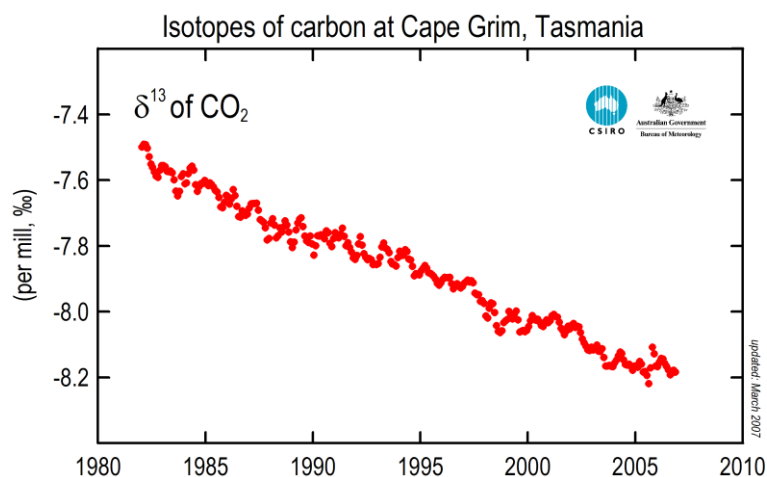
$$\text{WUE} = \frac{A}{E} = \frac{A}{g_s} \cdot \frac{1}{W_i - W_a} = \frac{1}{1.6} \cdot \frac{(C_a - C_i)}{(W_i - W_a)} \quad (8)$$

dans laquelle  $W_a$  et  $W_i$  sont respectivement les fractions molaires de vapeur d'eau dans l'atmosphère et dans les espaces intercellulaires.

On appelle aussi « efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau » ( $WUE_i$ ) le rapport ( $A/g_s$ ) :

$$WUE_i = \frac{A}{g_s} = \frac{(C_a - C_i)}{1.6} \quad (9)$$

D'autre part, afin de calculer la discrimination isotopique  $\Delta$  lors de la photosynthèse à partir de la mesure de la composition isotopique de la matière organique de la plante  $\delta_p$ , la composition isotopique de la source, c'est-à-dire le  $CO_2$  atmosphérique,  $\delta_a$  est comprise entre -6,4 ‰ et -7 ‰ en l'absence d'activité industrielle (O'Leary, 1981). Cependant, depuis l'augmentation de la concentration du  $CO_2$  dans l'atmosphère, la composition isotopique a diminué pour atteindre la valeur de -8 ‰ (Keeling *et al.*, 1979; Marino *et al.*, 1991). La Figure 9 montre la diminution de la composition isotopique du  $CO_2$  atmosphérique de 1980 à 2010 pour le site de Cape Grim en Tasmanie. Il est donc préférable d'utiliser une valeur de composition isotopique du  $CO_2$  atmosphérique mesurée pour les études physiologiques et dendroclimatiques au lieu de prendre la valeur pré-industrielle.



**Figure 9.** Evolution de la composition isotopique du  $CO_2$  atmosphérique en Tasmanie entre 1980 et 2010 (www.cmar.csiro.au)

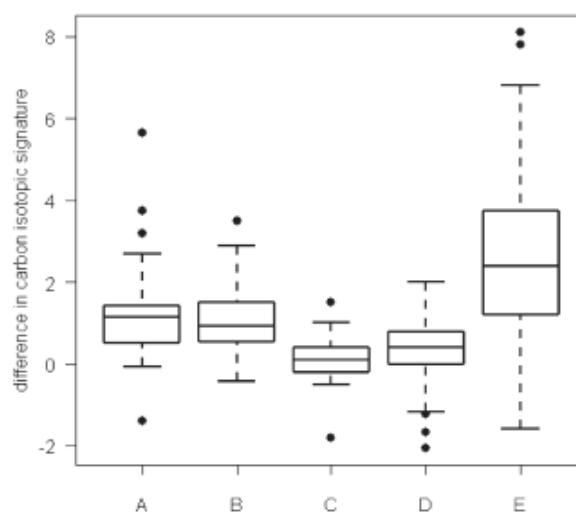
La discrimination isotopique du carbone assimilé par les plantes en  $C_3$  varie en fonction de paramètres climatiques et physiologiques : l'humidité de l'air (Edwards *et al.*, 2000), l'humidité du sol, les précipitations (Saurer *et al.*, 1995), la radiation (Ehleringer *et al.*, 1986; Livingston *et al.*, 1998; Ponton *et al.*, 2002), la capacité photosynthétique, la température (Edwards *et al.*, 2000; Gagen *et al.*, 2007), le déficit hydrique de l'air ou VPD (Ferrio *et al.*, 2005) (Klein *et al.*, 2005), la teneur en azote foliaire (Livingston *et al.*, 1998) et la réserve en eau du sol (Dupouey *et al.*, 1993) (Leavitt *et al.*, 1993; Saurer *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 2005).

## 3.2 Les processus post-photosynthétiques

### 3.2.1 Pourquoi étudier les processus après-photosynthèse?

Des études sur la composition isotopique du carbone des nouveaux tissus synthétisés pendant la saison de croissance montrent que le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose ou du bois total varie considérablement dans le temps en fonction de différents paramètres climatiques et physiologiques. On considère que les substrats directs de la synthèse du bois sont les sucres présents dans un pool phloémien. Ce pool est composé des sucres nouvellement assimilés pendant la photosynthèse qui sont donc appauvris en  $^{13}\text{C}$  en comparaison du  $\text{CO}_2$  atmosphérique et des sucres présents et stockés dans le phloème. La variation du profil isotopique des cernes ne pourra s'expliquer qu'en prenant en compte les potentiels fractionnements isotopiques se produisant en aval du processus photosynthétique et que l'on nomme pour cette raison **fractionnement post-photosynthétique**.

L'étude des processus de fractionnement post-photosynthétique se produisant par exemple lors du transfert des métabolites depuis les feuilles jusqu'en bas du tronc via le phloème, lors la synthèse de la cellulose ou lors la respiration du  $\text{CO}_2$  est un sujet de recherche en plein essor et pour lequel peu de résultats sont disponibles. Plusieurs études ont démontré que les tissus hétérotrophes d'une plante étaient enrichis en  $^{13}\text{C}$  en comparaison avec les tissus autotrophes (Badeck *et al.*, 2005; Cernusak *et al.*, 2009). Les tissus hétérotrophes sont en moyenne enrichis en  $^{13}\text{C}$  de 1,26 ‰ en comparaison des feuilles (Badeck *et al.*, 2005) (Figure 10). Dans le cas des arbres ligneux, cette différence varie fortement entre les espèces d'un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  des tiges ligneuses d'environ 8 ‰ à un appauvrissement en  $^{13}\text{C}$  des tiges ligneuses d'environ 2 ‰ en comparaison des feuilles.

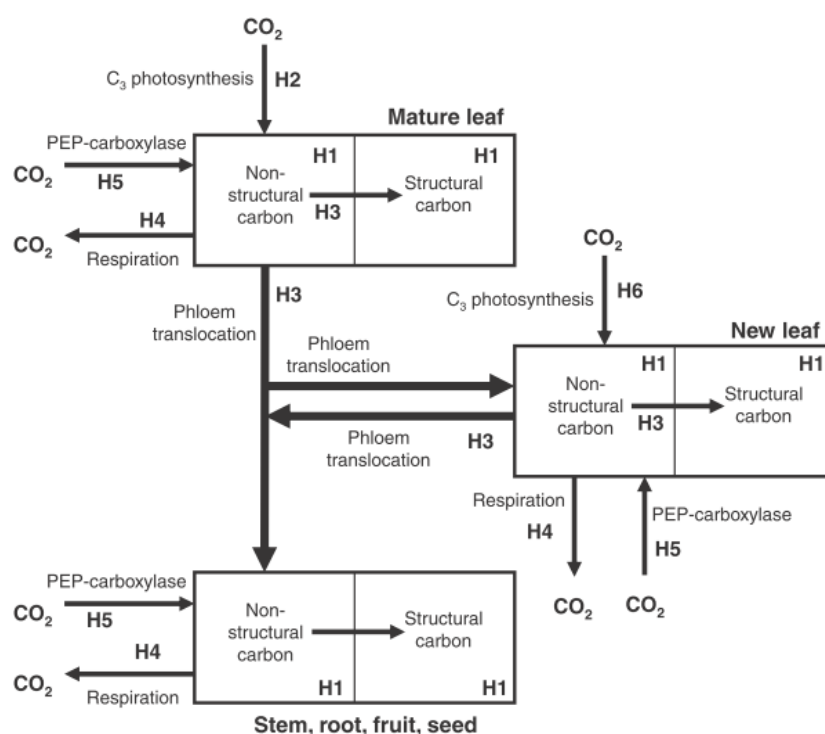


**Figure 10.** Différences entre  $\delta^{13}\text{C}$  de différents constituants de la plante (boxplot): A) souterrain – aérien, B) racines – feuilles pour les plantes  $\text{C}_3$ , C) racines – feuilles pour les plantes  $\text{C}_4$ , D) tiges non ligneuses - feuilles et E) tiges ligneuses - feuilles. (Badeck *et al.*, 2005)



Six hypothèses, notées de H<sub>1</sub> à H<sub>6</sub> dans la représentation schématique ci-dessous (Figure 11) ont été avancées afin d'expliquer cet enrichissement des tissus hétérotrophes (Cernusak *et al.*, 2009). L'hypothèse H<sub>1</sub> suppose qu'il se produirait une différence de composition liée à une variation de la composition biochimique des tissus autotrophes (les feuilles) et des tissus hétérotrophes (les branches, le tronc, les racines). L'hypothèse H<sub>2</sub> suppose que les tissus auto- et hétérotrophes sont synthétisés à des périodes différentes de la saison de croissance ce qui provoquerait une différence de discrimination isotopique. L'hypothèse H<sub>3</sub> présume un cycle diurne du  $\delta^{13}\text{C}$  des substrats de la croissance (le saccharose formé des deux oses : fructose et glucose, lui-même produit de la cellulose du bois). L'hypothèse H<sub>4</sub> traite du fractionnement pendant la respiration tandis que l'hypothèse H<sub>5</sub> suppose que la fixation de carbone atmosphérique par l'enzyme PEP carboxylase dans les tissus hétérotrophes. Pour finir, la dernière hypothèse H<sub>6</sub> suppose une différence de discrimination isotopique dépendant de l'âge des feuilles (jeunes vs. matures). Il apparaît que toutes ses hypothèses pourraient plus ou moins contribuer à expliquer l'enrichissement des tissus hétérotrophes par rapport aux tissus autotrophes. Les hypothèses concernant la respiration des feuilles et des racines ont été beaucoup étudiées et donc confirmées ; cependant certaines restent encore à tester pour être approuvées.

Les processus de fractionnement post-photosynthétiques sont des processus très complexes qui sont en cours de recherche. Dans la suite de cette synthèse bibliographique, les principaux processus post-photosynthétique pouvant conduire à un fractionnement isotopique du carbone sont présentés et illustrés par des résultats de recherches récemment publiées.



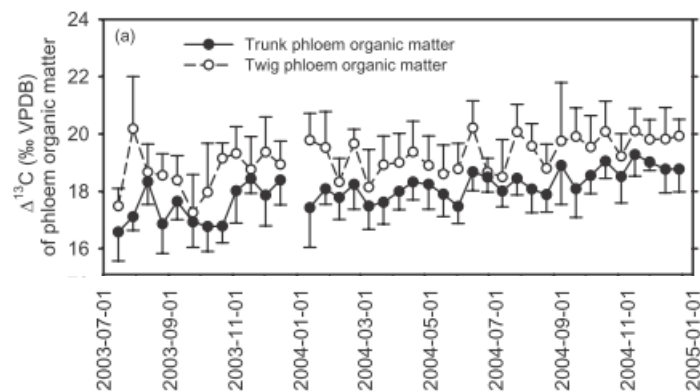
**Figure 11.** Représentation simplifiée des flux de carbone dans les plantes en C<sub>3</sub> et des hypothèses pouvant justifier l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  des tissus hétérotrophes en comparaison des tissus autotrophes. Voici un

résumé : H1, composition biochimique variable ; H2, séparation saisonnière de la croissance ; H3, utilisation du saccharose jour vs. nuit ; H4, fractionnement respiratoire ; H5, fixation de carbone par la PEP carboxylase et H6, variation de la discrimination photosynthétique contre le  $^{13}\text{C}$  (Cernusak *et al.*, 2009).

### 3.2.2 Les sucres phloémiens

Pendant le transfert des sucres phloémiens depuis leur synthèse au niveau des feuilles jusque dans le tronc via le phloème où ils seront utilisés pour la croissance ou la maintenance des tissus, Damesin et Lelarge (2003) supposent un fractionnement isotopique. Cependant, Gessler *et al.* (2004) et Badeck *et al.* (2005) n'ont pu démontrer de fractionnement lors du transport des sucres phloémiens.

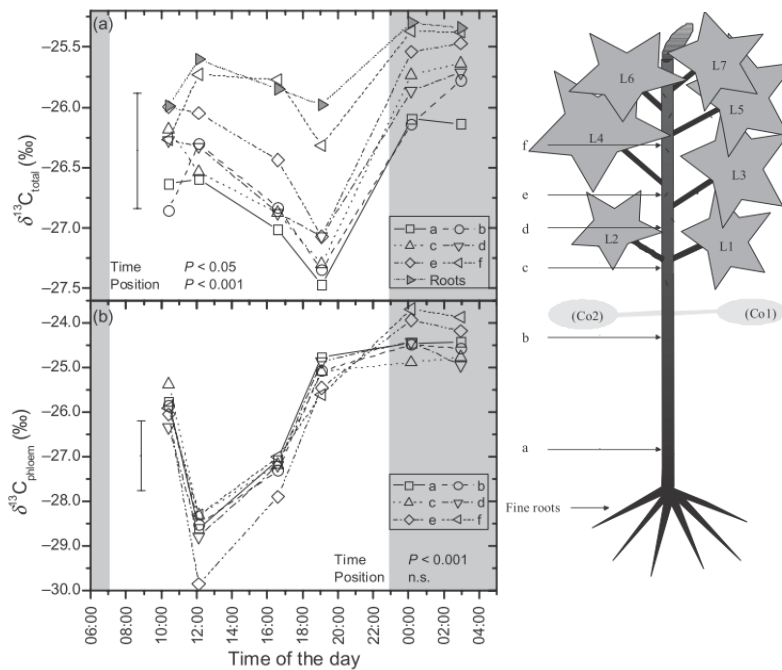
Brandes *et al.* (2007) ont démontré un fractionnement isotopique la matière organique du phloème entre les rameaux et le tronc à travers une étude sur la variation journalière de la composition isotopique de la matière organique du phloème à deux niveaux, les rameaux et le tronc. La Figure 12 montre que la matière organique du tronc est enrichie en  $^{13}\text{C}$  en comparaison à la matière organique des tiges.



**Figure 12.** Évolution de la composition isotopique en carbone de la matière organique phloémienne au niveau des rameaux et du tronc d'arbre (Brandes *et al.*, 2007)

Gessler *et al.* (2008) ont confirmé que la composition isotopique du carbone de la matière organique totale du tronc de ricin et de la sève phloémienne varie de -24 ‰ à -30 ‰ en fonction de l'heure (Figure 13a). En observant le  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique totale, on constate que le bas du tronc est plus appauvri en  $^{13}\text{C}$  que le haut du tronc. Cependant, le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens le long de l'axe principal ne semble pas varier et n'indique pas de fractionnement isotopique du transfert phloémien en lui-même (Figure 13b). On remarque que le  $\delta^{13}\text{C}$  en milieu de journée est plus appauvri en  $^{13}\text{C}$  que pendant la nuit d'environ 6 ‰. L'explication donnée pour cette cinétique diurne serait liée au cycle diurne de l'amidon, c'est-à-dire à l'accumulation et la remobilisation de l'amidon dans le phloème. Les réserves, principalement l'amidon, subissent en effet un fractionnement lors de leur biosynthèse et sont enrichies en  $^{13}\text{C}$  (Brugnoli *et al.*, 1988). La remobilisation de l'amidon dans le phloème pourrait alors entraîner un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  du pool de sucres. De plus, son utilisation

comme substrat pour la respiration du tronc et pour la synthèse du cerne pourrait alors provoquer un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré et du bois synthétisé.



**Figure 13.** Cinétique diurne de (a) la matière organique totale du tronc et (b) de la sève phloémienne le long de l'axe principal, le tronc de ricin (a à f). (Gessler *et al.*, 2008)

### 3.2.3 La respiration au niveau du tronc

De nombreuses études sur la respiration des feuilles des plantes  $\text{C}_3$  présentent un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré relativement à la matière organique totale ou aux substrats putatifs de la respiration (Duranceau *et al.*, 1999; Duranceau *et al.*, 2001; Ghashghaie *et al.*, 2001; Tcherkez *et al.*, 2003; Ocheltree *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Hymus *et al.*, 2005; Klumpp *et al.*, 2005; Prater *et al.*, 2006; Barbour *et al.*, 2007; Bathellier *et al.*, 2008; Bathellier *et al.*, 2009). Tcherkez *et al.* (2003) présentent différentes hypothèses pouvant justifier un fractionnement isotopique lors de la respiration au niveau des feuilles à l'obscurité (enrichissement en  $^{13}\text{C}$ ): (i) un fractionnement de fragmentation en raison de l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  des positions 3 et 4 du glucose (Rossmann *et al.*, 1991) qui conduit à la libération du  $\text{CO}_2$  enrichi lors de la réaction de décarboxylation par la pyruvate déshydrogénase pendant la glycolyse, (ii) la prévalence du mécanisme « pentose phosphate » and (iii) l'activité de l'enzyme PEP carboxylase (Figure 15).

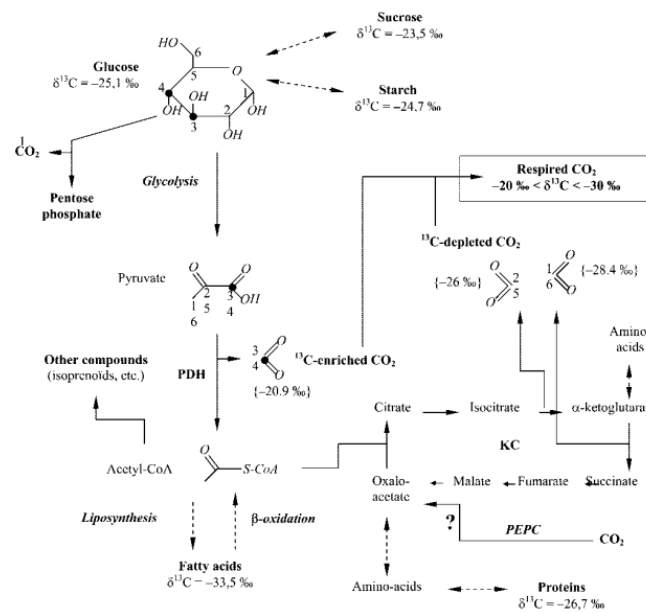


Figure 14. Mécanisme de respiration (Tcherkez *et al.*, 2003)

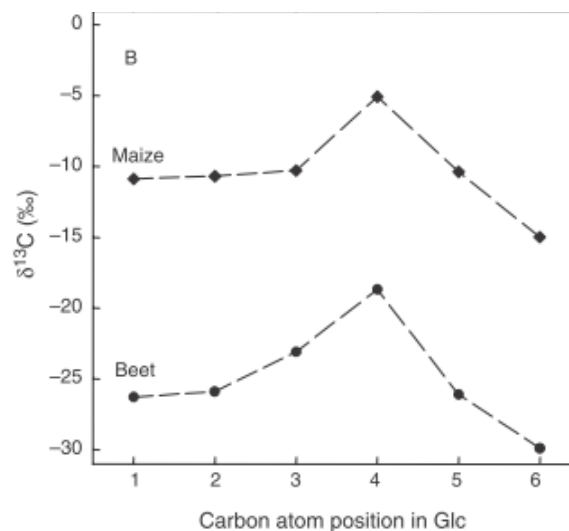


Figure 15. Répartition du  $\delta^{13}\text{C}$  de chaque carbone du glucose selon leur position pour le maïs et la betterave (Tcherkez *et al.*, 2004 ; Rossmann *et al.*, 1991)

D'autres tissus que les feuilles, une discrimination isotopique lors de la respiration a été également démontrée pour des tissus hétérotrophes des herbacées (Klump *et al.*, 2005; Bathellier *et al.*, 2008; Bathellier *et al.*, 2009) et des arbres (Damesin & Lelage, 2003). Par exemple, (Bathellier *et al.*, 2008) montrent une divergence du  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré à la transition entre le stade autotrophe et hétérotrophe. Le  $\text{CO}_2$  libéré par les racines est appauvri en  $^{13}\text{C}$  alors que le  $\text{CO}_2$  libéré par les feuilles est enrichi en  $^{13}\text{C}$ .

Les recherches sur la discrimination liées à la respiration au niveau du compartiment ligneux principal, le tronc, sont encore récentes. Actuellement, peu de résultats sont donc publiés alors que ce compartiment constitue une composante majeure de la respiration de l'écosystème, soit un part d'un sixième selon Damesin *et al.* (2002). Comprendre le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré par le

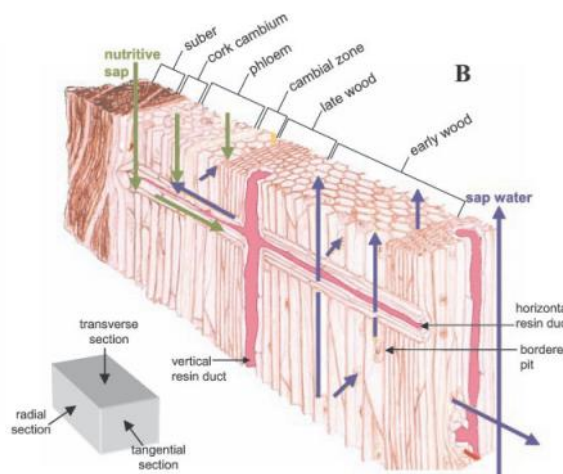
tronc permettrait de mieux comprendre le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré par l'écosystème. (Maunoury *et al.*, 2007) présentent des résultats de  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré au niveau du tronc sur plusieurs échelles temporelles : diurne, journalière et saisonnière. Notamment, le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré par le tronc est enrichi en  $^{13}\text{C}$  par rapport à la matière organique totale. La respiration du tronc serait donc accompagnée d'un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  comme le montrent également (Brandes *et al.*, 2006; Kodama *et al.*, 2008).

### 3.2.4 La formation du bois

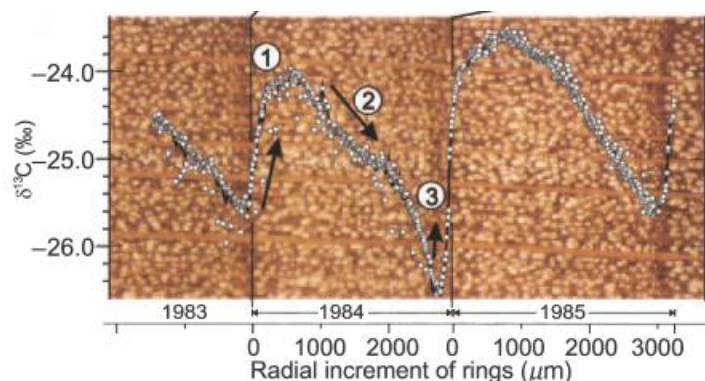
L'étude de la composition isotopique de la matière organique permet de comprendre le fonctionnement de l'arbre sur une échelle de temps large. D'une part, si on considère le  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique des feuilles, le  $\delta^{13}\text{C}$  renseignera sur l'activité photosynthétique au cours de la synthèse des tissus intégrée sur quelques jours ou quelques mois. D'autre part, si on s'intéresse au  $\delta^{13}\text{C}$  des cernes annuels des arbres, le signal isotopique nous renseignera sur les conditions climatiques et le fonctionnement de l'arbre pendant sa croissance (Bert *et al.*, 1997; Saurer *et al.*, 1997; Barbour *et al.*, 2002; Helle *et al.*, 2004; McCarroll *et al.*, 2004; Treydte *et al.*, 2006).

La Figure 16 présente les différentes parties d'un tronc de pin maritime : l'écorce, le phloème, le cambium et le bois ainsi que les flux de sève élaborée et brute correspondants qui permettent l'utilisation des sucres phloémiens pour la formation des nouveaux tissus. Le cerne se forme selon 4 étapes : la division cellulaire, l'expansion des cellules (allongement et élargissement radial), épaissement de la paroi cellulaire (impliquant la cellulose, l'hémicellulose, les protéines de la paroi cellulaire et la biosynthèse et le dépôt de la lignine) et la mort cellulaire programmée (Plomion *et al.*, 2001).

La composition isotopique des cernes annuels est étudiée à différentes échelles : l'échelle inter-annuelle (entre les années) ou l'échelle intra-annuelle (au cours d'une année). Par exemple, l'étude de la dynamique intra-annuelle du  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique totale des cernes à très haute résolution sur des hêtres est présentée en Figure 17. Trois phases distinctes sont observées et supposées être pilotées par les mécanismes d'utilisation des sucres nouvellement assimilés et la mobilisation des réserves dans le pool de sucres lors de la synthèse du bois (Helle & Schleser., 2004). Skomarkova *et al.* (2006) montrent également des dynamiques de  $\delta^{13}\text{C}$  de cernes liées aux processus d'allocation et de stockage des réserves. Cependant, d'autres études montrent que les variations de  $\delta^{13}\text{C}$  au sein du cerne peuvent être expliquées par d'autres processus physiologiques tels que les échanges gazeux d'eau et de  $\text{CO}_2$  à l'échelle de la feuille (Barbour *et al.*, 2002), (Klein *et al.*, 2005). De plus, le  $\delta^{13}\text{C}$  varie en relation avec les conditions environnementales telles que la réserve en eau du sol (Leavitt *et al.*, 1993a).



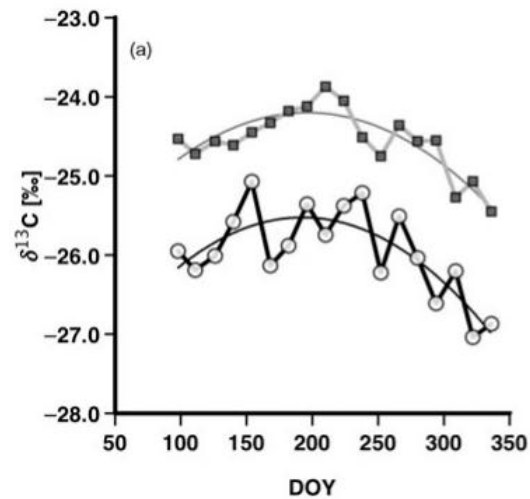
**Figure 16.** Schéma en trois dimensions d'une section radiale de tronc de Pin maritime (Plomion *et al.*, 2001)



**Figure 17.** Profil de variation du  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique totale de trois cerne de hêtres (*Fagus sylvatica*) à haute résolution (Helle *et al.*, 2004)

Des études sur la composition isotopique d'autres composés du bois ont également montré que la composition de la lignine est appauvrie en  $^{13}\text{C}$  par rapport à la matière organique totale de 1 - 4 ‰ (Wilson *et al.*, 1977) (Eglin *et al.*, 2009), et que les lipides sont aussi appauvris en  $^{13}\text{C}$  par rapport à la matière organique totale de 3 - 8 ‰ (Park *et al.*, 1961).

Récemment, une comparaison des signatures isotopiques des substrats de la synthèse du cerne, les sucres phloémiens, et de la matière organique totale du cerne a montré un enrichissement du bois par rapport aux substrats de 1,4 ‰ (Figure 18) (Gessler *et al.*, 2009). Par conséquent, la synthèse du bois serait accompagnée d'un fractionnement isotopique. Cependant, Cernusak *et al.* (2005) démontrent le contraire, c'est à dire aucun fractionnement isotopique lors de la formation du bois puisque le  $\delta^{13}\text{C}$  des nouveaux tissus synthétisés est égal au  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres de la sève phloémienne.



**Figure 18.** Dynamique annuelle de la composition isotopique des sucres phloémiens (cercles) et de la cellulose (carrés) (Gessler *et al.*, 2009)

Les études portant sur les processus de fractionnement isotopique se produisant après photosynthèse, c'est-à-dire les processus post-photosynthétiques sont récentes. Elles montrent par conséquent des résultats souvent contradictoires qui manquent d'explications claires et généralisables. L'objectif de la thèse qui est menée sur cette thématique est détaillé dans la partie suivante.

## 4 Objectif de thèse

L'objectif principal de la thèse est de comprendre le fonctionnement du cycle des isotopes du carbone, carbone-12 et carbone-13 dans l'arbre et au niveau de son axe principal : le tronc. La démarche générale est de déterminer la composition isotopique en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) des principales phases du cycle du carbone : (1) les sucres phloémiens, source de carbone des différents processus intervenant dans le tronc, (2) le  $\text{CO}_2$  respiré échangé avec l'atmosphère et (3) la cellulose accumulée par incrémentation dans le xylème ainsi que leurs variabilités temporelles. Les recherches antérieures sur l'analyse de la composition isotopique du carbone ont montré la variabilité du  $\delta^{13}\text{C}$  des cernes annuels, l'ont décomposée entre le bois initial (ou de printemps) et le bois final (ou d'été) et ont proposé un modèle simple expliquant les variations du  $\delta^{13}\text{C}$  intra-cerne pour la période 1997-1998 (Nguyen-Queyrens *et al.*, 1998; Porte *et al.*, 2001; Hemming *et al.*, 2005; Ogée *et al.*, 2009). Cette variabilité a été directement reliée à la discrimination isotopique ( $\Delta$ ) se produisant lors de la l'assimilation photosynthétique au niveau des feuilles et par conséquent aux conditions climatiques environnantes. Le modèle classique de discrimination photosynthétique proposé par Farquhar *et al.* en (1982), démontre en effet que la fermeture stomatique induite par un stress hydrique tel qu'une sécheresse, provoque un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  de sucres assimilés et par conséquent un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  des cernes nouvellement synthétisés. Ce modèle est cependant remis en question.

En effet, des processus de fractionnement isotopique se produisant après la photosynthèse ont été récemment révélés. Ces processus post-photosynthétiques peuvent avoir par exemple lieu lors du transfert des sucres phloémiens depuis leur assimilation jusqu'à leur utilisation pour la maintenance des tissus lors de la respiration du tronc ou lors de la synthèse de la cellulose des cernes annuels. Il est par exemple montré que la respiration au niveau du tronc est enrichie en  $^{13}\text{C}$  en comparaison avec les substrats de la respiration, les sucres phloémiens (Brandes *et al.*, 2006; Maunoury *et al.*, 2007; Kodama *et al.*, 2008). Cependant, ce fractionnement isotopique ne semble pas en accord avec l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  du cerne annuel en comparaison avec le même substrat observé (Gessler *et al.*, 2009). Par opposition, Cernusak *et al.* (2005) ne démontrent aucun fractionnement isotopique lors de la synthèse de la cellulose. De plus, certains auteurs supposent un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens lors de leur acheminement depuis les feuilles vers les organes hétérotrophes (Damesin *et al.*, 2003; Brandes *et al.*, 2007) et pour d'autre, aucun fractionnement pendant ce processus n'existerait (Gessler *et al.*, 2004). Compte tenu des hétérogénéités des résultats obtenus et par conséquent des oppositions dans les différentes hypothèses pouvant expliquer leurs résultats, les processus de fractionnement post-photosynthétique ont besoin d'être clarifiés. De plus, dans le cas des études sur grands arbres, pour lesquels la distance de transfert des sucres phloémiens depuis la canopée jusqu'à la base du tronc est bien plus importante, la durée de



transfert feuille-cerne, mal connue, pourrait excéder quelques journées et doit donc également être pris en compte.

Pendant la thèse, on cherche donc à répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens, du  $\text{CO}_2$  « respiré » au niveau du tronc et de la cellulose des cernes annuels varient dans le temps, au cours de l'année et pendant la période de croissance du bois ?
- Est-ce que le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  « respiré » par le tronc est égal au  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens, substrat de la respiration ? De même, est ce que le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose déposée dans le cerne annuel est égal au  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens, également substrat de la formation du bois ? Par conséquent, existe-t-il des processus post-photosynthétiques de fractionnement isotopique du carbone lors de la respiration du tronc et la formation de nouveaux tissus ?
- Est-ce que le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes annuels est différent selon le site étudié, sec ou humide et le régime hydrique de l'année étudiée, sèche ou humide ? Est-ce que le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose varie de façon récurrente d'une année à l'autre et d'un site à l'autre ?

Pour répondre à ces questions, notre démarche s'est basée sur l'établissement d'un bilan de masse isotopique simple et partiel du carbone au niveau de l'axe principal de l'arbre, le tronc. Ce bilan est représenté comme un ensemble de compartiments et de flux qui sont (1) le pool de sucres phloémiens, (2) le  $\text{CO}_2$  respiré au niveau du tronc et (3) les composés impliqués dans les structures tissulaires pérennes, parmi lesquels nous avons privilégié la cellulose des cernes annuels du tronc. Notre approche se décompose en deux phases.

Premièrement une analyse détaillée de la composition isotopique des compartiments et flux impliqués au niveau du tronc de pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) et sa variation temporelle a été réalisée. Elle est basée sur un suivi expérimental in situ impliquant des mesures des isoflux échangés par le tronc et des variations temporelles de la composition isotopique du pool de sucres phloémiens et de la cellulose déposée dans les cernes annuels. Ce volet de notre approche a consisté à caractériser ces variations temporelles en conditions naturelles en présupposant qu'un suivi de deux années permettrait de capturer les effets d'événements climatiques comme les sécheresses. Nous attendions notamment de ce suivi un ensemble de résultats permettant de vérifier ou infirmer l'existence de processus discriminatoires post-photosynthétiques (Figure 19). Cette mesure conjointe des  $\delta^{13}\text{C}$  des ces trois compartiments a nécessité d'importantes mises au point méthodologiques, comme la méthode d'extraction des sucres phloémiens ou la mesure des isoflux  $^{12}\text{CO}_2$  et  $^{13}\text{CO}_2$  par un spectromètre à diode laser modulable (TDLAS). Ce suivi a été réalisé sur le site « Le Bray », site du projet Carboeurope pour lequel un suivi intensif des variables physiologiques et environnementales est réalisé depuis 1987.

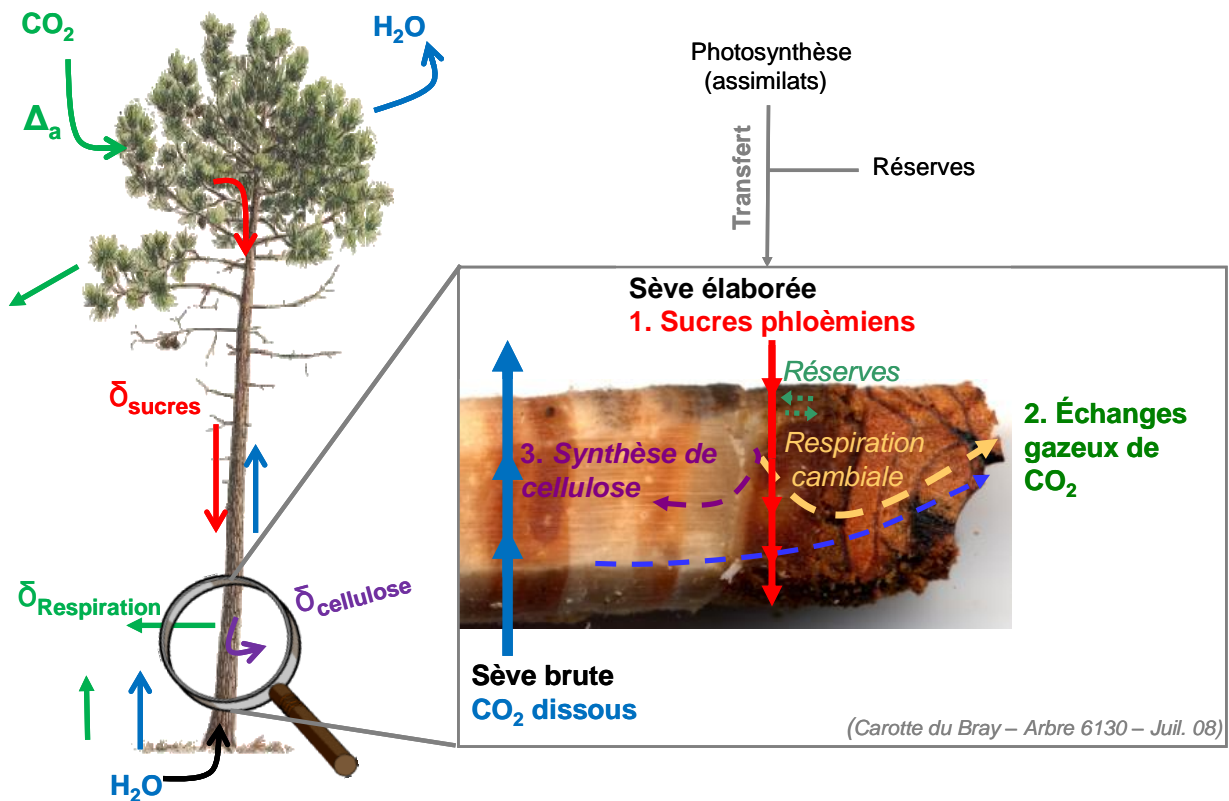


Figure 19. Schématisation des différents flux d'éléments ( $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ) et des processus de fonctionnement d'un pin maritime depuis la photosynthèse jusqu'à l'utilisation des sucres phloémiens pour la respiration ou la synthèse de la cellulose déposée dans les cernes annuels.

La deuxième phase de notre approche consistait à vérifier les hypothèses proposées par l'analyse du  $\delta^{13}\text{C}$  des cernes annuels de pins maritimes à différentes résolutions temporelles (sections radiales de cerne de 100 à 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) et pour un ensemble de conditions hydriques stationnelles contrastées en comparant des stations de type « lande sèche » où la nappe phréatique est profonde de plusieurs mètres sous le sol et des stations de type « lande humide » comme le site du Bray où la nappe fluctue entre 1.6 m en été et 0 m en hiver et demeure présente dans la zone racinaire une grande partie de l'année. Ces analyses de  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes annuels ont donc été étendues à un second site « Vielle Soubiran ». Ces deux sites, « Le Bray » et « Vielle Soubiran » ont été choisis car ils représentent bien les deux extrêmes stationnels des Landes de Gascogne. L'hypothèse à vérifier était ici que les conditions sèches rencontrées à « Vielle Soubiran » sont à l'origine de stress hydriques plus fréquents et plus sévères et devraient se marquer par des valeurs moins négatives de  $\delta^{13}\text{C}$  et avec de plus fortes amplitudes intra-cernes.

Le manuscrit de thèse est organisé de la façon suivante (Figure 20) :

- Après un premier chapitre introductif vient un second chapitre, **Matériel et méthodes**, dans lequel sont détaillées les différentes mesures accomplies durant la thèse qui seront ensuite reprises plus brièvement dans les articles.
- Le troisième chapitre concerne la composition isotopique du **pool de sucres phloémiens (1)** qui constitue le substrat de la synthèse des cernes. Les variations horaires, journalières et mensuelles de la concentration en sucres totaux et de la composition isotopique des sucres phloémiens sont caractérisées. Ce chapitre comporte un volet méthodologique concernant l'extraction des sucres du phloème selon deux techniques différentes que l'on compare : l'une était souvent utilisée (l'exsudation) et l'autre a été finalisée au cours de la thèse (la centrifugation).

Ce second chapitre est introduit sous forme d'un article publié dans RCMS (*Rapid Communications in Mass Spectrometry*) en 2009 (Devaux *et al.*, 2009).

- Le quatrième chapitre aborde les différences de composition isotopique entre le pool de sucres phloémiens, le CO<sub>2</sub> émis par la « respiration » du tronc et la cellulose mise en place dans le xylème ainsi que leurs variations saisonnières respectives. Cette partie s'attache à proposer un **bilan de masse isotopique du tronc (2)**

Ce quatrième chapitre est constitué d'un article en premier auteur soumis à la revue *New Phytologist* et d'un deuxième article (2) en co-auteur proposé également pour publication à la même revue (Wingate *et al.* texte intégral du manuscrit en annexe 3)

- Le dernier chapitre est une analyse des variations inter-sites, inter-annuelles et intra-annuelles de la **composition isotopique des cernes annuels (3)**. Pour cela, les profils radiaux à haute résolution de la composition isotopique de la cellulose des cernes annuels de 3 sites différents sont comparés en fonction de l'année. (Devaux *et al.* en préparation).

Le schéma conceptuel de la Figure 20 rend compte de l'étude menée sur les différents compartiments du tronc ; les numéros (de 1 à 3) correspondent aux différentes parties de la thèse précédemment détaillées en articles.

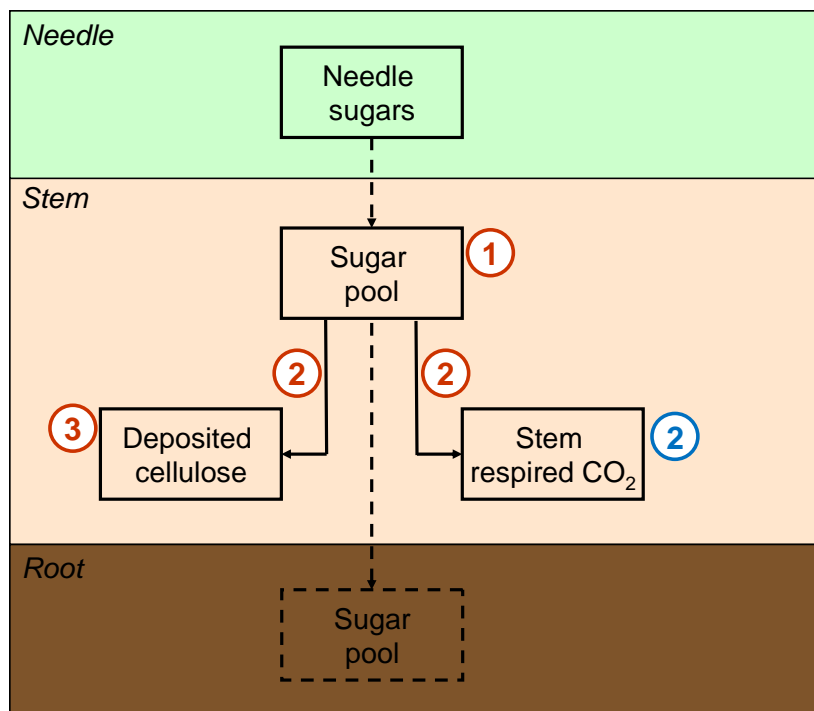


Figure 20. Schéma conceptuel de la thèse. Les numéros de 1 à 3 (rouge) correspondent aux différents chapitres de la thèse. Le numéro 2 (en bleu) correspond à un article en co-auteur (Annexe 3) qui vient en complément du chapitre 2.

# Matériel et Méthodes



# 1 Les sites expérimentaux

## 1.1 Les Landes de Gascogne

La pinède landaise est une forêt artificielle implantée au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle dans le Sud Ouest de la France. Son implantation avait pour but d'assainir la lande marécageuse et de fixer les dunes mobiles du littoral. Sa surface est estimée à près d'un million d'hectares dont 80% sont constitués de pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.). Elle répartie sur trois départements : la Gironde (Médoc Sud et Sud-ouest), les Landes (la quasi-totalité du département) et le Lot et Garonne (partie ouest délimitée par la Garonne). D'autres essences y cohabitent avec le Pin maritime : chêne pédonculé (*Quercus robur*), chêne tauzin (*Quercus pyrenaica*), chêne-liège (*Quercus suber*) et parfois chêne vert (*Quercus ilex*) ainsi que des ormes, des tilleuls, des châtaigniers, des aulnes, des lauriers, etc.

La couverture pédologique des Landes de Gascogne sont constitués de sols podzoliques à texture sableuse (> 95 %) et sont caractérisés par une pauvreté en ressources minérales assimilables, une réserve utile faible et une nappe phréatique affleurant en hiver. Le climat océanique est caractérisé par des hivers doux et pluvieux et des étés frais et relativement humides, avec un déficit hydrique du sol marqué pendant la période estivale.

Le Pin maritime est une espèce sempervirente, à longévité moyenne. Sa croissance initiale est rapide et l'arbre mesure environ 30 mètres de haut à l'âge adulte. Le tronc est flexueux à la base et possède une écorce rougeâtre épaisse et crevassée. Son houppier conique, clair et irrégulier s'étale lorsque l'arbre vieillit. Les aiguilles rigides sont regroupées par paire et peuvent mesurer 10 à 25 cm de long. Le Pin maritime est une espèce monoïque qui fleurit en avril/mai et produit du pollen abondant, transporté par le vent.

Voici la classification du Pin maritime:

- Cormophytes (Trachéophytes), embranchement des Spermaphytes (Phanérogames) et sous-embranchement des Gymnospermes
- Ordre des Conifères
- Famille des Pinacées
- Genre *Pinus* et sous-genre *Pinus*
- Espèce *P. pinaster* Ait.

Les pins maritimes étudiés dans la thèse proviennent principalement de deux sites d'expérimentations détaillés ci-après: le site « Le Bray » et le site « Vielle Soubiran ».

## 1.2 Site expérimental « Le Bray »

Le site expérimental « Le Bray » est localisé à 25 km au Sud Ouest de Bordeaux dans le massif des Landes de Gascogne (44°42 N, 0°46 W - 61m d'altitude). Le peuplement de pins maritimes (*P. pinaster* Aït.), équiens, a été semé en 1970. Le site expérimental est un site atelier où de nombreuses expérimentations ont été menées depuis 1990 dans le cadre de projets régionaux, européens et internationaux afin de décrire et expliquer le fonctionnement du Pin maritime et celui de l'écosystème forestier en Lande humide (Loustau et al. 1990, Berbigier et al., 2001, Jarosz et al. 2007, Ogée et al. 2009 parmi d'autres).



**Figure 21.** Photographie du site du Bray (2007, M. Devaux)

A ce titre, une caractérisation micrométéorologique complète de cet écosystème est suivie depuis 1992. Depuis 1996, les flux turbulents de vapeur, chaleur et CO<sub>2</sub> sont déterminés en continu avec une résolution semi-horaire. Les mesures de paramètres climatiques ou physiologiques ont été mesurés dans le cadre des projets régionaux et européens tels que le projet Carboeurope. Il s'agit des données suivantes : la température de l'air, les précipitations, l'humidité relative, le contenu en eau du sol, la transpiration, la hauteur de nappe, la radiation et les flux de sève.

## 1.3 Site expérimental « Vielle Soubiran »

Le site expérimental de « Vielle Soubiran » est localisé à 11km de Roquefort et à 31km au Nord Est de Mont de Marsan dans le département des Landes dans le massif des Landes de Gascogne (44°02 N, 0°11 W – 108m d'altitude). Deux placettes distinctes de pins maritimes (*P. pinaster* Aït.) ont été étudiées : « Vielle Haut » et « Vielle Bas ». Ces deux placettes ont trois ans de différence : « Vielle Haut » a été semé en 1997 alors que « Vielle Bas » a été semé en 1980.



**Figure 22.** Photographies des deux placettes : « Vielle bas » (à gauche) et « Vielle haut » (à droite) (M. Sartore)



Les deux placettes, distantes d'uniquement 165 m et drainées par deux rivières dont la principale est l'Estampon, possèdent des caractéristiques contrastées. Le site « Vielle Haut » est du type de Lande mésophile, dont le sous-bois est composé de fougères (*Pteridium aquilinum* L.). Le site « Vielle Bas » est par contre du type Lande sèche avec un sous-bois composé de callune (*Calluna vulgaris* L.).

Les parcelles de Vielle font l'objet d'un suivi dendrométrique depuis 1980 (Lemoine). Les données d'inventaire ont été effectuées en 2000 et 2005, puis chaque année.

## 2 Stratégie d'échantillonnage

Durant la thèse, la composition isotopique de différents compartiments a été mesurée dans :

- Les sucres phloémiens du tronc à 1.30m
- Le CO<sub>2</sub> respiré au niveau du tronc
- La cellulose des cernes annuels

La stratégie d'échantillonnage réalisée sur ces 3 compartiments est détaillée ci-après ainsi que les modes opératoires.

### 2.1 Les sucres phloémiens

Les mesures de composition isotopique et de teneur en sucres totaux des sucres du phloème ont été menées mensuellement sur le peuplement de pins maritimes du site « Le Bray » de juin 2007 à décembre 2008. Des mesures de teneur en sucres (saccharose, glucose et fructose) et de cyclitol (pinitol) ont également été réalisées de juin 2007 à décembre 2007.

Trois morceaux de phloème ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce de 12 mm de diamètre à la hauteur de 1,30 mètres sur 5 pins de juin 2007 à juin 2008 et sur 5 autres pins de juin 2008 à décembre 2008 entre 09 :00 et 11 :00 (heure locale). L'intérêt de prélever trois morceaux au lieu d'un seul permet de moyenniser la variation intra-arbre. Les sucres phloémiens ont été ensuite extraits selon deux méthodes: la technique d'« exsudation » et la technique de « centrifugation ».

De plus les variations en teneur en sucres totaux et en composition isotopique en carbone des sucres phloémiens ont été étudiées à l'échelle journalière sur 5 autres pins maritimes que ceux étudiés mensuellement en suivant le même protocole pendant 3 semaines courant Juin 2008. Une cinétique diurne a également été effectuée sur un seul pin maritime le 26 Juillet 2007 afin d'étudier les variations de la teneur en sucres et sa composition isotopique en carbone toutes les 1H30 de 6H à 22H (heure locale).

Le travail méthodologique mené sur ces deux méthodes d'extraction de sucres est détaillé dans l'article de la partie 4 qui traite des principaux résultats de cette étude.

### 2.1.1 Technique d'exsudation

La technique d'exsudation, adaptée de (Gessler *et al.*, 2004), consiste à mettre en solution 50mg d'aiguilles dans 1.5mL d'eau déminéralisée et trois morceaux de phloème dans 6mL d'eau déminéralisée (2mL d'eau pour un morceau de phloème) pendant 4heures à température ambiante (Figure 23). Uniquement pour le phloème, on utilisera deux types de solutions, une solution d'eau « légère » et une solution d'eau « lourde » permettant de mesurer la composition isotopique en oxygène ( $^{18}\text{O}$ ) des sucres. Ne travaillant que sur l'atome de carbone, l'utilisation de ces deux solutions d'eau n'a amené à répéter 2 fois la mesure de la composition isotopique en carbone des sucres. L'eau lourde est obtenue par chauffage de l'eau légère, c'est-à-dire par l'évaporation des molécules de  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  au détriment des molécules de  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , qui se concentrent donc dans cette eau. L'eau légère n'ayant pas subi d'évaporation se moins concentrée en molécules de  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ .

Dans l'eau, les sucres des aiguilles et du phloème sont extraits par osmose. Des tests en laboratoire ont montré que 4h était suffisant pour récolter la majorité des sucres phloémiens. D'autres tests ont été menés sur la composition de la solution d'extraction puisque la solution la plus utilisée est généralement composée de 10mM d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) et de 0.015mM de Chloramphénicol (CAP). L'EDTA permet d'éviter la callose des vaisseaux phloémiens tandis que le CAP permet d'éviter la dégradation des sucres par les bactéries. Dans notre cas, des tests ont démontré que ni l'ajout d'EDTA ni l'ajout de CAP n'est nécessaire à l'extraction des sucres.



**Figure 23.** Photographie présentant l'exsudation de 3 morceaux de phloème dans 6mL d'eau distillée.

### 2.1.2 Technique de centrifugation

La technique de centrifugation a été développée au laboratoire (D. Bert, C. Lambrot, M. Devaux). Elle consiste à extraire la sève du phloème par centrifugation. Les 3 morceaux de phloème sont placés dans un cône fermé dans lequel est inséré du coton de verre. Le cône est ensuite placé sur un tube Eppendorf de 1.5mL. Ce dispositif est passé à la centrifugeuse pendant 10 min à 14000 g afin de récolter directement la sève phloémienne dans le tube Eppendorf.



**Figure 24.** Photographie présentant un morceau de phloème dans un cône rempli de verre de filtration et la sève récoltée par centrifugation au fond du tube Eppendorf.

## 2.2 Les cernes annuels

La composition isotopique de la cellulose des cernes annuels de pins maritimes depuis 2001 jusqu'à 2008 a été mesurée sur les 3 parcelles de pins maritimes, i.e. « Le Bray », « Vielle

Haut » et « Vielle Bas » dans le but majeur d'étudier sa dynamique au cours de la saison de croissance. Il s'agit d'une comparaison entre les années humides comme 2007 et les années sèches comme 2003 et 2005 ainsi qu'une comparaison entre les Landes dites « humides » comme le site du Bray et les Landes dites « sèches » comme le site de Vielle.

Pour mener ces différentes études, des carottes de bois ont été prélevées à la tarière de Pressler de 12 mm de diamètre en Juin 2008. Le carottage a été effectué sur la face « est » à hauteur de poitrine sur 6 pins du site de Vielle (3 sur le site de « Vielle Haut » et 3 autres sur le site de « Vielle Bas ») et sur 3 pins sur le site du « Le Bray ». Les pins de ces 3 sites expérimentaux ont été choisis car des mesures de croissance radiale du bois par microdendromètres et de flux de sève ou des mesures de  $\delta^{13}\text{C}$  des échanges gazeux de  $\text{CO}_2$  mesurés par TDLAS ou de  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens ont été également réalisés sur ces pins. De plus, pour deux pins maritimes du site « Le Bray », deux carottes de bois ont été prélevées en Juillet 2009 afin d'étudier les cernes de années 2007 et 2008 à très haute résolution (coupes fines de  $100\mu\text{m}$ ) (Tableau 2). Les cernes de chaque carotte ont été découpés en lamelles au microtome selon le protocole du Tableau 2. La cellulose de chaque fraction de bois a été ensuite purifiée. Pour cela, les fractions de bois séchées à l'étuve ont été finement broyées et mises en sachet téflon de 47 mm de diamètre et de  $1.2\mu\text{m}$  de taille de pores pour être ensuite purifiées. La méthode de purification a été adaptée de la procédure Jayme-Wise (Leavitt *et al.*, 1993). Tout d'abord, les huiles, graisses et les résines des fractions de bois sont éliminées dans un soxhlet contenant un mélange de toluène et d'éthanol (2:1) chauffé à  $100^\circ\text{C}$  pendant 29h puis une solution d'éthanol pur chauffée à  $80^\circ\text{C}$  pendant 16H. La seconde étape est l'élimination des molécules hydrosolubles du bois dans une solution d'eau distillée agitée et chauffée à  $100^\circ\text{C}$  pendant 6H. La troisième étape consiste à extraire la lignine du bois dans un mélange agité de chlorite de sodium et d'acide acétique glaciale (7 g  $\text{NaClO}$ , 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dans 700 mL d'eau distillée à  $70^\circ\text{C}$ ). Pour finir les sachets sont rincés à froid dans de l'eau distillée pendant 24H et ensuite 4 autre fois avant de les sécher dans l'étuve à  $65^\circ\text{C}$  pendant 24H.

	Année	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Site	N° pin								
<i>Bray</i>	3372								
	3373								
	6130								
	6199								
<i>Vielle Bas</i>	115								
	116								
	135								
<i>Vielle haut</i>	170								
	188								
	189								

**Tableau 2.** Protocole de découpe des fractions de bois par cernes annuels entre 2001 et 2008. En vert, il s'agit de la découpe de 4 coupes par cerne (basse résolution). En bleu, il s'agit de la découpe de 13 à 15 coupes par cerne (haute résolution). En orange, il s'agit de la découpe du cerne en fraction de 100µm (très haute résolution).

Des mesures de largeurs de cernes, de largeurs de bois initial et de bois final ont été effectuées au préalable sur les images scannées des carottes de bois découpées en utilisant le logiciel d'analyse d'image *Windendro* (Regent-Instruments, Canada).

Des mesures de densitométrie du bois ont été également réalisées sur les trois sites expérimentaux. Pour cela, des carottes de bois de 5mm de diamètre ont été prélevées à l'aide d'une tarière de Pressler. Le carottage a été effectué sur la face « est » à hauteur de poitrine sur tous les arbres étudiés en  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens, de la cellulose des cernes annuels et du  $\text{CO}_2$  « respiré » par le tronc. Les carottes de bois prélevées sont tout d'abord découpées en fines lamelles de 2 mm d'épaisseur. Puis les résines sont éliminées dans un bain agité de pentane (80 – 95 %) pendant 24H. Ensuite les lamelles sont stockées à 12% d'humidité avant leur exposition aux rayons X. Les profils radiaux de densité sont ensuite obtenus à l'aide du logiciel *Windendro* après calibration des données à partir d'une cale de référence.

### 2.3 Le $\text{CO}_2$ « respiré » par le tronc

Les échanges gazeux de  $\text{CO}_2$  au niveau du tronc de pins maritimes du Bray ont été mesurés en continu afin d'étudier la variabilité temporelle des flux de respiration de tronc et de leur signatures isotopiques en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) pendant deux saisons de croissance, en 2007 et en

2008. Les mesures de respiration de tronc étaient issues d'une expérimentation collective sur l'étude des variations temporelles et spatiales des flux et des compositions isotopiques du carbone lors de la photosynthèse, de la respiration au niveau du tronc et au niveau de sol.

### **2.3.1 Caractéristiques des chambres de mesures de respiration de tronc**

Les échanges gazeux de dioxyde de carbone au niveau du tronc de pin maritimes ont été mesurés à 2 niveaux, à 1,30 mètres de hauteur et sous la canopée (à 16 mètres de hauteur) sur l'arbre n°3373. Afin d'améliorer les mesures de respiration au niveau du tronc au cours des expérimentations de 2007 et 2008, plusieurs types de chambres de respiration ont été construits et testés.



Le Tableau 3 référence les caractéristiques des deux chambres de mesure, l'une placée à la base du tronc (1,30 mètres) et l'autre sous la canopée (à 16m). Ce tableau regroupe le matériel utilisé pour concevoir les chambres de respiration, la surface de tronc en échange avec l'atmosphère dans la chambre, le débit d'air à l'entrée de la chambre, la période pendant laquelle les mesures se sont effectuées sur cette chambre, l'analyseur de gaz couplé à la chambre (soit un spectromètre à infrarouge ou IRGA, soit une spectromètre à diode laser modulable ou TDLAS), le type de système et l'état dans lequel se trouve la chambre et pour finir, une photographie de la chambre.

Les chambres de respiration sont ventilées et de type ouvert. Différentes chambres ont été améliorées au cours du temps afin de diminuer l'incertitude de calcul de la composition isotopique du CO<sub>2</sub> respiré. Un minimum de 100 ppm de différence entre l'entrée et la sortie de la chambre est nécessaire pour l'amélioration des mesures. Pour cela, le rapport débit sur surface a été optimisé. Dans le but d'éviter les fuites d'air constatées fin 2007, le système à l'entrée de la chambre a été modifié avant la saison de croissance de 2008. Au lieu de pomper l'air à l'entrée de la chambre, on injecte du CO<sub>2</sub> atmosphérique provenant d'un buffer à un flux plus important (3.5 l.min<sup>-1</sup>), permettant ainsi de placer le système en surpression.

De plus en 2008, les mesures de respiration de tronc ont été répétées sur 3 arbres (n°3373, n°3476 et n°3608), la mesure de respiration s'effectuant successivement sur chacun des arbres.

Pour compléter les mesures de respiration, des sondes de température et d'humidité de l'air ont été placées dans les chambres de respiration. Qui plus est, la température du bois a été mesurée par des thermocouples Cu-Co placés 5mm sous l'écorce.

Identifiant	Chambre de respiration sous la canopée	Chambre de respiration à la base du tronc
-------------	--	---

Matériel	Plexiglas Ventilation Thermocouple Cu-Co	Bâche plastique Ventilation Thermocouple Cu-Co Sonde T/RH
Surface de tronc (m <sup>2</sup> )	0.0905 m <sup>2</sup> en 2007 0.1357 m <sup>2</sup> en 2008	3 répétitions : 0.4083 m <sup>2</sup> , 0.4953 m <sup>2</sup> , 0.7251 m <sup>2</sup> 1 chambre en hiver 2008-2009 : 0.9051 m <sup>2</sup>
Débit d'air en entrée	1 l/min en 2007 3.5 l/min en 2008	3 à 3.5 l/min
Période de mesure	2007 : jour 107 à 362 2008 : jour 86 à 365	Été – automne – Hiver 2008-2009 : jour 242 à jour 19
Analyseur	TGA	TGA + IRGA
Système	Ouvert	ouvert
Etat	dépression en 2007 surpression en 2008	surpression
Photos		

**Tableau 3.** Caractéristiques des différentes chambres de respiration de tronc

### 2.3.2 Système de mesures d'échanges gazeux

La technique de mesure d'échanges gazeux consiste en la mesure de concentration d'un gaz à l'aide d'un analyseur. Nous avons utilisé un analyseur de gaz trace (TGA100, Campbell Scientific, Inc.), il s'agit d'une technique très récente qui utilise la spectrométrie d'absorption à diode laser modulable (TDLAS) afin de mesurer la concentration en dioxyde de carbone du CO<sub>2</sub> respiré par le tronc des pins maritimes (Figure 25).

Cet analyseur permet de mesurer à une haute fréquence de 10Hz la concentration en dioxyde de carbone d'un échantillon de gaz à une fréquence d'émission possible de 3.1 à 10 µm et, pour le cas des isotopologues du CO<sub>2</sub>, une longueur d'onde de balayage de la diode laser modulable de 4.332333 µm (+/- 0.00005 µm). L'intérêt d'une diode laser modulable, qui est un filament de sel de plomb refroidi à l'azote liquide pour fonctionner à une température d'environ 95°K, est de balayer les différentes raies d'absorption des isotopologues du CO<sub>2</sub> d'un échantillon de gaz afin d'en mesurer leur concentration (<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> et C<sup>18</sup>OO).

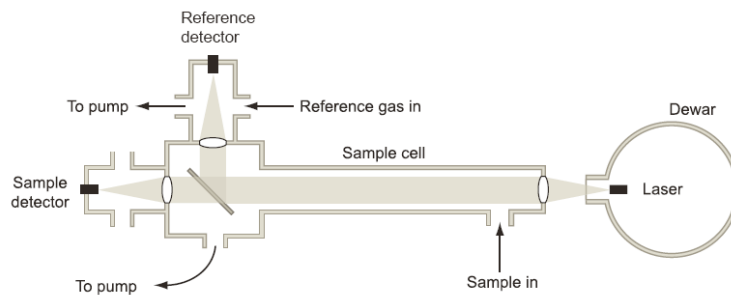


**Figure 25.** Représentation photographique du spectromètre à diode laser modulable (TGA100, Campbell Scientific, Inc.)

Pour mesurer un échantillon de gaz, ce gaz est introduit dans la cellule d'échantillonnage de longueur  $l$  qui est traversée par le laser d'une intensité  $I_0$ . L'intensité du laser sortante après absorption par le gaz échantillon  $I$  est mesurée par le détecteur d'échantillon. Par la loi de Beer-Lambert, on peut calculer l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde  $\lambda$  de la diode laser  $A_\lambda$  ou la concentration de l'échantillon  $C$ :

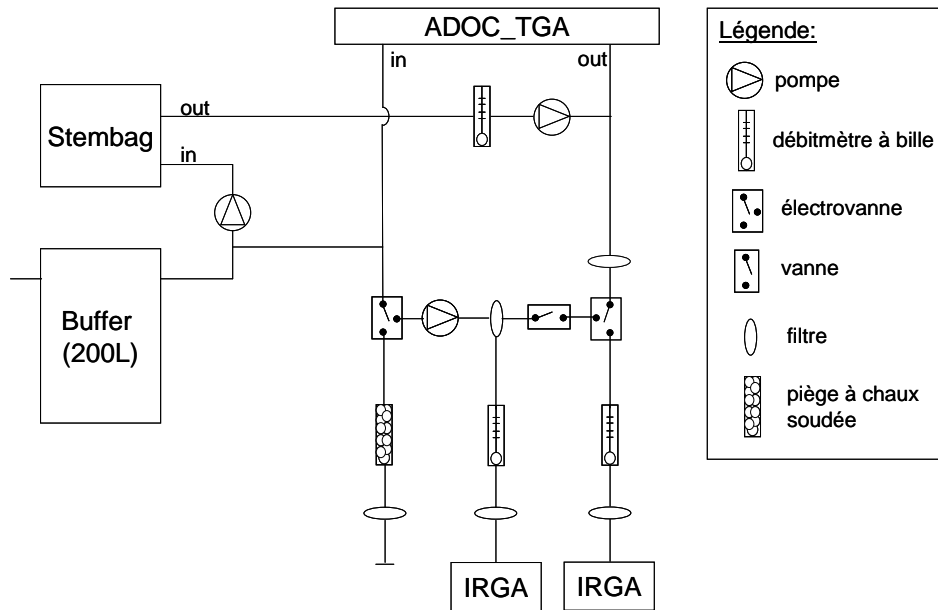
$$A_\lambda = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C \quad (10)$$

avec  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire et  $I/I_0$  la transmittance.



**Figure 26.** Schéma de la mesure de gaz par spectrométrie à diode laser modulable (TDLAS)

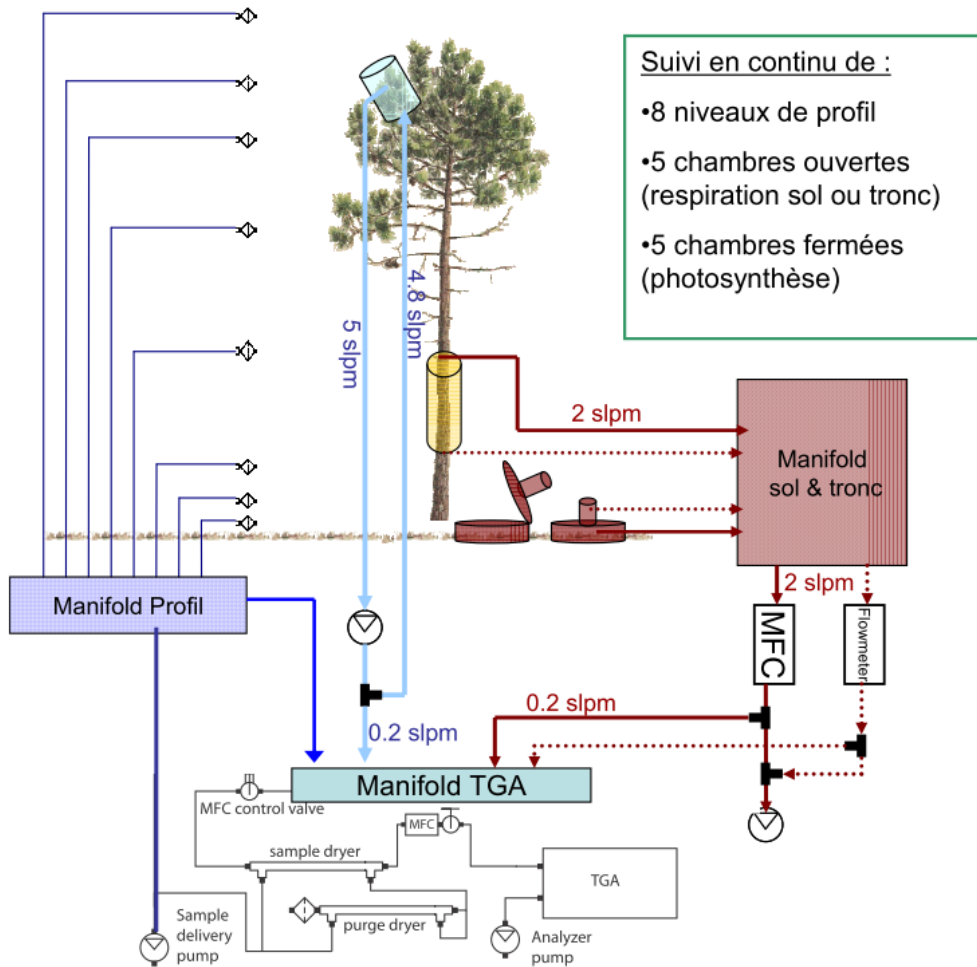
Sur la période d'août à décembre 2008, les mesures d'échanges gazeux par diode laser modulable ont été couplées à des mesures par un analyseur de gaz à infra rouge (IRGA) (Figure 27). Ce type d'analyseur ne peut distinguer les différentes raies d'absorption des isotopologues du  $\text{CO}_2$  puisque sa gamme de mesure se situe aux environs des  $4.26 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.075 \mu\text{m}$ ). Ce couplage a été effectué afin de comparer la mesure de  $\text{CO}_2$  total par les deux systèmes, TGA et IRGA, et leurs incertitudes de mesures.



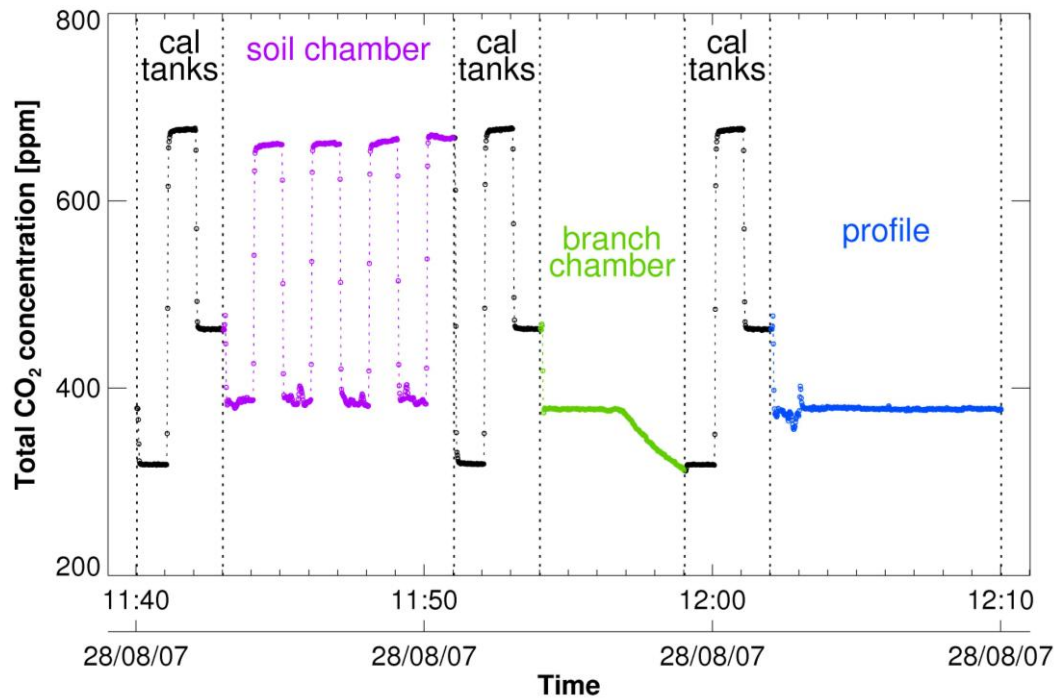
**Figure 27.** Schéma de mesure d'échanges gazeux par spectrométrie à diode laser modulable (TDLAS) et par spectrométrie infrarouge (IRGA).

L'expérimentation menée collectivement consistait à mesurer en continu la concentration des  $\text{CO}_2$  lors de la photosynthèse (1 chambre), lors de la respiration du tronc (2 chambres) et de la respiration du sol (3 chambres) ainsi que sur un profil à 8 niveaux (Figure 28). Pour mesurer toutes ces processus de photosynthèse et de respiration (tronc/sol), le système de mesure par diode laser modulable mesurait la concentration en  $\text{CO}_2$  en entrée et en sortie de chaque chambre l'une après l'autre selon une séquence prédéfinie. Une séquence de mesure incluant la mesure d'une chambre de respiration (tronc ou sol) durait 30 minutes. Toutes les 2H30, toutes les chambres de respiration (sol ou tronc) étaient mesurées. Pour chacune des chambres de tronc, l'une pour la mesure à 1.30m et l'autre pour la mesure sous la canopée, les mesures de la concentration en  $\text{CO}_2$  respiré s'effectuait donc toutes les 2H30.





**Figure 28.** Schéma de l'expérimentation menée au Bray sur pin maritime: mesures de concentrations en  $\text{CO}_2$  de la photosynthèse, de la respiration du tronc et de la respiration du sol en 2007 (Burlett et al., 2007, poster JEF, Annexe 4)



**Figure 29.** Séquence de mesure typique des concentrations en CO<sub>2</sub> par diode laser modulable de respiration et de photosynthèse (Wingate *et al.*, submitted).

Une séquence de mesure de respiration de tronc ou de sol (pour une seule chambre) s'opérait de la manière suivante

(

Figure 29) :

1. Mesure des gaz étalons
2. Mesure de respiration à l'entrée et à la sortie de la chambre (sol ou tronc)
3. Mesure des gaz étalons
4. Mesure de la photosynthèse
5. Mesure des gaz étalons
6. Mesure du profil à 8 niveaux

Les mesures de photosynthèse s'effectuaient plus intensivement comparé aux mesures de respiration (toutes les 30min). Le système de mesure de photosynthèse était un système de mesure fermé alors que le système de mesure de ma respiration (tronc ou sol) est de type ouvert. Les mesures de respiration à l'entrée et la sortie de la chambre étaient répétées 4 fois en 2007 et 3 fois en 2008. Les mesures de gaz étalons étaient réalisées avant et après la mesure de n'importe quelle chambre afin de recalibrer les données en fonction de ces gaz de concentration et signature isotopique en carbone connues. En 2007, 3 gaz de calibration ont été utilisés tandis qu'en 2008, 4 gaz de calibration ont été choisis afin d'encadrer la plage de valeurs de concentrations en CO<sub>2</sub> mesurées (Tableau 4).

Année	[CO <sub>2</sub> total] (ppm)	SD (ppm)
2007		
	330.71 ppm	0.05
	370.88 ppm	0.1
	480.12 ppm	0.05
2008		
	330.71 ppm	0.05
	480.12 ppm	0.05
	723.75 ppm	-

**Tableau 4.** Caractéristiques des gaz de calibration selon l'année de mesure

### 3 Mesure de teneur en sucres phloémiens

#### 3.1 Teneur en sucres totaux

La méthode à l'antrone permet de quantifier la teneur en sucres totaux des solutions exsudées et centrifugées puisque l'ajout de ce réactif permet la mesure de la concentration en sucres totaux par analyse colorimétrique. Tous les monosaccharides, disaccharides et polysaccharides dans leur forme hydrolysée ou non-hydrolysée sont détectés par cette méthode. La préparation de la solution à l'antrone, aussi nommée 9,10-dihydro-9-oxoantracene, est adaptée de Bachelier & Gavinelli (1966): 0.5g d'antrone est dissout dans 250mL d'acide sulfurique à 95-98% sans aucun ajout d'eau. Pour commencer, les solutions issues de l'exsudation et de la centrifugation sont centrifugées à 11 000g pendant 2min afin d'enlever le culot de particules de phloème. Ensuite les solutions sont diluées, c'est-à-dire 1mL d'exsudats dans 3mL d'eau distillée pour la méthode d'exsudation et 20µL de matériel centrifugé dans 2mL d'eau distillée pour la méthode de centrifugation. Puis, 50µL des

solutions diluées sont ajoutés à 2.5mL de solution à l'anthrone. La réaction colorimétrique est accélérée par chauffage à 80°C pendant 30min. La concentration en sucres totaux des solutions issues de l'exsudation et de la centrifugation est déterminée en mesurant l'absorbance à 560nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en sucres totaux est déterminée à partir d'une gamme étalon de saccharose. Des tests en laboratoire ont montré que le cyclitol présent dans le phloème des pins, le pinitol, n'est pas détectée par la méthode à l'anthrone.

### **3.2 Teneur en saccharose, glucose, fructose et pinitol**

Afin de quantifier la concentration des principaux métabolites du phloème, le saccharose, le glucose, le fructose et le pinitol, on utilise l'HPLC, « High Performance Liquid Chromatography ». Cette méthode permet aussi de les récolter séparément afin de mesurer leur  $\delta^{13}\text{C}$ . Tout d'abord les solutions issues de centrifugation sont diluées : 50 $\mu\text{L}$  sont dilués dans 500 $\mu\text{L}$  d'eau distillée. Ensuite les deux solutions d'exsudation et de centrifugation sont filtrées pour enlever les impuretés. La quantification et la séparation des métabolites de ces deux solutions sont ensuite réalisées à l'aide de la colonne de séparation PL Hi-Plex- $\text{Ca}^{2+}$  et du réfractomètre de l'HPLC. Les concentrations sont déterminées à partir de gamme de concentration de solutions de sucres de référence.

## **4 Mesure de la composition isotopique en carbone**

### **4.1 Les sucres phloémiens**

100 $\mu\text{L}$  à 150 $\mu\text{L}$  des solutions de sucres extraites par exsudation et par centrifugation ainsi que 250 $\mu\text{L}$  de métabolites lyophilisés après collecte par HPLC (saccharose, glucose, fructose et pinitol) sont transférés dans des capsules d'étain puis séchés pendant 12 heures à l'étuve. Afin d'accéder à la composition isotopique de solutions de sucres et du saccharose, du glucose, du fructose et du pinitol, les capsules d'étain sont envoyées à l'analyseur élémentaire puis au spectromètre de masse isotopique. La composition isotopique des sucres phloémiens est exprimée en ‰-VPDB.

### **4.2 La cellulose des cernes**

1 mg de cellulose pour chaque fraction de bois a été inséré dans une capsule d'étain qui a été injectée dans un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse (EA-IRMS) afin de mesurer sa composition isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ). La composition isotopique de la cellulose des cernes est exprimée en ‰-VPDB.

### **4.3 Le $\text{CO}_2$ « respiré » par le tronc**

Après mesure, les données de concentration en  $\text{CO}_2$  mesurées par TDLAS sont filtrées puis calibrées avant le calcul de la composition isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Cette partie réalisée par J. Ogée

est brièvement décrite. Premièrement, les données sont filtrées en utilisant des critères sur les mesures des gaz étalons, de la pression de la TDL de la température du laser, du débit d'air... Secondement, les données sont moyennées sur les 20-30 dernières secondes pour chaque type de mesure (gaz de calibration, entrée et sortie des chambres ...). Troisièmement, à partir des valeurs des gaz de calibration juste avant les chambres d'échanges gazeux, un polynôme du second degré est ajusté. Les données mesurées de concentration ( $^{12}\text{CO}_2$ ,  $^{13}\text{CO}_2$  et  $\text{C}^{18}\text{OO}$ ) à l'entrée ( $C_{\text{in}}$ ) et à la sortie ( $C_{\text{out}}$ ) des chambres sont ainsi recalculées selon ce polynôme.

A partir de ces valeurs calibrées de concentration, les flux d'échanges gazeux ( $F$ ) de respiration ainsi que leur signature isotopique ( $\delta^{13}\text{C}_F$ ) sont calculés selon les équations suivantes :

$$F = \frac{D_m}{S} (C_{\text{out}} - C_{\text{in}}) \quad (11)$$

dans laquelle  $D_m$  est le débit molaire en  $\text{mol.s}^{-1}$ ,  $S$  est la surface d'échange de tronc en  $\text{m}^2$ ,  $C_{\text{out}}$  est la concentration en sortie de chambre et  $C_{\text{in}}$ , est la concentration en entrée de chambre.

Et :

$$\delta^{13}\text{C}_F = \left( \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{out}} \cdot C_{\text{out}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{in}} \cdot C_{\text{in}}}{C_{\text{out}} - C_{\text{in}}} \right) \quad (12)$$

dans laquelle  $\delta^{13}\text{C}_{\text{in}}$  est la composition isotopique du  $\text{CO}_2$  en entrée de chambre et  $\delta^{13}\text{C}_{\text{out}}$  est la composition isotopique du  $\text{CO}_2$  en sortie de chambre (Wingate *et al.*, 2007). La composition isotopique du  $\text{CO}_2$  respiré au niveau du tronc est ainsi quantifiée et exprimée en ‰-VPDB- $\text{CO}_2$ .





## Chapitre 3

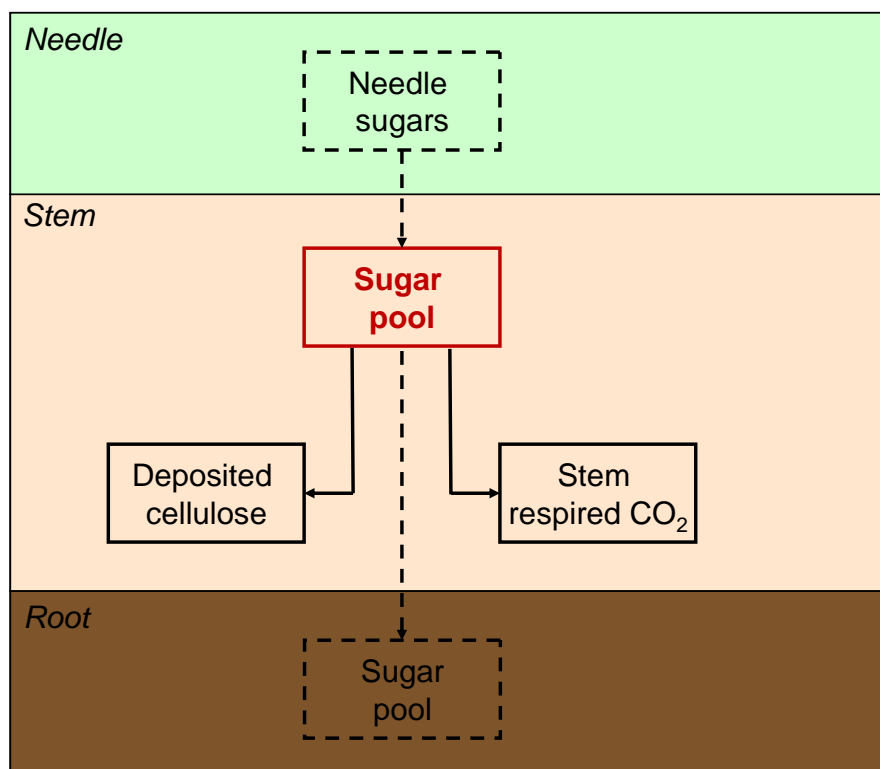
---

# Les sucres phloémiens





# Variations temporelles de la teneur en sucres phloémiens et leur composition isotopique en carbone



RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY

*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; **23**: 2511–2518

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/rcm.4092

**RCM**

## Carbon stable isotope ratio of phloem sugars in mature pine trees throughout the growing season: comparison of two extraction methods<sup>†</sup>

Marion Devaux<sup>1\*</sup>, Jaleh Ghashghaie<sup>2,3</sup>, Didier Bert<sup>1,4</sup>, Catherine Lambrot<sup>1</sup>, Arthur Gessler<sup>5</sup>, Camille Bathellier<sup>2,3</sup>, Jérôme Ogee<sup>1</sup> and Denis Loustau<sup>1</sup>



# Carbon stable isotope ratio of phloem sugars in mature pine trees throughout the growing season: comparison of two extraction methods<sup>†</sup>

Marion Devaux<sup>1\*</sup>, Jaleh Ghashghaie<sup>2,3</sup>, Didier Bert<sup>1,4</sup>, Catherine Lambrot<sup>1</sup>, Arthur Gessler<sup>5</sup>, Camille Bathellier<sup>2,3</sup>, Jérôme Ogee<sup>1</sup> and Denis Loustau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR1263 EPHYSE, F-33140 Villenave d'Ornon, France

<sup>2</sup>Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, Département d'Ecophysiologie Végétale, CNRS-UMR 8079, bâtiment 362, Université Paris-Sud XI, 91405 Orsay Cedex, France

<sup>3</sup>Plateforme Métabolisme-Métabolome, IFR 87 'La Plante et son Environnement', Institut de Biotechnologie des Plantes (IBP), Bâtiment 630, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex, France

<sup>4</sup>INRA, UMR1202 BIOGECO, F-33610 Cestas, France

<sup>5</sup>Core Facility Metabolomics and Stable Isotopes, Centre for System Biology (ZBSA), University of Freiburg, Habsburgerstr. 49, D-79104 Freiburg, Germany

Received 26 February 2009; Revised 16 April 2009; Accepted 16 April 2009

**The study presents a comparison of two phloem sugar extraction methods. The amount of phloem sugar extracted and the carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of the total extracts and of the main phloem compounds separated by high-performance liquid chromatography (sucrose, glucose, fructose and pinitol) are compared. These two phloem sap extraction methods are exudation in distilled water and a new method using centrifugation, which avoids the addition of any solvent. We applied both extraction methods on phloem discs sampled from 38-year-old *Pinus pinaster* trees in south-western France throughout the period from June 2007 to December 2008 on different time-scales: hourly, daily and monthly. We found that the centrifugation method systematically extracted ca. 50% less compounds from the phloem discs than the exudation method. In addition, the two extraction methods provided similar  $\delta^{13}\text{C}$  values of the total extracts, but the values obtained by the exudation method were 0.6‰ more negative than those calculated from the mass balance using the individual constituents. Over the growing season, both extraction methods exhibited lower total sugar content and more  $^{13}\text{C}$ -enriched phloem sap in summer compared with winter values. These findings suggest that both extraction methods can be applied to study the carbon isotope composition of phloem sap, and the centrifugation method has the advantage that no solvent has to be added. The exudation method, however, is more appropriate for the quantification of the amounts of phloem sugars. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.**

The carbon isotope ratio ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of phloem sap carbohydrates from mature trees is a tracer of post-photosynthetic processes such as phloem sap loading and transport, cellulose deposition in tree rings and stem respiration.<sup>1–3</sup> Phloem plays a major role in the distribution of photoassimilates in plants from source organs (i.e. leaves) to sink organs (i.e. all non-photosynthetic organs of storage or transport, e.g. branches, main stem or roots). Phloem sap is mainly composed of sucrose, the main substrate for energetic

metabolism of plants, but also of other metabolites, e.g. nitrogen compounds (e.g. amino acids, proteins, peptides, RNA), ions ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) and signalling molecules (phytohormones, nitrogen oxides, oxygen-reactive species).<sup>4</sup> In conifers, phloem sap can also contain cyclitols, such as pinitol, which accumulates in response to drought stress.<sup>5</sup>

It is difficult to collect phloem sap from sieve tubes which are blocked as a result of callous formation after wounding.<sup>6</sup> Therefore, several methods have been developed to extract phloem sap and some studies have investigated available methods of sugar extraction; for instance, the aphid stylet method,<sup>7</sup> the bark incision or 'bleeding' method<sup>8</sup> and the exudation of phloem pieces.<sup>9,10</sup> According to Gessler *et al.*,<sup>11</sup> who compared some of these methods, the most adequate method for evaluating the carbon and oxygen isotope composition of the phloem sap of leaf, twig and stem of beech species is the exudation of phloem samples in demineralized water.

\*Correspondence to: M. Devaux, INRA, UR1263 EPHYSE, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

E-mail: marion.devaux@pierroton.inra.fr

<sup>†</sup>Presented at the 2<sup>nd</sup> Joint European Stable Isotope User Meeting (JESIUM), Presqu'île de Giens, France, 31 August–5 September, 2008.

Contract/grant sponsor: CARBOEUROPE project (Directorate General XII, European Commission, GOCE-CT-2003-505572), Aquitaine region project ("DURABILITE du SYSTEME de PRODUCTION FORET-BOIS d'AQUITAINE") and INRA, division "Forest, Grassland and Freshwater Ecology".

A few studies on phloem sap have demonstrated dynamics in sugar content and carbon isotope composition on different time-scales. Gessler *et al.*<sup>3</sup> found diurnal variations of the carbon isotope composition of phloem sap, leaves and the trunk from the top to the base of the plant in *Ricinus communis* with <sup>13</sup>C-depleted values during the day compared with night-time values. This day-night cycle was suggested to result from isotopic effects during leaf transitory starch accumulation and remobilization at night.<sup>12</sup> However, Kodama *et al.*,<sup>13</sup> observed no diurnal variation in the  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap of *Pinus sylvestris* trunks, although some diurnal variations were found in leaves and twigs.

There is little information on the sugar content and carbon isotope composition dynamics of phloem sap in the stem compartment over at least a complete year. In general, studies report seasonal variations of phloem sap in different compartments, i.e. leaves, twigs, stems or roots and on different time-scales, i.e. over few months or over a growing season. Gholz and Cropper<sup>14</sup> examined the dynamics of the sugar and starch contents of tree compartments, from needles to roots, in mature pine trees over 2 years without any carbon isotope analysis. Keitel *et al.*,<sup>15</sup> showed significant variations of sugar content and  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap of *Fagus sylvatica* over a growing season. More recently, Maunoury *et al.*<sup>16</sup> studied the dynamics of the  $\delta^{13}\text{C}$  of CO<sub>2</sub> respired by trunk of *Quercus petraea* in comparison with the dynamics of total organic matter and of soluble sugar carbon isotope composition of phloem on diurnal, daily and seasonal time-scales.

The objectives of the study were (i) to compare two methods of phloem sap extraction, i.e. exudation and centrifugation methods, and (ii) to analyze sugar content and carbon isotope composition of phloem sap of maritime pine trunks on several time-scales: hourly, daily and monthly, over a whole year. The centrifugation method is a new method that consists of centrifuging phloem discs and thus does not require the addition of any solvent to the phloem sample. Following extraction, we measured the total sugar content and its carbon isotope composition as well as the individual constituents, i.e. sucrose, glucose, fructose and pinitol, after separation by high-performance liquid chromatography (HPLC).

## EXPERIMENTAL

### Study site

The experiments were conducted at the Le Bray site, a 38-year-old even-aged stand of maritime pine (*P. pinaster*) located 20 km south-west from Bordeaux (latitude 44°43'1.6"N, longitude 0°46'9.5"W) in France. The understory vegetation consists mainly of purple moor-grass *Molinia caerulea* L. Moench. and the soil is a sandy hydromorphic humic podzol. The climate is temperate maritime characterized by cool wet winters and warm dry summers. The mean (1971–2000) annual temperature and precipitation are 13.2°C and 971 mm, respectively. Over the studied period (2007–2008), no severe soil water deficit occurred in the summer compared with the previous years (2002, 2003, 2005 and 2006). Additional phloem samples were collected in a mixed stand of *P. pinaster* and *P. sylvestris*, near the Le Bray site.

### Phloem sampling

The phloem discs were sampled at a height of 1.3 m from the main stem of dominant trees. Three sets of three phloem samples located around each tree trunk were collected ( $n = 9$  phloem discs per tree per sampling time). After removing the bark, each sample was punched with a cylindrical 12 mm cork-borer. The bark and the xylem pieces remaining on the sampled disc were immediately removed with a scalpel.

The phloem sap was extracted from the phloem discs with two different methods: the exudation method on two sets (for a duplication of analysis) and the centrifugation method on the last set, except for day-to-day variations for which the exudation method only was used (see below). These extracts were then analyzed for sugar content and carbon isotope composition.

These procedures were carried out at the Le Bray site from June 2007 to December 2008 to explore the temporal variations of phloem sugar content and carbon isotope composition. The hourly variations were assessed on 26 July 2007 by collecting phloem samples ten times between 06:00 and 22:00 from a single tree (all times are expressed in Greenwich Mean Time GMT), with a 0 to 24 h notation). The day-to-day variations were investigated from a set of phloem samples collected every day from five mature trees (mean diameter at breast height (DBH) of  $45.58 \pm 0.71$  cm) for 3 weeks in June 2008 with the exudation method only. The seasonal variation was assessed from monthly samples taken from five other dominant pine trees (DBH of  $43.19 \pm 0.35$  cm, mean height of 25 m) between 09:00 and 11:00 using both extraction methods. Another set of five mature pine trees was added to the initial sample set in June 2008.

### Phloem sap extraction by exudation

The exudation of phloem consisted of sap retrieval from phloem sieve tubes by osmosis, introducing the set of three phloem discs in 6 mL of exudation solution (2 mL per phloem disc) for a few hours to allow the extraction of sugars. The phloem discs were then removed and dried at 65°C. The solution containing phloem exudates was stored in a freezer at –28°C before analysis.

### Phloem sap extraction by centrifugation

The centrifugation method is based on the extraction of the phloem sap from phloem discs by centrifugation. The phloem discs were placed above glass-wool and centrifuged for 10 min at 14 000 g (MiniSpin Plus centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany) in 1.5 mL Eppendorf vials (a set of 3 discs per vial). After centrifugation, the sap collected at the bottom of the vials (on average 150  $\mu\text{L}$ ) was stored at –28°C for further analysis and the remaining pieces of phloem discs were then dried in an oven at 65°C.

Tests (data not shown) showed that the thickness of glass-wool has no effect on the amount of collected phloem sap and that capping the vial is needed to avoid any evaporation during the centrifugation. The speed and duration of centrifugation were optimized to obtain the maximum quantity of phloem sap. This new method has the advantage of extracting the phloem sap rapidly and directly without the addition of any solvent.

### Phloem sap content measurements

The total sugar content of phloem extracts obtained from either exudation or centrifugation was measured as follows. The solutions obtained by the exudation method were first centrifuged at 11 000 g for 2 min to remove the pellet of phloem tissues. A dilution in distilled water was needed for both extraction methods, i.e. 1 mL of exudates in 3 mL of distilled water for the exudation method and 20  $\mu$ L of centrifuged material in 2 mL of distilled water for the centrifugation method. Then, 50  $\mu$ L aliquots of the diluted solutions were injected into 2.5 mL of anthrone reagent which allows colorimetric analysis of the total sugar content (all monosaccharide, disaccharides and polysaccharides in their hydrolyzed or non-hydrolyzed forms). The preparation of the anthrone reagent was adapted from Bachelier and Gavinelli:<sup>17</sup> 0.5 g of anthrone, also named 9,10-dihydro-9-oxoanthracene, was dissolved in 250 mL of sulphuric acid at 95–98% without water addition. The colorimetric reaction was accelerated by heating at 80°C for 30 min and the total sugar content was then determined by measuring the absorbance at 560 nm with a spectrophotometer (Biochrom Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK). In contrast to Bachelier and Gavinelli,<sup>17</sup> who measured the absorbance with filters of 580 and 620 nm, the wavelength of 560 nm was selected as the maximum absorbance of sugars in the UV-Visible spectrum. The sugar concentration was determined from calibration curves established using standard sucrose solutions with a range of known concentrations. After sugar content analysis, the remaining solutions were stored in a freezer until the carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) analysis.

The main compounds in the phloem sap, which were extracted using both extraction methods, were individually quantified and isolated as follows. First, 50  $\mu$ L of phloem extracts from the centrifugation method only were diluted in 500  $\mu$ L of distilled water. The phloem extracts from both extraction methods were then filtered (filter HV, 0.45  $\mu$ m type; Nihon Millipore Kogyo, Osaka, Japan) to remove any pellets. The individual compound separation and quantification were then conducted with a high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Gilson Inc., Middleton, WI, USA) with a PL Hi-Plex  $\text{Ca}^{2+}$  column (7.7 mm diameter and 300 mm length, Polymer Laboratories, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) placed behind a carbohydrate precolumn (Benson Carbohydrates BC-100 Calcium, Alltech, Carquefou, France). The flow rate was maintained at 0.5  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$  and the temperature of the column at 90°C. The peaks of four components, i.e. sucrose, glucose and fructose and pinitol, were observed by refractometry (refractive index detector IOTA 2, Precision Instruments, Marseille, France) and individually collected for isotope analysis. Their contents were determined from calibration curves established with standard sugars and pinitol solutions with a range of known concentrations.

### Carbon isotope analysis

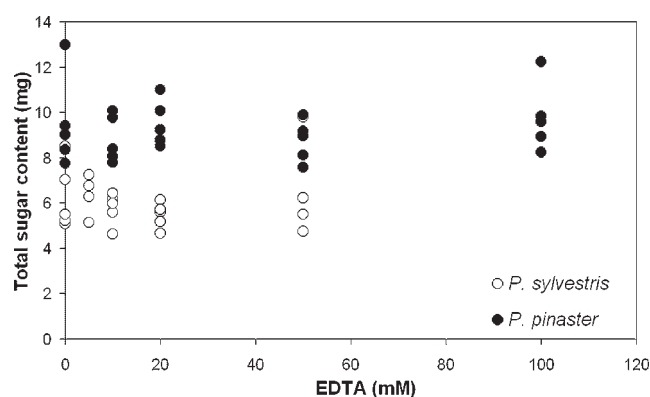
In order to assess the carbon isotope composition of the total phloem extracts, 100  $\mu$ L or 150  $\mu$ L of diluted extracts obtained by both extraction methods were transferred into tin capsules (Thermo Electron Corporation, Milan, Italy) and oven-dried at 65°C for 12 h. The individual compounds

separated by HPLC were freeze-dried, suspended in distilled water and then 250  $\mu$ L of each compound was transferred into tin capsules (Thermo Electron Corporation). All the tin capsules containing oven-dried samples were then put into an elemental analyzer (NA-1500; Carlo-Erba, Milan, Italy) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS VG Optima; Micromass, Villeurbanne, France) for carbon isotope analysis. The carbon isotope composition value is expressed in  $\delta^{13}\text{C}$  notation (‰ units), relative to the international standard (Pee Dee Belemnite). A laboratory standard (glutamic acid) was measured every 12 samples for correction of the drift of the IRMS instrument. According to Duranceau *et al.*,<sup>18</sup> no fractionation against  $^{13}\text{C}$  occurs during the elution of phloem sap compounds. We also assumed no fractionation although our carbohydrate column was not the same.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Tests on exudation method

The standard solution normally used for phloem exudation is composed of 10 mM of ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) and of 0.015 mM chloramphenicol (CAP) at pH 7.0.<sup>10</sup> EDTA is used to prevent callous formation in the sieve tubes and CAP to avoid the bacterial consumption of sugars. However, the use of deionized water without any chemical agents has already been shown to increase the precision of the measured carbon isotope composition of extracted sugars.<sup>11</sup> Hence, to check the effect of the chelating agent EDTA on sugar extraction, we measured the total sugar content of the exudates collected from phloem samples of mature *P. pinaster* and *P. sylvestris* trees growing in the vicinity for different concentrations of EDTA in distilled water (Fig. 1). The concentration of 0 mM corresponded to distilled water without any agents. Since the difference between the total sugar content extracted at 0 mM of EDTA



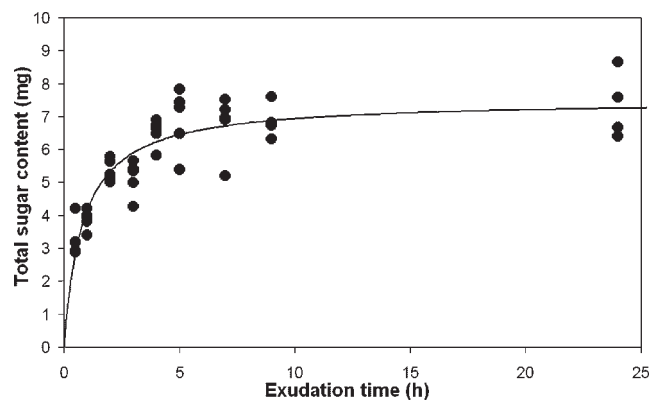
**Figure 1.** Total sugar content extracted from phloem discs using exudation solutions with different concentrations of EDTA for two species, *P. pinaster* (dark circles) collected on 4 May 2007 and *P. sylvestris* (white circles) collected on 15 May 2007. The total sugar content was determined by the anthrone reaction. Each data point represents total sugar content extracted from one phloem disc (five repetitions per EDTA concentration on the same pine tree). For *P. pinaster*,  $p = 0.6981$  (t-test) and, for *P. sylvestris*,  $p = 0.6915$  (t-test) and the Dunnnett-test was not significant for either of them.

and the total sugar content extracted at higher concentrations was not significant (Dunnett test, Proc. GLM in SAS; SAS Institute Inc., Cary, NY, USA), we concluded that it is not necessary to add EDTA in distilled water to extract more sugars. Similarly, the activity of the antibacterial agent CAP was tested by comparing the values of the total sugar content of two different exudates collected from phloem samples of *P. pinaster* in distilled water with and without CAP addition. The difference in sugar quantity between 4 and 24 h of incubation was not significant ( $p = 0.6354$ , t-test), indicating that no degradation of sugars occurred in the solution without CAP. Consequently, we used distilled water without adding any carbon-containing compounds for the exudation of phloem discs during the experiments.

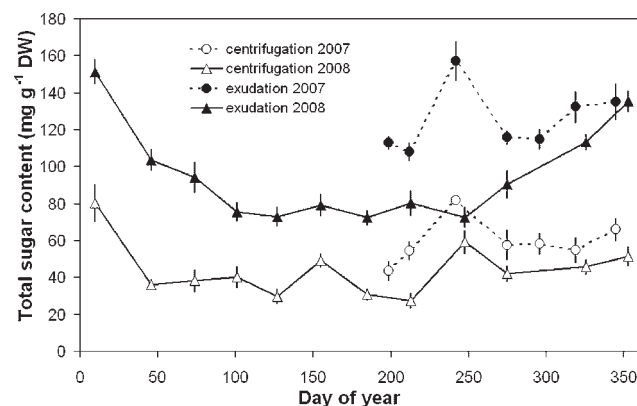
Finally, we evaluated the optimal duration of exudation through measurements of the total amount of sugars. Figure 2 shows the total sugar content measured on extracts after different exudation durations ranging from 30 min to 24 h at room temperature. The results showed that 4 h of incubation was sufficient since it allows the extraction of 86% of the amount extracted after 24 h. This is close to the exudation duration of 5 h previously reported by others.<sup>10</sup> We subsequently used an exudation time of 4 h.

### Comparison of phloem sap extraction methods

A comparison between the exudation and centrifugation methods for total sugar content determination, assessed from June 2007 to December 2008, shows that the amount of compounds extracted by the centrifugation method ( $48.5 \pm 1.8 \text{ mg g}^{-1}$  dry weight (DW)) was on average 50% less than by the exudation method ( $102.1 \pm 3.3 \text{ mg g}^{-1}$  DW) (Fig. 3 and Table 1). Both analysis of variance (ANOVA) (Table 1) and paired t-tests (data not shown) show a significant difference between the two methods ( $p < 0.001$ ). Consistently, the amount of the individual compounds separated by HPLC, i.e. sucrose, glucose, fructose and pinitol, extracted from phloem pieces was also higher by exudation (Fig. 4, left panel) than by centrifugation (Fig. 4, right panel) (Table 1). This is also clear from the results obtained at an hourly resolution: the mean total sugar content was  $127 \pm 2.9 \text{ mg g}^{-1}$  DW and  $43 \pm 2.5 \text{ mg g}^{-1}$  DW using the exudation and centrifugation methods, respectively (Fig. 5,  $p < 0.0001$ ). On average, the centrifu-



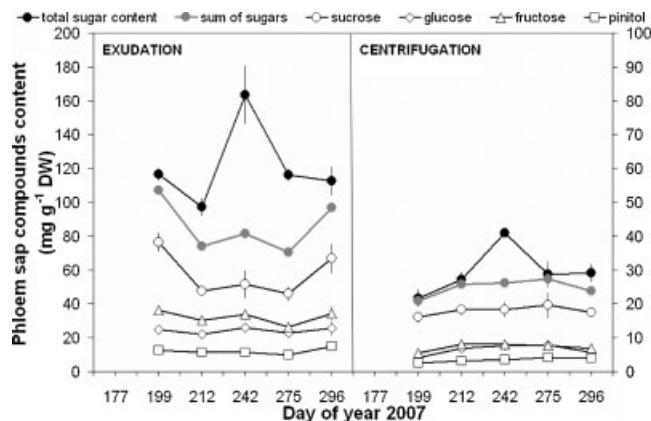
**Figure 2.** Total sugar content in phloem sap exudated into distilled water (without any agent) for different durations of exudation. Total sugar content was determined by the anthrone reaction. Each data point corresponds to the extract from one phloem disc sampled from one maritime pine (*Pinus pinaster*).



**Figure 3.** Seasonal changes in the total sugar content of phloem sap sampled from maritime pine trees and extracted by exudation in distilled water (dark symbols) and centrifugation (white symbols) methods in 2007 (circles and dotted lines) and in 2008 (triangles and full lines). The total sugar content was determined by the anthrone reaction. Each data point represents the mean value ( $\pm$ SE) of five to ten dominant trees.

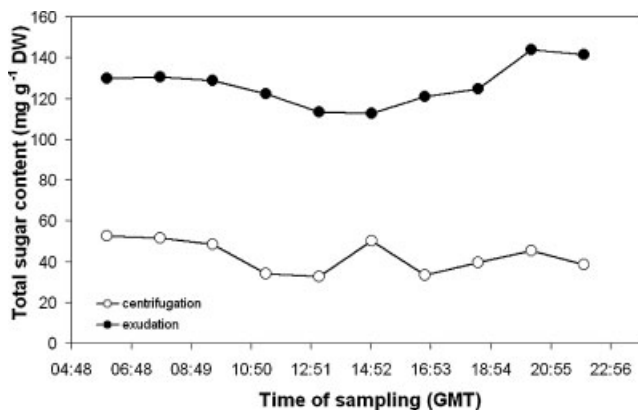
**Table 1.** Effect of phloem sap extraction method and time of year on the sap compound contents. Phloem discs were sampled on *Pinus pinaster*. The exudation of phloem sap was conducted in distilled water. The individual compounds were analyzed using HPLC. Upper part of the table gives mean  $\pm$  SE values for each extraction method for the data pooled over the studied period ( $n = 6$  for sucrose, glucose, fructose and pinitol from June to October 2007 on two to five pine trees and  $n = 19$  for the total sugar content measured by the anthrone reaction from June 2007 to December 2008 on 5 pine trees). Bottom part of the table gives probability values for significant effects of the method, time of year and interaction (ANOVA with repeated measurements, proc GLM, SAS software v 8.02). 'ns' means non-significant effect on the parameter

	Phloem sap compound contents ( $\text{mg g}^{-1}$ DW)						
	Sucrose	Glucose	Fructose	Pinitol	Sugars + Pinitol	Anthrone	Anthrone - Sugars
Centrifugation	$35.9 \pm 2$	$6.4 \pm 0.4$	$7.3 \pm 0.4$	$3.5 \pm 0.2$	$53.1 \pm 2.7$	$48.5 \pm 1.8$	$9.5 \pm 2.6$
Exudation	$57.7 \pm 3.6$	$12.2 \pm 0.6$	$16.1 \pm 0.6$	$6.0 \pm 0.4$	$92.0 \pm 4.6$	$102.1 \pm 3.3$	$35.2 \pm 6.3$
Method	0.001	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001
Time	ns	ns	ns	ns	ns	0.001	0.001
Method * time	0.01	ns	0.05	ns	0.01	0.001	0.01

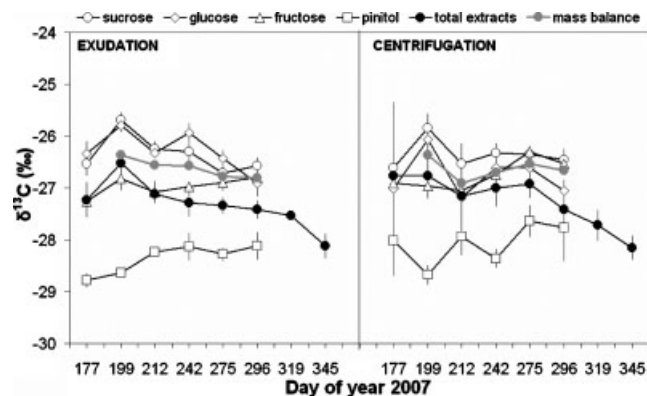


**Figure 4.** Monthly variations in contents of phloem sap compounds extracted from maritime pine trees obtained by exudation in distilled water (left panel) and centrifugation (right panel) methods in 2007. Total sugar content was determined by the anthrone reaction and the individual compounds by HPLC. The left axis corresponds to the mean values of total sugar (dark circles), of the sum of individual sugars (sucrose, glucose and fructose) (grey circles) and sucrose (white circles) contents. The right axis corresponds to the mean values of glucose (white diamonds), fructose (white triangles) and pinitol (white squares) contents. Each data point represents the mean value of five dominant trees. Vertical bars correspond to the standard error.

gation extracted only 45% (fructose), 53% (glucose) and 62% (sucrose) of the amounts obtained by exudation and 47% in the case of total sugar content measured by the anthrone reaction (Table 1). The difference between the amount of sugars assayed by the anthrone reaction and the sum of individual sugars assayed by HPLC (without pinitol, because it is not reactive in the presence of anthrone reagent), was higher with the exudation method than with



**Figure 5.** Hourly changes in total sugar content of phloem sap extracted by two methods: exudation in distilled water (dark symbols) and centrifugation (white symbols) on one maritime pine (*Pinus pinaster*) tree at the Bray site on 26 July 2007. Total sugar content was determined by the anthrone reaction. For the comparison of methods,  $p < 0.0001$  and, for the temporal variation analysis,  $p = 0.665$  (linear regression slope).



**Figure 6.** Monthly variations of carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in phloem sap compounds extracted from maritime pine trees by exudation in distilled water (left panel) and centrifugation (right panel) methods in 2007. Mean  $\delta^{13}\text{C}$  of the sucrose (white circles), glucose (white diamonds), fructose (white triangles) and pinitol (white squares), which were separated by HPLC, mean  $\delta^{13}\text{C}$  measured on total extracts (dark circles) and  $\delta^{13}\text{C}$  values calculated from mass balance using the four constituents separated by HPLC (grey circles) are represented. The data points represent the mean  $\delta^{13}\text{C}$  value of two to five dominant trees. Vertical bars correspond to the standard error.

the centrifugation one: 35% and 20%, respectively (Table 1, last column).

The carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) values of the extracted compounds from the exudation and centrifugation methods from June to December in 2007 were also compared (Fig. 6). The mean carbon isotope composition of the total extracts pooled from June to December 2007 was not significantly different for either extraction method, with  $-27.32 \pm 0.09\text{‰}$  and  $-27.22 \pm 0.12\text{‰}$  for the exudation method and the centrifugation method, respectively (Table 2). Moreover, no significant difference was found between the two methods when comparing the carbon isotope composition of individual sugars, i.e. sucrose, glucose and fructose, with, respectively, mean  $\delta^{13}\text{C}$  values pooled over the 6-month studied period of  $-26.34 \pm 0.09\text{‰}$ ,  $-26.28 \pm 0.10\text{‰}$ ,  $-26.97 \pm 0.08\text{‰}$  for the exudation method and  $-26.37 \pm 0.08\text{‰}$ ,  $-26.79 \pm 0.23\text{‰}$ ,  $-26.69 \pm 0.10\text{‰}$  for the centrifugation method. In the case of pinitol, the carbon isotope composition differed significantly depending on the method applied (Table 2), the pinitol extracted by centrifugation being 0.3‰ higher than that extracted by exudation. For both extraction methods, the mean carbon isotope composition of pinitol pooled over the study period was 1.4 (centrifugation) to 1.8‰ (exudation)  $^{13}\text{C}$ -depleted compared with the mean  $\delta^{13}\text{C}$  of the three sugars. The carbon isotope composition calculated from a mass balance using the values of the four compounds separated by HPLC was not significantly different when comparing the two extraction methods (Table 2, second column from the right-hand side) but the difference between the measured  $\delta^{13}\text{C}$  of total extracts and calculated  $\delta^{13}\text{C}$  from the mass balance was significant (Table 2, last column,  $p < 0.001$ ). This difference, also visible in Fig. 6, was  $-0.56 \pm 0.06\text{‰}$  for the exudation



**Table 2.** Effect of phloem sap extraction method and time of year on the carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of phloem sap compounds. Phloem discs were sampled on *Pinus pinaster*. Upper part gives values mean  $\pm$  SE values for each extraction methods for the data pooled over the studied period ( $n = 6$  to  $8$  from June to December 2007 on two to five pine trees). The exudation of phloem sap was conducted in distilled water. Individual compounds were isolated by HPLC. 'Total extracts', 'mass balance' and 'extracts – mass balance' correspond to the measured  $\delta^{13}\text{C}$  on the total extracts, the calculated  $\delta^{13}\text{C}$  by mass balance using the individual phloem sap compounds and their difference, respectively. Bottom part of the table gives probability values for significant effects of method, time of year and interaction (ANOVA with repeated measurements and ANOVA only for the two last columns, proc GLM, SAS software v 8.02). 'ns' means non-significant effect on the parameter

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)						
	Sucrose	Glucose	Fructose	Pinitol	total extracts	mass balance	extracts - mass balance
Centrifugation	$-26.37 \pm 0.08$	$-26.79 \pm 0.23$	$-26.69 \pm 0.10$	$-28.02 \pm 0.17$	$-27.22 \pm 0.12$	$-26.63 \pm 0.09$	$0.002 \pm 0.16$
Exudation	$-26.34 \pm 0.09$	$-26.28 \pm 0.10$	$-26.97 \pm 0.08$	$-28.32 \pm 0.09$	$-27.32 \pm 0.09$	$-26.65 \pm 0.07$	$-0.561 \pm 0.06$
Method	ns	ns	ns	0.01	ns	ns	0.001
Time	0.001	ns	ns	ns	0.01	ns	ns
Method * time	ns	ns	ns	ns	ns	-	-

and not significant,  $0.002 \pm 0.16\%$ , for the centrifugation method.

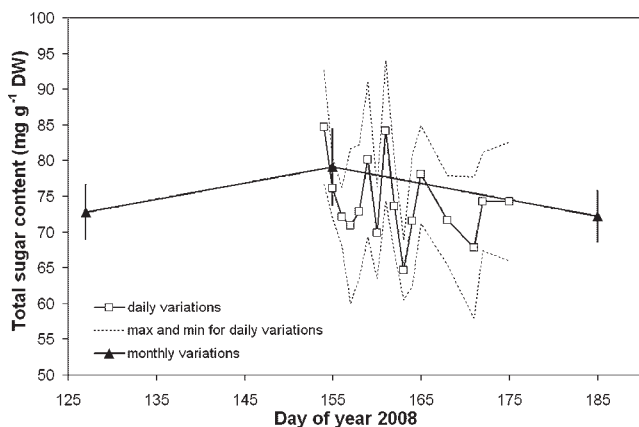
The observed difference in the extraction rate between the two methods could be explained by the difference in the strength applied during extraction. The extraction of phloem sap during centrifugation consists of the detachment of compounds (mainly sugars) linked to phloem tissues by gravity whereas exudation in distilled water displaces molecules by osmosis. Extraction by exudation can be likened to the mechanism of the transfer of assimilates through phloem from source to sink organs, which occurs by osmosis and related pressure flow.<sup>4</sup> Indeed, less sugar can be separated from phloem tissue mechanically than through exchange with molecules of water by osmosis. Therefore, these results suggest that exudation may be more appropriate for quantitative analyses of phloem sap sugars.

The carbon isotope composition of the two types of extracts was similar. However, in the case of exudation, a significant difference was demonstrated between the carbon isotope composition measured on the total extracts and that calculated from a mass balance using values of individual compounds (Fig. 6 and Table 2). This difference can be explained by the fact that, during exudation, compounds, which are  $0.6\%$  more  $^{13}\text{C}$ -depleted on average, might have been extracted in addition to sucrose, glucose, fructose and pinitol. Thus, when studying the discrimination during post-photosynthetic processes (e.g. the transfer of photoassimilates, trunk respiration<sup>13,16</sup> or cellulose synthesis of annual tree rings), the centrifugation method of sugar extraction seems to be more reliable. This is true, as long as the isotopic composition of sugars (i.e. mainly sucrose, glucose and fructose) is targeted but not the carbon isotope composition of the osmotically exchangeable fraction of the phloem, which appears to be constituted by additional compounds. Furthermore, the observed  $\delta^{13}\text{C}$  values of phloem sap extracts of about  $-26\%$  are consistent with previous studies. For example, Kodama *et al.*<sup>13</sup> showed  $\delta^{13}\text{C}$  values of phloem exudate organic matter from *Pinus sylvestris* trunks of about  $-26\%$  for few days in June 2000. Moreover, Keitel *et al.*<sup>15</sup> presented  $\delta^{13}\text{C}$  values of phloem sap from *Fagus sylvatica* ranging from  $-26\%$  to  $-30\%$  between May and September. When studying the carbon isotope composition of individual

sugars, our results show that sucrose and glucose were more  $^{13}\text{C}$ -enriched than fructose, all three being more enriched than pinitol. Our results are consistent with those of Maunoury *et al.* who showed  $\delta^{13}\text{C}$  values of sucrose and fructose from *Quercus petraea* of between  $-23.5\%$  and  $-27\%$  between April and November 2004. They also demonstrated that it was mainly sucrose that was  $^{13}\text{C}$ -enriched rather than fructose. The  $^{13}\text{C}$ -depletion in pinitol (by  $1.4$  to  $1.8\%$  depending on the extraction method used) could be because pinitol is not really a sugar, but in fact a cyclitol that is synthesised from glucose in response to drought stress by substituting a hydroxyl group by a methyl group.<sup>19</sup> Ghashghaie (unpublished data) found a similar result for *myo*-inositol, another cyclitol found in leaves, which is  $^{13}\text{C}$ -depleted compared with sugars. Keppler *et al.*<sup>20</sup> found that the methyl group is strongly  $^{13}\text{C}$ -depleted, which can explain why pinitol is more depleted than *myo*-inositol and than sugars.

### Dynamics of phloem sap compounds

Seasonal variations of total sugar content measured from June 2007 to December 2008 by both methods are shown in Fig. 3. The total phloem sugar content increased significantly in winter 2007, then decreased slowly until summer 2008 and increased again until the end of December (Table 1,  $p < 0.001$ , ANOVA). In addition, the daily values of the total sugar content assessed by the exudation method were not significantly different over a 3-week period in June 2008, with a mean value of  $74 \pm 2 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  ( $p = 0.395$ ) (Fig. 7). On 26 July 2007, no significant trend over time ( $p = 0.665$ ) of the total sugar content for either extraction method was observed (Fig. 5). As a result, significant variations in total sugar content were observed only on a monthly time-scale. In Fig. 4 and Table 1, we also demonstrate that the individual compound contents separated by HPLC, i.e. sucrose, glucose, fructose and pinitol, did not significantly vary over a 6-month period in 2007. However, a difference between the amount of sugars assayed by the anthrone reaction and the sum of individual sugars assayed by HPLC (without pinitol, which is not reactive in the presence of anthrone reagent) was revealed. An anthrone-reactive fraction which was measured as a whole varied according to the time of year, with a



**Figure 7.** Daily changes in the total sugar content (white squares) in maritime pine trees obtained by the exudation method in distilled water (without any agent) over a 3-week period in June 2008. Monthly variations in total sugar content (dark triangles) are also represented over this period. Total sugar content was determined by the anthrone reaction. The data points are means of total sugar content on two different sets of five dominant trees. The error bars correspond to the standard errors and the dotted lines correspond to the minimum and maximum of total sugar content over the 3-week period ( $p = 0.389$ ).

maximum value on day 242, corresponding to 30 August 2007 (Fig. 4). On this day, the total sugar content measured by anthrone was about  $163 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  and  $82 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  for the exudation and centrifugation methods, respectively, and the sugar content calculated as the sum of the three sugars was about  $81 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  and  $53 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  for the exudation and centrifugation methods, respectively (Fig. 4).

The variations in the carbon isotope composition of the total extracts for both methods over a 6-month period in 2007 are significant (Table 2,  $p < 0.001$ ). The  $\delta^{13}\text{C}$  of the extracts increased on day 199, corresponding to 18 July 2007, and mainly decreased from June to December 2007, reaching  $-28\%$  at the end of that year. The carbon isotope composition of glucose, fructose and pinitol did not vary significantly over time, but the variations in the carbon isotope composition of sucrose were significant (Table 2,  $p < 0.001$ ), peaking on day 199, as was the case for the  $\delta^{13}\text{C}$  of the total extracts for both methods.

Seasonal variations were found in the amount of phloem sap compounds extracted by both methods, and in their carbon isotope compositions, but no significant variations on hourly and daily time-scales (in the case of content only). These observed seasonal fluctuations are consistent with data from Maunoury *et al.*<sup>16</sup> they showed significant variations in the concentration of phloem total sugars in oak trunks, with minimum values during the period of trunk growth and maximum values once growth stopped. Therefore, these variations could be related to growth seasonality. Indeed, in summer, the total sugar content is low due to the consumption of sugars during the active growth of cambial tissues. Conversely, the lack of growth in winter allows the total sugar content to increase and the carbon isotope composition to decrease. Moreover, Maunoury *et al.*<sup>16</sup>

showed a minimum value of the  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap sugars of  $-26.6\%$  at the beginning of winter (November) and our results are consistent with this, i.e. a decrease in  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem total extracts, reaching a negative value of about  $-28\%$ . However, a study by Keitel *et al.*<sup>15</sup> on the seasonal dynamics of  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap from *Fagus sylvatica* between May and September 2000 and another one by Brandes *et al.*<sup>21</sup> on the  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap from *P. sylvestris* during the 2004 growing season showed that there was no decrease in  $\delta^{13}\text{C}$  at the end of the sampling period.

Two events are of particular interest: the peak of carbon isotope composition of total extracts and sucrose on day 199 (18 July 2007) and the peak of total sugar content on day 242 (30 August 2007). The latter case could be a response to a brief period of water shortage and to the concurrent cessation of stem enlargement (secondary growth). As previously shown by Nguyen *et al.*,<sup>5</sup> in both shoots and roots of maritime pine seedlings, pinitol can accumulate in response to drought, i.e. by osmotic adjustment. However, we did not detect any significant increase in pinitol content on this day. One reason could be that this period of drought stress was too short to induce a subsequent production of pinitol. Moreover, a period of drought stress should induce stomatal closure, and changes in the carbon isotope composition of newly assimilated carbon in leaves and thus in phloem sugars transferred from the canopy to the base of tree. However, our results showed no significant variations in  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap in August. It may be that the  $\delta^{13}\text{C}$  variations were dampened at the base of trunk of the tree compared with in the canopy. Indeed, Kodama *et al.*<sup>13</sup> showed that on a diurnal time-scale, the observed variations in  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem exudates organic matter at the top of *Pinus sylvestris* tree were not obvious at the base of trunk, which can be explained by a mixing of different pools of carbon during phloem sap transfer down the trunk.<sup>22</sup> On day 199, the total extracts and sucrose were more  $^{13}\text{C}$ -enriched. Such a peak was also shown by Keitel *et al.*<sup>15</sup> in June and by Maunoury *et al.*<sup>16</sup> in May but the origin of this peak has not yet been elucidated.

## CONCLUSIONS

The study revealed that the exudation method is more appropriate than the centrifugation method for quantitative studies of phloem sap compounds, because the quantity of the collected phloem compounds is twice that collected by centrifugation; therefore, extraction is more complete. However, the new centrifugation method appeared to be suitable for studying the carbon isotope composition of phloem sap since the compounds extracted showed no differences in their carbon stable isotope ratio. In addition, this method allows direct extraction without adding any solvent, which avoids any isotopic exchange between the compounds extracted and an external reagent. This might also prove important for the assessment of the oxygen isotope composition of phloem-transported sugars as the free carbonyl group of glucose and fructose might readily exchange oxygen with the exudation water.

The temporal dynamics of phloem sap content and carbon isotope composition have been studied on different time-scales: hourly, daily and monthly throughout a whole year.

Monthly variations of both content and carbon isotope composition with two particular events have been highlighted and related to growth seasonality. The phloem sap content of maritime pine showed no significant hourly or daily variations.

### Acknowledgements

This study was supported by the CARBOEUROPE project (Directorate General XII, European Commission, GOCE-CT-2003-505572), by the Aquitaine region project ("DURABILITE du SYSTEME de PRODUCTION FORET-BOIS d'AQUITAINE") and by INRA, division "Forest, Grassland and Freshwater Ecology". We would like to thank the Platform "Métabolisme-Métabolome" of the IFR 87 "La plante et son environnement" for the carbon isotope analysis.

### REFERENCES

1. Badeck FW, Tcherkez G, Nogués S, Piel C, Ghashghaie J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; **19**: 1381.
2. Bathellier C, Badeck FW, Couzi P, Harscoët S, Mauve C, Ghashghaie J. *New Phytol.* 2008; **177**: 406.
3. Gessler A, Tcherkez G, Peuke AD, Ghashghaie J, Farquhar GD. *Plant Cell Environ.* 2008; **31**: 941.
4. Dinant S. *Comp. Rend. Biol.* 2008; **331**: 334.
5. Nguyen A, Lamant A. *Phytochemistry* 1988; **27**: 3423.
6. Pate JS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1980; **31**: 313.
7. Fisher DB, Frame JM. *Planta* 1984; **161**: 385.
8. Costello LR, Bassham JA, Calvin M. *Plant Physiol.* 1982; **69**: 77.
9. Schneider S, Gessler A, Weber P, vonSengbusch D, Hanemann U, Rennenberg H. *New Phytol.* 1996; **134**: 103.
10. Rennenberg H, Schneider S, Weber P. *J. Exp. Bot.* 1996; **47**: 1491.
11. Gessler A, Rennenberg H, Keitel C. *Plant Biol.* 2004; **6**: 721.
12. Tcherkez G, Farquhar GD, Badeck FW, Ghashghaie J. *Funct. Plant Biol.* 2004; **31**: 857.
13. Kodama N, Barnard RL, Salmon Y, Weston C, Ferrio JP, Holst J, Werner RA, Saurer M, Rennenberg H, Buchmann N, Gessler A. *Oecologia* 2008; **156**: 737.
14. Gholz HL, Cropper WP Jr. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 1991; **21**: 1742.
15. Keitel C, Adams MA, Holst T, Matzarakis A, Mayer H, Rennenberg H, Gessler A. *Plant Cell Environ.* 2003; **26**: 1157.
16. Maunoury F, Berveiller D, Lelarge C, Pontauiller JY, Vanbostal L, Damesin C. *Oecologia* 2007; **151**: 268.
17. Bachelier G, Gavinelli R. *Cah. ORSTOM. sér. Pédol.* 1966; **IV**: 97.
18. Duranceau M, Ghashghaie J, Badeck FW, Deléens E, Cornic G. *Plant Cell Environ.* 1999; **22**: 515.
19. Loewus FA, Murthy PN. *Plant Sci.* 2000; **150**: 1.
20. Keppler F, Kalin RM, Harper DB, McRoberts WC, Hamilton JTG. *Biogeosciences* 2004; **1**: 123.
21. Brandes E, Wenninger J, Koeniger P, Schindler D, Rennenberg H, Leibundgut C, Mayer H, Gessler A. *Plant Cell Environ.* 2007; **30**: 113.
22. Brandes E, Kodama N, Whittaker K, Weston C, Rennenberg H, Keitel C, Adams MA, Gessler A. *Glob. Change Biol.* 2006; **12**: 1922.





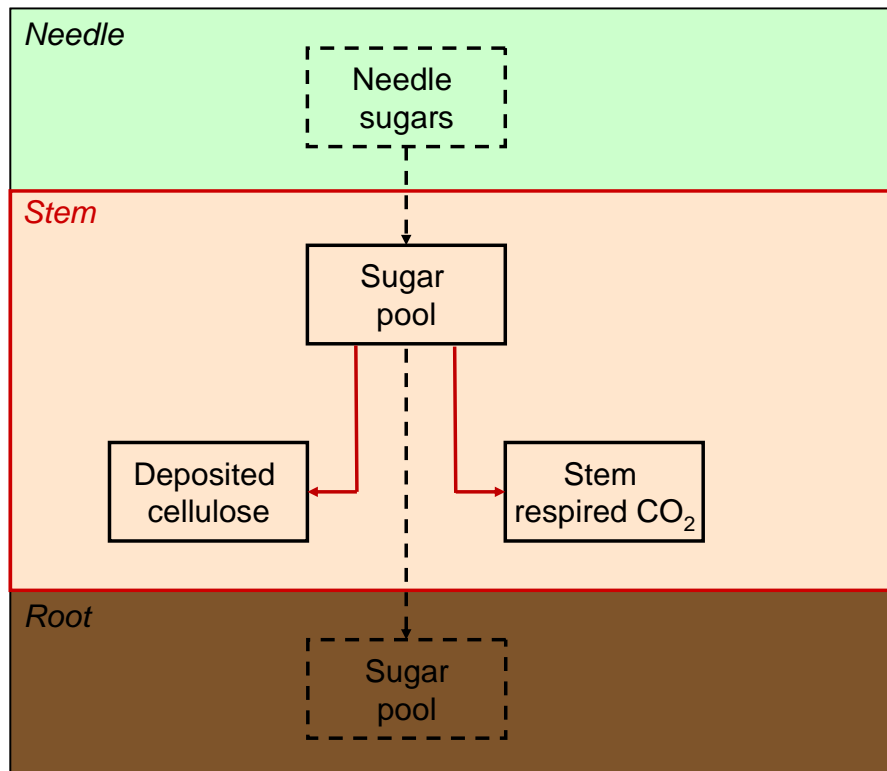
## Chapitre 4

---

# Les fractionnements isotopiques post-photosynthétiques



## Fractionnement isotopique post-photosynthétique lors des processus de « respiration » du tronc et de synthèse de cellulose du xylème du tronc



### Publication:

Marion Devaux, Jérôme Ogee, Didier Bert, Alexandre Bosc, Lisa Wingate, Régis Burllett, Catherine Lambrot, Michel Sartore and Denis Loustau. **Seasonal patterns of carbon isotope ratios of soluble sugars, stem respired CO<sub>2</sub> and wood cellulose in a *Pinus pinaster* stand** (soumis à New Phytologist)

### Article en co-auteur (Annexe I):

Lisa Wingate, Jérôme Ogée, Régis Burllett, Alexandre Bosc, Marion Devaux, John Grace, Denis Loustau & Arthur Gessler. **Photosynthetic carbon isotope discrimination and its relationship to the carbon isotope signals of stem, soil and ecosystem respiration** (2010)





## Sommaire

Summary .....	84
1 Introduction .....	85
2 Materials and methods .....	89
2.1 Study site .....	89
2.2 Plant material.....	89
2.3 Carbon isotope analysis of phloem sugars .....	89
2.4 Gas exchange measurements.....	90
2.4.1 Stem chambers design.....	90
2.4.2 TDLAS measurements .....	91
2.4.3 Carbon isotope analysis of stem CO <sub>2</sub> efflux .....	91
2.5 Carbon isotope analysis of cellulose of annual tree-rings.....	91
2.6 Dendrometry and wood density measurements .....	92
2.7 Data processing .....	92
2.7.1 Dating of densitometry and cellulose isotope data.....	92
2.7.2 Mass balance calculations .....	93
3 Results .....	95
3.1 Wood growth and climate conditions.....	95
3.2 Seasonal dynamics of carbon isotope ratio of phloem sugars, wood cellulose and stem CO <sub>2</sub> efflux .....	95
3.3 Carbon isotope mass balance at stem base.....	97
4 Discussion .....	99
4.1 Seasonal variations in carbon isotopic signatures of phloem sugars, cellulose of tree-rings and stem respired CO <sub>2</sub> .....	99
4.2 Opposite post-photosynthetic fractionations.....	100
4.3 Stem carbon isotopic mass balance .....	101
5 Conclusions .....	102
Acknowledgements .....	102
References .....	103

## Tables

**Table 1** | Description of studied pines at Le Bray site for stem CO<sub>2</sub> efflux measurements, for needle and phloem sugars analysis and for cellulose analysis of tree rings. The numeric code of pines for the site, the numeric code of 2 pines which results on gas exchange, on needle and phloem sugars and on cellulose of tree-rings are displayed in this paper, the diameter at breast height (DBH) of pines measured in 2006 and the sampling period of measurements on pines are shown.

## Figure legends

**Figure 1** | Seasonal variations of (a) stem radial increment, (b) wood and cellulose density profiles and (c) soil water content and daily rainfall measured in 2007 and 2008 at Le Bray site. The shaded area indicates the stem growth period, estimated as the period when stem radial increment is above 0.0033 mm d<sup>-1</sup>. When soil water content falls below a threshold of 80 kg m<sup>-2</sup> (dashed line in panel c), the trees usually experience drought stress and wood density is maximum.

**Figure 2** | Seasonal variations of (a) the carbon isotope compositions of wood cellulose ( $\delta^{13}C_C$ ), phloem sugars ( $\delta^{13}C_P$ ) and stem CO<sub>2</sub> efflux ( $\delta^{13}C_F$ ), (b) the carbon fluxes allocated to stem respiration ( $C_F$ ) and cellulose synthesis ( $C_C$ ) and (c) the main two terms of the carbon budget at stem base.  $\delta^{13}C_P$  data consists of a mean value on 5 to 10 trees. Stem CO<sub>2</sub> flux data was collected at canopy height (16 m), while cellulose and phloem sampling was performed at stem base (1.3 m). In panels a and b, a 2-week flux-weighted moving average has been applied on the stem CO<sub>2</sub> efflux data. The shaded area indicates the stem growth period, estimated as the period when stem radial increment is above 0.0033 mm d<sup>-1</sup>.

**Figure 3** | Temporal dynamics of (a) the carbon isotope composition of stem CO<sub>2</sub> efflux (b) stem CO<sub>2</sub> efflux and (c) stem temperature at about 16m and 1.3m above ground (beneath canopy and breast height respectively) at the end of the 2008 growing season. In panels a and b, only the 2-week flux-weighted moving average values ( $\pm$  standard deviation) are shown.

## **Seasonal patterns of carbon isotope ratios of soluble sugars, stem respired CO<sub>2</sub> and wood cellulose in a *Pinus pinaster* stand**

M. Devaux<sup>1</sup>, J. Ogée<sup>1</sup>, D. Bert<sup>1,2</sup>, L. Wingate<sup>1</sup>, A. Bosc<sup>1</sup>, R. Burllett<sup>1</sup>, C. Lambrot<sup>1</sup>, M. Sartore<sup>1</sup>  
& D. Loustau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA-EPHYSE, UR1263, 33140 Villenave d'Ornon, France

<sup>2</sup> Now at INRA-BIOGECO, UMR1202, 33610 Cestas, France

*Corresponding author:*

Denis Loustau OR Jérôme Ogée

INRA-EPHYSE

BP 81

33883 Villenave d'Ornon cedex

France

phone: +33(0)557122415 OR 2412, fax: +33(0)557122420

e-mail: [Loustau@pierroton.inra.fr](mailto:Loustau@pierroton.inra.fr) OR [jogee@bordeaux.inra.fr](mailto:jogee@bordeaux.inra.fr)

## Summary

- If carbon isotope discrimination during photosynthesis is relatively well documented, information on post-photosynthetic discrimination processes during phloem transport, stem cambial respiration and wood cellulose synthesis is scarcer and general patterns still need to be found.
- Here, we followed changes in the carbon isotope ratio of phloem sugars, stem CO<sub>2</sub> efflux and wood cellulose in response to environmental conditions over two growing seasons.
- During the growing season, compared to the carbon isotope composition of phloem sugars, cellulose is <sup>13</sup>C-enriched by 0.5‰ to 2.7‰ whereas stem CO<sub>2</sub> efflux was <sup>13</sup>C-depleted by 0.8‰ to 1.8‰. Out of the wood growth, the carbon isotope composition of phloem sugars corresponds to stem CO<sub>2</sub> efflux.
- Post-photosynthetic fractionations were revealed during stem respiration and wood formation and are counterbalanced in carbon fluxes. In conclusion, in case of wet climates and of *P. pinaster* specie, trees are assumed to use phloem sugars for these two processes, with a potential remobilisation of its reserves, during the growth period and to only consume phloem sugars for stem respiration out of this period.

**Keywords:** Isotope dendro-climatology, carbon cycle, phloem sugars, wood cellulose, stem respiration, Maritime pine

## 1 Introduction

The stable carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of wood cellulose has been proposed as a good recorder of past climate variations (Francey *et al.*, 1982; McCarroll *et al.*, 2004). This is because, during leaf photosynthesis,  $^{13}\text{CO}_2$  molecules are discriminated from  $^{12}\text{CO}_2$  molecules as they diffuse through the leaf boundary-layer, the stomatal pores and the mesophyll cells and during  $\text{CO}_2$  hydration and carboxylation inside the leaf (Farquhar *et al.*, 1982). As a consequence current assimilates, the primary substrate for plant metabolism, are depleted in  $^{13}\text{C}$  compared to atmospheric  $\text{CO}_2$  to an extent that depends on stomatal and photosynthetic regulation and thence on climate variables such as relative humidity, temperature or soil moisture. Good examples in support of this theory are studies showing that the  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap in woody stems is correlated with canopy stomatal conductance (Keitel *et al.*, 2003) or drought intensity (Barbour *et al.*, 2002; Peuke *et al.*, 2006).

However, all structural and non-structural plant C pools do not have the same carbon isotopic ratio suggesting that carbon isotope discrimination during post-photosynthetic processes should also be considered. For instance, Badeck and colleagues showed that heterotrophic (i.e. non-photosynthesising) tissues are generally  $^{13}\text{C}$ -enriched (by 1.26‰ on average) compared with leaves although, for trees, this difference between the  $\delta^{13}\text{C}$  of woody stems and leaves varied strongly among species, from -8‰ to +2‰ (Badeck *et al.*, 2005). Carbon isotope fractionation during phloem loading and transport or during respiration of heterotrophic organs was advanced as two plausible explanations (Badeck *et al.*, 2005). More recently, Cernusak and colleagues proposed and discussed six hypotheses to explain the observed enrichment in the  $\delta^{13}\text{C}$  of heterotrophic tissues compared with bulk leaf  $\delta^{13}\text{C}$  in  $\text{C}_3$  plants (Cernusak *et al.*, 2009). These hypotheses were (1) differences in biochemical composition between heterotrophic tissues and leaves, (2) seasonal separation of leaf growth and heterotrophic tissue formation, (3) differential use of day- vs. night-time leaf sucrose between foliage and sink organs, (4) isotopic fractionation associated with plant respiration, (5) carbon fixation by PEP carboxylase and (6) developmental variation in photosynthetic discrimination against  $^{13}\text{C}$  during leaf expansion. The conclusion of this synthesis was that all six hypotheses may contribute to the general pattern, although the last one remains largely circumstantial, and that direct tests of each of these hypotheses should be carried out to provide insight into the mechanisms causing within-plant variation in carbon isotope composition. Other processes, such as starch formation and hydrolysis in storage organs or cellulose and lignin synthesis, could also fractionate carbon isotopes and participate to the difference in the  $\delta^{13}\text{C}$  of wood cellulose and that of current assimilates and thence dilute the climate signal in the isotope archive (Hemming *et al.*, 2001; Helle *et al.*, 2004; Keel *et al.*, 2007; Ogée *et al.*, 2009).

Because phloem sugars is the main carbon source for wood synthesis but also for stem respiration, tracking simultaneously the seasonal changes in the  $\delta^{13}\text{C}$  signals of phloem

sugars, stem CO<sub>2</sub> efflux and wood cellulose should provide insights on possible fractionation processes during cellulose formation. For example, Cernusak et al. (2005) observed in *Eucalyptus globulus* that the  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose extracted from recently differentiated xylem tissues matched that of phloem sap sugars, suggesting no fractionation during wood cellulose synthesis. In contrast, Gessler and colleagues found in *Pinus sylvestris* that the carbon isotope composition of stem phloem sugars and newly-formed wood followed similar seasonal patterns but with systematic more enriched  $\delta^{13}\text{C}$  values in the wood (Gessler *et al.*, 2009). Because lignin, the other main wood constituent, is usually <sup>13</sup>C-depleted compared to whole wood (Wilson *et al.*, 1977; Loader *et al.*, 2003), a systematic <sup>13</sup>C enrichment in whole wood suggests a strong isotopic fractionation during cellulose synthesis from phloem sap sugars. In addition, from a mass balance point of view, this systematic <sup>13</sup>C enrichment in whole wood compared to phloem sugars seems difficult to reconcile with the observed <sup>13</sup>C enrichment in the stem CO<sub>2</sub> efflux compared to the organic substrate (Brandes *et al.*, 2006; Maunoury *et al.*, 2007; Kodama *et al.*, 2008). Indeed, if phloem sap sugars are the only substrate for both stem respiration and wood synthesis, we would expect these two processes to compensate each other isotopically (Gessler *et al.*, 2009). Seasonal changes could also complicate this picture as the difference between the  $\delta^{13}\text{C}$  of respired CO<sub>2</sub> and phloem sap has been shown to vary strongly with phenological events (Maunoury *et al.*, 2007).

The goal of this study was to explore how the different isotope fractionations associated with stem CO<sub>2</sub> production and wood formation vary over a growing season and verify if they compensate each other in the carbon isotope mass balance at the tree trunk level. For this, we monitored simultaneously over two growing seasons in a *Pinus pinaster* stand the  $\delta^{13}\text{C}$  of (1) phloem water-soluble fractions, (2) stem respiration at two levels, beneath the canopy and at stem base, and (3) wood cellulose. Stem CO<sub>2</sub> efflux, phloem sugar concentrations and wood density profiles were also measured in order to estimate the main components of the carbon mass balance of the tree stem.





**Table 1** | Description of studied pines at Le Bray site for stem CO<sub>2</sub> efflux measurements, for needle and phloem sugars analysis and for cellulose analysis of tree rings. The numeric code of pines for the site, the numeric code of 2 pines which results on gas exchange, on needle and phloem sugars and on cellulose of tree-rings are displayed in this paper, the diameter at breast height (DBH) of pines measured in 2006 and the sampling period of measurements on pines are shown.

Tree ID	DBH (m)	Phloem	Cellulose	CO <sub>2</sub> efflux (1.3m)	CO <sub>2</sub> efflux (16m)
3373	0.32		✓	✓	✓
3476	0.29			✓	
3608	0.33			✓	
4998	0.43	✓			
5107	0.43	✓			
5114	0.43	✓			
6130	0.43	✓	✓		
6199	0.45	✓			
4216	0.44	✓			
4517	0.45	✓			
4888	0.44	✓			
5008	0.43	✓			
5092	0.44	✓			

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study site

The study was conducted at Le Bray site, a 39yr-old Maritime pine stand (*Pinus pinaster* Ait.) located at about 20km South-West of Bordeaux (44°43'N, 0°46'W, altitude 62m), France. The understory vegetation consists mainly of purple moor grass (*Molinia Coerulea* Moench.) and the soil is a sandy hydromorphic humic podzol, subject to high water table rise in winter and pronounced edaphic stress in summer (Loustau *et al.*, 1990; Berbigier *et al.*, 2001; Ogée & Brunet, 2002). Since 1990 and within the framework of several European projects, this site has been the subject of many ecological studies, on energy and mass exchange (Berbigier *et al.*, 2001; Stella *et al.*, 2009), tree photosynthesis and respiration, architecture and growth (Porté *et al.*, 2000), and tree-ring carbon and oxygen isotope signals (Ogée *et al.*, 2009). Over the study period, soil water content, climate (air temperature and humidity, rainfall, radiation, wind speed) and water and CO<sub>2</sub> ecosystem exchange were measured continuously following the CarboEurope protocol (Berbigier *et al.*, 2001; Stella *et al.*, 2009).

### 2.2 Plant material

The individual trees used for our study are listed in Table 1. Up to 3 trees were selected for stem CO<sub>2</sub> gas exchange measurements, and 5 to 10 trees were sampled for phloem sugar analysis. For each of these two clusters, 1 individual was selected for cellulose extraction and isotope analysis. To avoid any cross disturbances (e.g. due to the phloem punching), phloem sampling was not conducted on the same individuals used for stem CO<sub>2</sub> exchange but on other dominant or co-dominant trees within the same stand.

### 2.3 Carbon isotope analysis of phloem sugars

Using a 12mm-diameter puncher, a set of 3 phloem discs at 1.3 m from 5 to 10 dominant trees (Table 1) were collected monthly from June 2007 to December 2008, between 09:00am and 11:00am (local time). The bark and xylem parts of the phloem discs were removed in the field with a scalpel and the remaining phloem samples were immediately bathed in distilled water for exudation and taken back to the lab for sugar analysis.

Sugars from phloem discs were extracted by the exudation technique (Devaux *et al.*, 2009). Briefly, each set of 3 phloem discs was left in 6 mL of distilled water during four hours for exudation. Phloem exudates were then transferred into tin capsules, oven-dried at 65°C for 12h, and injected into an elemental analyser (N-A-1500; Carlo-Erba, Milan, Italy) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS VG Optima; Micromass, Villeurbanne, France) to assess their carbon isotope compositions. Glutamic acid was used as a working standard for phloem sugar analysis and measured every 12 samples to correct for potential

drift of the IRMS. The carbon isotope composition of phloem sugars ( $\delta^{13}C_P$ ) was then expressed relative to the international standard Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB).

## **2.4 Gas exchange measurements**

Stem CO<sub>2</sub> exchange was measured in the field using a tuneable diode laser absorption spectrometer (TDLAS, TGA100A, Campbell Scientific Inc., Logan Utah, USA) connected to open chambers attached to the tree stems at two levels (1.3 m above ground or just below the canopy, at about 16 m). Inside each chamber, air temperature and relative humidity were measured (CS215, Campbell Scientific, Loughborough, U.K.) and recorded on a data logger (CR21X, Campbell Scientific Ltd., Shepster, U.K.). On two azimuthal directions (North-East, South-West), stem temperature 5 mm below the bark surface was measured with a copper-constantan thermocouple and recorded on the same data logger.

### **2.4.1 Stem chambers design**

Two different designs of stem chambers were used. The first model was used for stem CO<sub>2</sub> efflux measurements just beneath the crown (ca. 16 m) in 2007 and 2008 on one tree. The second model was used for stem CO<sub>2</sub> efflux measurements at breast height (1.30 m) on three different trees in 2008 only.

The chamber used beneath the canopy consisted of a transparent extruded acrylic cylinder attached to two acrylic panels at the top and base that were sealed around the stem bole with compact foam and putty. The trunk area was 9.05 dm<sup>2</sup> in 2007 and was increased to 13.57 dm<sup>2</sup> in 2008. Mixing of air inside the chamber was provided continuously by one or two fans, depending on the chamber size. The air was pulled through the chamber by an external pump connected on the chamber outlet and the air mass flow was regulated (Tylan FC29014S, Millipore Ltd., Watford, UK) at a value of 2 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> (April-Sept 2007) or 1 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> (Oct-Dec 2007).

The chambers installed at stem base consisted of a non-rigid transparent polyethylene sheet stretched between two circular frames that were attached and sealed to the tree stem. Because stem CO<sub>2</sub> fluxes near the ground are smaller compared to those at canopy height, a larger stem surface area was enclosed in the chamber to increase the difference in CO<sub>2</sub> mixing ratios between input and output airstreams and maintain a sufficient measurement precision. In summer and fall 2008, the stem area enclosed in the chamber was 40.83 dm<sup>2</sup>, 49.53 dm<sup>2</sup> and 72.51 dm<sup>2</sup> depending on the tree measured. In winter 2008, one of these chambers was further lengthened to cover a stem area of 90.51 dm<sup>2</sup>. Mixing of air inside the chambers was provided continuously by one or two fans, depending on the chamber size. To avoid the entry of external air in the chamber through possible leaks and attenuate the fluctuations of CO<sub>2</sub> concentration on the chamber inlet, air was sucked from a well-mixed 250-dm<sup>3</sup> buffer tank and pushed through the chamber at a flow rate of 3.5 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>, creating a slight overpressure

in the chamber. This system was applied on stem chambers at the two levels, beneath canopy and at stem base for stem efflux measurements in 2008.

### 2.4.2 TDLAS measurements

The experimental setup, sampling sequence and calibration of CO<sub>2</sub> isotope data are described in detail elsewhere (Wingate *et al.*, 2010). In brief, every 2.5 h, one stem chamber was selected and the CO<sub>2</sub> concentrations and isotope ratios of the inlet and outlet were measured sequentially for 1 minute with 3 to 4 replicates. The air streams entered the TDLAS manifold and was pulled through stainless steel tubing of 0.04-inch internal diameter (Lyon Vannes et Raccords, Bron, France), a small Nafion dryer (PD625, Perma pure Inc., NJ, USA) and a mass flow controller (MC-0.5SCCM-D, Alicat Scientific, Tucson, AZ, USA) before entering the TDLAS. The 1 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> supply of dry air required to operate the small Nafion dryer was obtained from a second larger Nafion dryer (PD100, Perma pure Inc., NJ, USA) purged at 3 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>.

### 2.4.3 Carbon isotope analysis of stem CO<sub>2</sub> efflux

The stem CO<sub>2</sub> efflux ( $F$ ) and carbon isotope composition of stem CO<sub>2</sub> efflux ( $\delta^{13}C_F$ ) were calculated from isotopic mass balance, assuming steady state (Wingate *et al.*, 2010):

$$F = \frac{D_m}{S} (C_{out} - C_{in}) \quad (1)$$

$$\delta^{13}C_F = \frac{\delta^{13}C_{out} C_{out} - \delta^{13}C_{in} C_{in}}{C_{out} - C_{in}} \quad (2)$$

where  $D_m$  is the molar flow rate through the stem chamber (mol s<sup>-1</sup>),  $S$  is the stem area inside the chamber (m<sup>2</sup>),  $C_{out}$  and  $C_{in}$  are the mole fractions of CO<sub>2</sub> in the air leaving and entering the chamber (ppm) and  $\delta^{13}C_{out}$  and  $\delta^{13}C_{in}$  are their carbon isotopic composition (‰ VPDB).

## 2.5 Carbon isotope analysis of cellulose of annual tree-rings

In summer 2009 the two trees selected for intra-annual carbon isotope measurements in wood cellulose (Table 1) were cored at breast height on an East-West axis using an increment borer with a large internal diameter (12 mm). The cores were then smoothed with a sharp blade and scanned at 1200-dpi resolution to measure the tree-ring, earlywood and latewood width using the Windendro software (Regent Instruments Inc., Québec City, Canada). Contiguous, 100µm-thick wood slices were cut using a rotary microtome (LEICA RM 2255, Leica Microsystems, Bensheim, Germany) and milled in 1.5mL Eppendorf tubes using an ultra-centrifugal crusher (Retsch MM300, Hann, Germany). Holocellulose was then extracted following the Jayme-Wise method (Leavitt *et al.*, 1993), using Teflon (PTFE) membrane filters (11803-047 N, Sartorius, Palaiseau, France) sealed with labelled Teflon tape. Finally for each sample, 1 mg of cellulose was transferred into a tin capsule and introduced into an elemental analyser (NA 1500, CE Instruments, Milan, Italy) coupled with an isotope ratio

mass spectrometer (DeltaS, Finigan, Bremen, Germany) to assess the carbon isotope composition of cellulose ( $\delta^{13}C_C$ ). Laboratory standards were also measured every 12 samples to correct for possible drift of the IRMS.

## **2.6 Dendrometry and wood density measurements**

In 2007 and 2008, a 2 $\mu$ m-resolution dendrometer monitored hourly stem diameter variations at breast height on the tree where gas exchange and cellulose measurements were performed simultaneously (Table 1). On the same tree, a 5-mm-wide core was sampled at breast height from pith to bark on the eastern azimuth for wood density profile analysis. The core was cut in 2-mm-long pieces, soaked in pentane for 24 h to remove resins and then stored in 12% humidity before exposure to X-rays (Seiffert Isovolt 3003 X-ray generator, GE Sensing & Inspection Technologies, Ahrensburg, Germany). A radial wood density profile was then obtained using the Windendro software (Regent Instruments Inc., Québec City, Canada).

## **2.7 Data processing**

### **2.7.1 Dating of densitometry and cellulose isotope data**

In order to distribute on the time axis the densitometry and cellulose isotope data, we calculated the initiation time  $t_{0,i}$  and cell wall maturation time  $\Delta t_i$  for each wood slice. Then each value was distributed on the time axis at  $t_{0,i} + \Delta t_i / 2$  and a linear temporal interpolation was performed in-between each data point.

Stem radial increment measurements were used to determine the period of wood growth [ $t_{\min}$ ,  $t_{\max}$ ] and the initiation times  $t_{0,i}$ . In order to filter out stem radial variations due to processes unrelated to growth (thermal expansion, hydraulic shrinkage,...), we first fitted a Gompertz-type curve on the data (Rossi *et al.*, 2003). The wood growth period was then determined as the time when stem radial daily increment ( $dr/dt$ ) is above a prescribed threshold (0.0033 mm d<sup>-1</sup>). This threshold was chosen to capture most of the observed radial increment period (between 1% and 95%) and to agree with other dendrometry measurements performed on other trees nearby. Initiation times  $t_{0,i}$  were then determined, based on the average distance of each wood slice from the ring transition ( $r_i$ ) and using the fitted curve  $r(t)$  over the wood growth period [ $t_{\min}$ ,  $t_{\max}$ ]:  $r(t_{0,i}) = r_i$ . Because the annual sums of stem radial increment could differ by up to 0.5 mm with ring widths observed on the tree cores used for wood density and wood cellulose isotope analysis, we first needed to rescale the dendrometry curve over the period [ $t_{\min}$ ,  $t_{\max}$ ].

The average cell wall deposition time for each wood slice was taken proportional to its cellulose content. For that we first determined, from the ratio of the sample weights used for cellulose isotope analysis before and after cellulose extraction, the radial variations in the percentage of cellulose content in the wood. Combined with the wood density profile measurements, we then constructed a cellulose density profile ( $d_{c,i}$  in kg m<sup>-3</sup>) for both

densitometry and cellulose isotope data. Deposition time was then estimated as the product of cellulose density and thickness ( $e_i$ ) of the wood slice, i.e.,  $\Delta t_i \propto d_{c,i}e_i$ .

### 2.7.2 Mass balance calculations

Carbon mass balance calculations were performed on a daily basis assuming a stem surface of  $1 \text{ m}^2$ , located around at 1.3 m above ground. The amount of carbon released per day by stem respiration,  $C_F$  ( $\text{gC m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ), is:

$$C_F(t) = F(t)M_C\tau_d \quad (3)$$

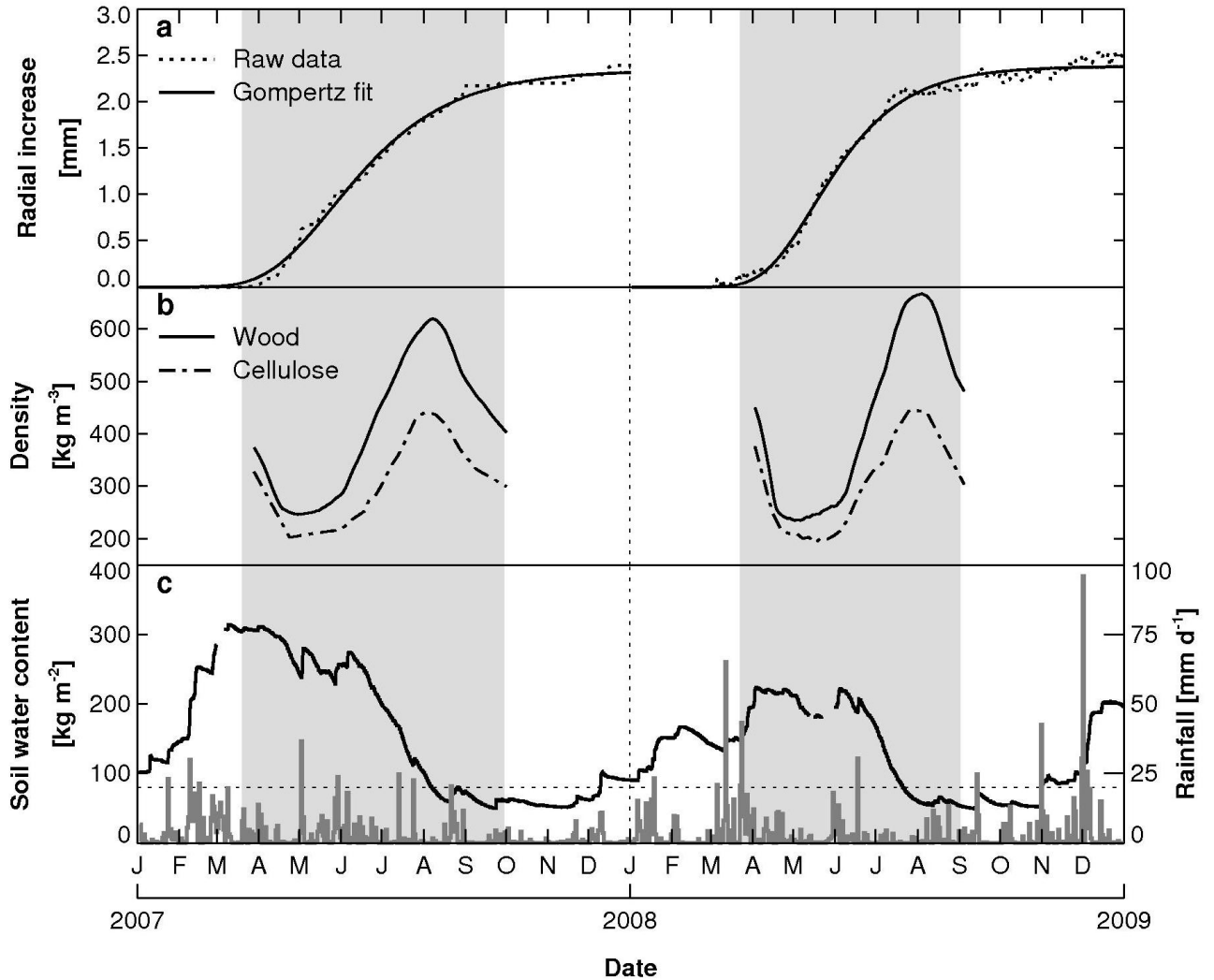
where  $M_C$  is the molar weight of carbon ( $12 \text{ gC mol}^{-1}$ ),  $\tau_d$  is day length (86400 s) and  $F$  is the daily stem  $\text{CO}_2$  efflux at 1.3 m and time  $t$ . When flux measurements were performed at 16 m only (i.e. in 2007), the latter were used with a correction factor of 1.39 that we estimated by performing a linear regression between flux data at the two levels during periods when both levels were monitored simultaneously ( $R^2 = 0.90$ ).

The amount of carbon incorporated daily into the stem cellulose,  $C_C$  ( $\text{gC m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ), was estimated from the wood density and radial increment curves over the growth period:

$$C_C(t) = f_C d_w(t) f_{\text{cellulose}}(t) \frac{dr}{dt} \quad (4)$$

where  $f_C$  is the mass fraction of carbon in cellulose ( $f_C = 0.4445 \text{ gC g}(\text{cellulose})^{-1}$ ),  $d_w(t)$  ( $\text{g m}^{-3}$ ) is density of wood deposited at time  $t$  and  $f_{\text{cellulose}}(t)$  ( $\text{g}(\text{cellulose}) \text{ g}(\text{wood})^{-1}$ ) is the mass fraction of cellulose in wood deposited at time  $t$ .

**Figure 1** | Seasonal variations of (a) stem radial increment, (b) wood and cellulose density profiles and (c) soil water content and daily rainfall measured in 2007 and 2008 at Le Bray site. The shaded area indicates the stem growth period, estimated as the period when stem radial increment is above  $0.0033 \text{ mm d}^{-1}$ . When soil water content falls below a threshold of  $80 \text{ kg m}^{-2}$  (dashed line in panel c), the trees usually experience drought stress and wood density is maximum.



## 3 Results

### 3.1 Wood growth and climate conditions

Stem radial increments over 2007 and 2008 from the point dendrometer are shown in Fig. 1, alongside wood and cellulose density profiles, soil water content in the root zone and precipitation. From our estimation, the wood growth period occurred between day 77 (18<sup>th</sup> March) and day 271 (26<sup>th</sup> September) in 2007 and between day 81 (21<sup>st</sup> March) and day 244 (1<sup>st</sup> September) in 2008 (Fig. 1a). The period of fast growth, where most of the stem radial increment was achieved, ended about 6 weeks earlier in 2008 than in 2007 and roughly coincided with the maximum wood density (Fig. 1a and 1b) and with the time when soil water content in the root zone dropped below 80kg m<sup>-2</sup> (Fig. 1c). Wood density profiles clearly reflected variations in soil moisture. Indeed, the rapid transition between the lowest and the highest wood density values coincided for both years with the period in summer when soil moisture dropped (Fig. 1b and 1c). The amplitude of the wood density profile was also higher in 2008 than in 2007, reflecting earlier and more pronounced soil water deficit in 2008.

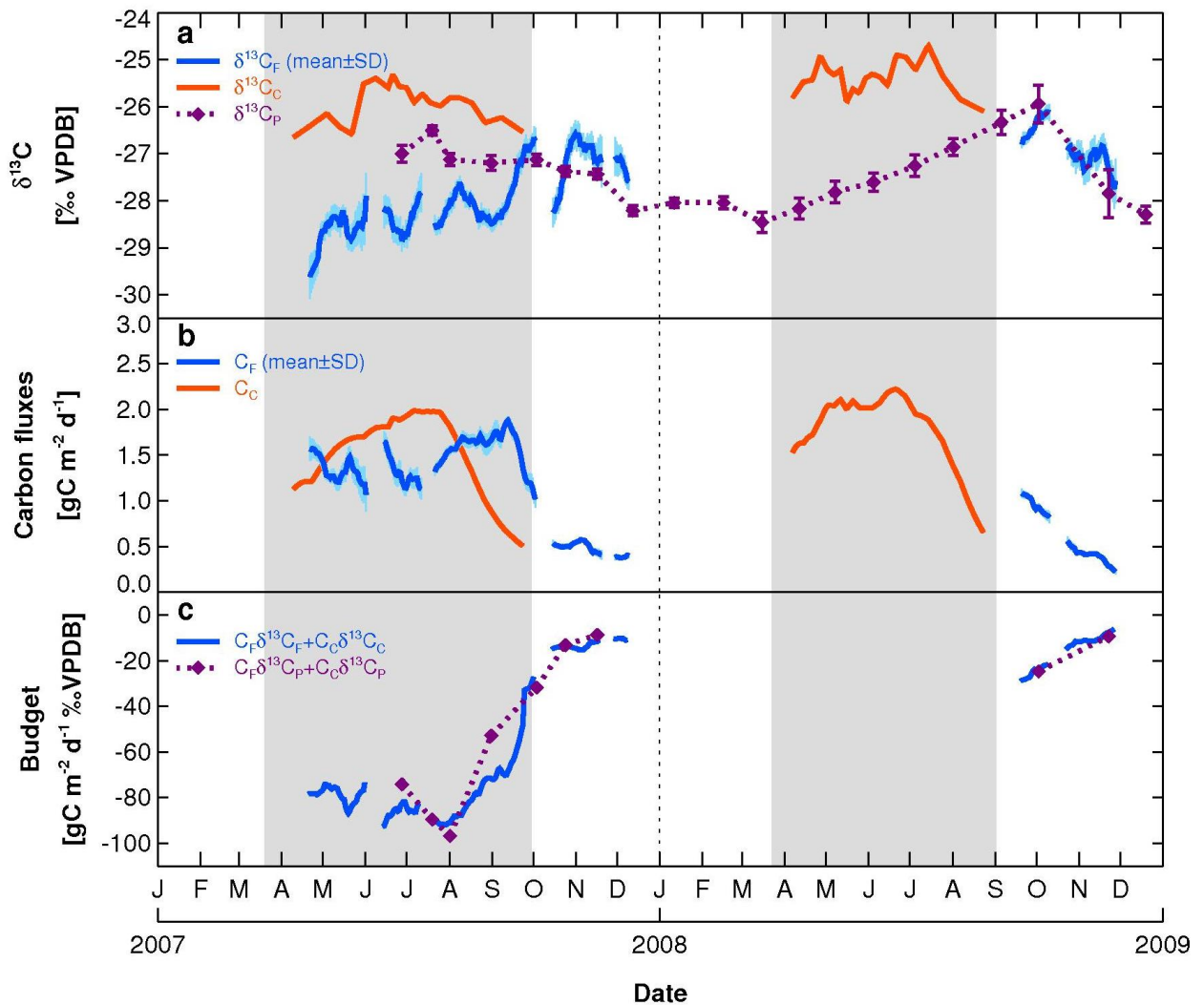
### 3.2 Seasonal dynamics of carbon isotope ratio of phloem sugars, wood cellulose and stem CO<sub>2</sub> efflux

Carbon isotopic ratios variations of phloem sugars ( $\delta^{13}C_P$ ), wood cellulose ( $\delta^{13}C_C$ ) and stem CO<sub>2</sub> efflux ( $\delta^{13}C_F$ ) in 2007 and 2008 are shown in Fig. 2a. For both years  $\delta^{13}C_P$  remained fairly constant around -28‰ in winter and exhibited more enriched values during the growing season. This summer enrichment was weaker and peaked earlier in 2007 compared to 2008. In 2007, the most enriched value (-26.5‰) was reached on day 199 (18<sup>th</sup> July) whereas in 2008,  $\delta^{13}C_P$  increased steadily from -28.5‰ to -26.0‰ at the very end of the growing season.

A stronger enrichment in 2008 compared to 2007 is also noticeable in the wood cellulose, with mean  $\delta^{13}C_C$  values of  $-26.0 \pm 0.1\text{‰}$  (n = 21) in 2007 compared to  $-25.4 \pm 0.1\text{‰}$  (n = 21) in 2008 (Fig. 2a). However, compared to the phloem sugars, the carbon isotope composition of cellulose is markedly more enriched in both years, by up to 2.2‰ in 2008. Because the  $\delta^{13}C_C$  and  $\delta^{13}C_P$  data shown in Fig. 2a represent average values from several trees, we are confident that these general patterns between  $\delta^{13}C_P$  and  $\delta^{13}C_C$  are robust, despite noticeable between-tree differences in the  $\delta^{13}C_C$  intra-ring variations at the beginning and end of the growing season indicated by larger standard deviations.



**Figure 2** | Seasonal variations of (a) the carbon isotope compositions of wood cellulose ( $\delta^{13}C_C$ ), phloem sugars ( $\delta^{13}C_P$ ) and stem CO<sub>2</sub> efflux ( $\delta^{13}C_F$ ), (b) the carbon fluxes allocated to stem respiration ( $C_F$ ) and cellulose synthesis ( $C_C$ ) and (c) the main two terms of the carbon budget at stem base.  $\delta^{13}C_P$  data consists of a mean value on 5 to 10 trees. Stem CO<sub>2</sub> flux data was collected at canopy height (16 m), while cellulose and phloem sampling was performed at stem base (1.3 m). In panels a and b, a 2-week flux-weighted moving average has been applied on the stem CO<sub>2</sub> efflux data. The shaded area indicates the stem growth period, estimated as the period when stem radial increment is above 0.0033 mm d<sup>-1</sup>.



The seasonal variations of  $\delta^{13}C_F$  at canopy height were captured during most of the growing season in 2007 and only at the end of the year in 2008 (Fig. 2a). At the beginning of the 2007 growing season,  $\delta^{13}C_F$  was very depleted, below -29‰, and progressively became more enriched until the end of the growing season to reach a value close to the phloem sugars. This progressive enrichment was more easily evidenced when using a 2-week moving average of the isotopic signal, as  $\delta^{13}C_F$  was also subject to rapid day-to-day fluctuations (not shown). At the end of the growing season, the  $\delta^{13}C_F$  signal followed closely the  $\delta^{13}C_P$  signal, especially in 2008 where a sharp depletion is observed simultaneously in both signals.

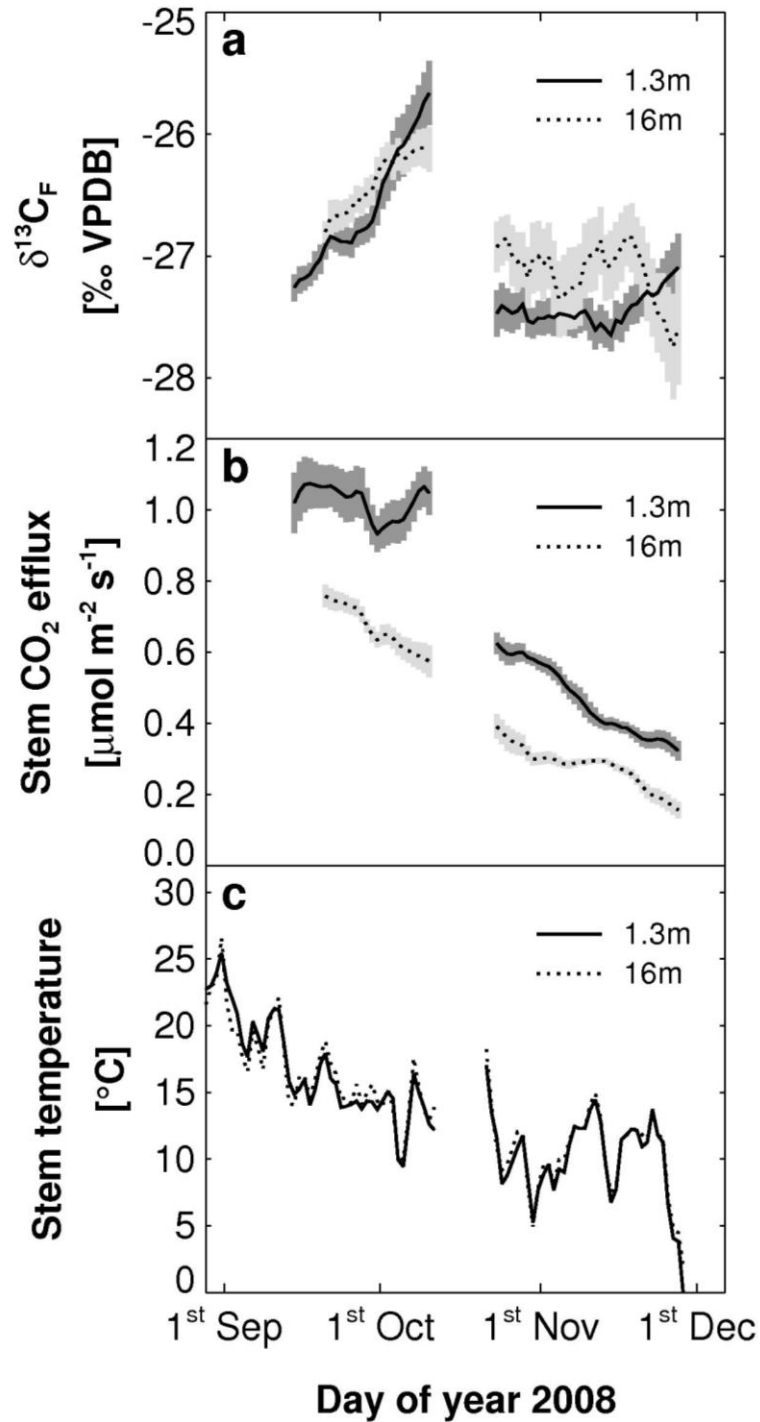
### 3.3 Carbon isotope mass balance at stem base

Based on data from 2007, it seems that the  $\delta^{13}C_F$  signal mirrors that of  $\delta^{13}C_C$  over the growing season. From a mass balance point of view, both signals would therefore compensate each other if the amount of carbon allocated to each process was of the same order of magnitude. The daily flux estimates of carbon used for stem respiration (Eq. 3) and cellulose synthesis (Eq. 4) are shown in Fig. 2b. Over the growing season,  $C_F$  remained quite high around  $1.5 \text{ gC m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and dropped rapidly at the end of both years, reaching winter values below  $0.5 \text{ gC m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Our estimates of  $C_C$  exhibited similar variations between both years and remained in the same range as  $C_F$ , with maximum values around  $2 \text{ gC m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in July-August and minimum values around  $0.5 \text{ gC m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at the end of the growing season (Fig. 2b).

At steady state, and if the flow of carbon along the phloem is small compared to  $C_F$  or  $C_C$ , the isotopic mass balance can be written to a first approximation as (see Discussion for possible extra terms):  $(C_F + C_C) \delta^{13}C_P \approx C_F \delta^{13}C_F + C_C \delta^{13}C_C$ . From Fig. 2c, we see that the carbon isotopic mass balance of the tree stem is verified throughout the growing season, at least to a first order approximation. However there are some times in July or September where the isotopic mass balance is not fully closed (Fig. 2c).

The  $\delta^{13}C_F$  data was performed at canopy height while other components of the carbon budget are relative to the stem base. In order to verify that the  $\delta^{13}C_F$  data collected at canopy height could be used for the isotopic mass budget calculation at stem base, we compared  $\delta^{13}C_F$  measurements performed simultaneously at stem base and canopy height at the end of 2008 (Fig. 3a). Both levels exhibit very similar  $\delta^{13}C_F$  variations, with a rapid increase in September-October followed by sharp drop in November. The amplitude of the variations in September-October was somehow larger at stem base than at canopy height, and this difference of  $\delta^{13}C_F$  between the two levels seemed to be related to the metabolic rates (Fig. 2b), rather than stem temperatures (Fig. 2c). At this period, it seems also that the isotopic signal at stem base lagged behind that of canopy height by about 6 days. This time lag corresponds to the time required for phloem sugars to travel from canopy height to stem base of the stem (ca. 15 m) and therefore indicates a phloem velocity of about  $0.1 \text{ m h}^{-1}$ .

**Figure 3** | Temporal dynamics of (a) the carbon isotope composition of stem CO<sub>2</sub> efflux (b) stem CO<sub>2</sub> efflux and (c) stem temperature at about 16m and 1.3m above ground (beneath canopy and breast height respectively) at the end of the 2008 growing season. In panels a and b, only the 2-week flux-weighted moving average values ( $\pm$  standard deviation) are shown.



## 4 Discussion

### **4.1 Seasonal variations in carbon isotopic signatures of phloem sugars, cellulose of tree-rings and stem respired CO<sub>2</sub>**

The carbon isotope composition of phloem sugars revealed a progressive strong <sup>13</sup>C-enrichment along the growing season in 2008 (Fig. 2a). We suggest that, as the growing season in 2008 was drier than in 2007 (Fig. 1), a short water stress in 2008 may induce the progressive <sup>13</sup>C-enrichment of the carbon isotope composition of phloem sugars. This assumption is in agreement with Peuke *et al.* (2006) and Pate *et al.* (1998) that observed a <sup>13</sup>C-enrichment of the carbon isotope composition of phloem in eucalyptus and beech, respectively, in relationship with drought events. Moreover, we propose that this <sup>13</sup>C-enrichment of phloem sugars was correlated with leaves stomatal closure, that tends to enrich phloem assimilates or/and with the remobilisation of starch that is expected to be <sup>13</sup>C-enriched compared to phloem sugars (Brugnoli *et al.*, 1988; Gessler *et al.*, 2007).

In contrast to our findings on no obvious seasonal variations of carbon isotope composition of cellulose of tree-rings (Fig. 2a), Helle *et al.* (2004) demonstrated a general pattern of  $\delta^{13}\text{C}$  of tree-rings from deciduous tree species that was expected to be driven by the storage and remobilisation effect of reserves, mainly composed of starch. Similarly, Skomarkova *et al.* (2006) showed dynamics of  $\delta^{13}\text{C}$  of tree-rings in relationship with re-allocation and storage processes. Consequently, we expect that the slight <sup>13</sup>C-enrichment of  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose of tree-ring at the beginning and the end of wood growth was due to respectively, the use and the storage of reserves that were <sup>13</sup>C-enriched compared with carbohydrates. A possible reason of no obvious  $\delta^{13}\text{C}$  variations of cellulose for both years may be caused by the climate of two particular years that were significantly wetter (Fig. 1) than the previous years, without severe drought.

Researches on the analysis of the CO<sub>2</sub> release at stem level were only recently conducted: post-photosynthetic discrimination during stem respiration was revealed (Ghashghaie *et al.*, 2003; Badeck *et al.*, 2005). The main studies were performed on  $\delta^{13}\text{C}$  of leaf dark respiration (Duranceau *et al.*, 1999; Ghashghaie *et al.*, 2001; Tcherkez *et al.*, 2003; Hymus *et al.*, 2005; Bathellier *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2009). At stem level, Maunoury *et al.* (2007) exhibited strong seasonal variations of the carbon isotope composition of stem respired CO<sub>2</sub>: a strong <sup>13</sup>C-enrichment at the beginning of the growth period, following by lower  $\delta^{13}\text{C}$ -values in summer and to finish, a <sup>13</sup>C-enrichment after the growing season. Even if our findings are not in agreement with these results, the interpretation of our seasonal variations of  $\delta^{13}\text{C}$  of stem respired CO<sub>2</sub> should be related to phenological events that are linked to the studied tree specie, as Maunoury *et al.* (2007) proposed.

## 4.2 Opposite post-photosynthetic fractionations

Post-photosynthetic carbon fractionation processes at stem level were highlighted (Fig. 2a). During the wood formation, the carbon isotope composition of phloem sugars was constantly  $^{13}\text{C}$ -enriched compared stem  $\text{CO}_2$  efflux by *c.* 0.8‰ to 1.8‰ and  $^{13}\text{C}$ -depleted compared to cellulose by *c.* 0.5‰ to 2.7‰. Outside the growing season, the carbon isotope composition of phloem sugars was equal to stem  $\text{CO}_2$  efflux.

Firstly, we assumed a positive discrimination against during cellulose synthesis. This finding goes against the statement of Cernusak *et al.* (2005). Indeed, the presented  $^{13}\text{C}$ -enrichment in sink tissues was supposed not to be as a result of fractionation during cellulose synthesis. This assumption was conducted for the reason that the  $\delta^{13}\text{C}$  of nascent tissues was equal to the  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap sugars, whereas the  $\delta^{13}\text{C}$  of nascent leaf tissues was different from the  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap sugars. However, in accordance with Gessler *et al.* (2009) a clear positive carbon fractionation between  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sugars and  $\delta^{13}\text{C}$  of tree-rings was demonstrated: the  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sugars were  $^{13}\text{C}$ -depleted than tree-rings by about 1‰. The possible reason is given by the fact that the carbon isotope signature is assumed to be equilibrated within wood tissue with a repartition of heavy and light atoms of carbon between each wood constituent (Cernusak *et al.*, 2009).

Secondly, a negative discrimination from the phloem sugars, the putative substrates to the  $\text{CO}_2$  released by stems was shown during stem respiration during the growing season. Outside the wood formation, no carbon isotopic discrimination was illustrated. To our knowledge, the first study showing fractionation during respiration was conducted by Troughton *et al.* (1974) that demonstrated a  $^{13}\text{C}$ -depletion of the carbon isotope composition of  $\text{CO}_2$  released from pine trees compared to plant material, included needles and stems, by 3.7‰. In contrast to stem respiration, discrimination against carbon by 6‰ during dark respiration processes releasing  $^{13}\text{C}$ -enriched  $\text{CO}_2$  was demonstrated at leaf level (Duranceau *et al.*, 1999) and, consequently, lead to a  $^{13}\text{C}$ -depletion in the remaining leaf material. Studies on  $\delta^{13}\text{C}$  of respired  $\text{CO}_2$  at stem level were recently conducted (Damesin *et al.*, 2003; Maunoury *et al.*, 2007; Kodama *et al.*, 2008). In contrast with our findings, Maunoury *et al.* (2007) showed that the carbon isotope composition of stem respired  $\text{CO}_2$  from deciduous oak forest was  $^{13}\text{C}$ -enriched by as much as 5‰ compared to the total organic matter. Few possible reasons, listed by a review of Cernusak *et al.* (2009) of the carbon fractionation during stem respiration, may be taken into account: (i) fragmentation fractionation could occur during  $\text{CO}_2$  release by pyruvate dehydrogenase, (ii) the pentose phosphate pathway was in prevalence during respiration and (iii) the PEP carboxylase enzyme was in activity.

### 4.3 Stem carbon isotopic mass balance

Stem respiration and wood synthesis are two opposite stem carbon fractionations that are counterbalanced (Fig. 2a and 2b). The rapid decrease in  $C_C$  at the end of the growing season coincides with the drop in stem radial increment  $dr/dt$ . Because this drop in  $dr/dt$  also integrates shrinkage of the stem due to soil water limitations (Fig. 1), the drop in  $C_C$  occurs earlier than the drop of  $C_F$  at the end of the growth period. We expected that when taking into account this physiological event, the drop in  $C_C$  and  $C_F$  would happen simultaneously.

For carbon isotopic mass balance, only cellulose component of wood was taken into account (Fig. 2b, 2c). However, more compounds were synthesised at different steps of wood formation (Plomion *et al.*, 2001). For instance, lignin formation is currently neglected in the carbon budget while it should in principle be incorporated, at least in the late wood where the lignin fraction ( $1 - f_{\text{cellulose}}$ ) is the highest (Fig. 1) and while lignin is expected to be  $^{13}\text{C}$ -depleted compared to the whole organic matter by 1 to 4‰ (Wilson *et al.*, 1977). However incorporating lignin formation should not modify significantly the isotopic mass balance. Indeed assuming that the carbon isotope composition of lignin is depleted by ca. 2‰ compared to  $\delta^{13}\text{C}_C$ , the isotopic mass balance at stem base would be modified with adding  $C_L$ , an extra term that represents the flow of carbon to lignin. The latter can be computed in a similar fashion as in Eq. 4, with  $(1 - f_{\text{cellulose}})$  instead of  $f_{\text{cellulose}}$ , i.e.,  $C_L f_{\text{cellulose}} = C_C(1 - f_{\text{cellulose}})$ . From Fig. 2, it is clear that this extra term (not shown, but less than  $1.5 \text{ gC m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ ‰}$ ) is small compared to the other terms in the mass balance, and could not explain the discrepancies between the two terms of the carbon budget shown in Fig. 2c.

## 5 Conclusions

Seasonal dynamics of the carbon isotope compositions of phloem sugars, of cellulose and of stem CO<sub>2</sub> efflux were evidenced along two years, 2007 and 2008. Over these periods, the range of carbon isotope ratios was up to 4.5‰, the stem respired CO<sub>2</sub> being the most <sup>13</sup>C-depleted signature and cellulose of tree-rings being the most <sup>13</sup>C-enriched signature.

Post-photosynthetic fractionation processes were revealed for two wet years and for *P. pinaster* species. During the growing season, cellulose of tree-rings was <sup>13</sup>C-enriched by 0.5‰ to 2.7‰ compared to the carbon isotope composition of phloem sugars, the putative substrates, whereas stem CO<sub>2</sub> efflux was <sup>13</sup>C-depleted by 0.8‰ to 1.8‰. Out of the wood growth, the carbon isotope composition of phloem sugars became equal to stem CO<sub>2</sub> efflux. These fractionations were validated by carbon isotopic mass balance calculations at a first order, as the carbon flux for stem respiration corresponded to the carbon flux for wood synthesis. We recommend performing this intensive monitoring of the δ<sup>13</sup>C of phloem sugars, cellulose of tree-rings and stem respired CO<sub>2</sub> for other tree species and the upcoming years. It will be interested to follow this experiment in case of dry years with severe drought events. Moreover, even if this type of experiments are hard to accomplish, monitoring δ<sup>13</sup>C of starch in reserves and also of lignin of wood will be appreciate to achieve a more complete carbon isotopic mass balance.

These clear advances that demonstrate two obvious opposite and compensated post-photosynthetic fractionations during stem respiration and cellulose synthesis provide new insights in plant functioning researches. Photosynthetic discrimination can consequently not only explain the variation in carbon isotope composition of tree-rings. To conclude, post-photosynthetic fractionations may be taken into account in biogeochemical cycles at tree scale and for carbon balance researches at ecosystem and global scales.

## Acknowledgements

This research was supported by funds from the CARBOEUROPE project (Directorate General XII, European Commission, GOCE-CT-2003-505572), the Aquitaine region project (“DURABILITE du SYSTEME de PRODUCTION FORET-BOIS d’AQUITAINE”) coordinated by C. Méredieu) and INRA, division “Forest, Grassland and Freshwater Ecology”. The authors would like to thanks the Platform “Métabolisme-Métabolome” of IFR 87 “Institut de Biologie des Plantes” (F. Guérard, M. Lamothe and C. Lelarge-Trouverie) for carbon isotope analysis of phloem sugars, INRA Nancy (C. Bréchet and C. Hossann) for carbon isotope analysis of cellulose of tree-rings and the INRA Plateform “Qualité du bois” (F. Lagane) for µdensity measurements. We would also like to thanks F. Bernier, J.M. Bonnefond, D. Brazzalotto and D. Garrigou for help with field and lab work.

## References

- Badeck, W. F, Tcherkez, G., Nogues, S., Piel, C., Ghashghaie, J. 2005. Post-photo synthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs - a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(11): 1381-1391.
- Barbour MM, Walcroft AS, Farquhar GD 2002. Seasonal variation in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of cellulose from growth rings of *Pinus radiata*. In. 1483-1499.
- Bathellier, C., Badeck, W. F, Couzi, P., Harscoet, S., Mauve, C., Ghashghaie, J. 2008. Divergence in  $\delta^{13}\text{C}$  of dark respired  $\text{CO}_2$  and bulk organic matter occurs during the transition between heterotrophy and autotrophy in *Phaseolus vulgaris* plants. *New Phytologist* 177(2): 406-418.
- Berbigier P, Bonnefond J-M, Mellmann P. 2001.  $\text{CO}_2$  and water vapour fluxes for 2 years above Euroflux forest site. *Agricultural and Forest Meteorology* 108: 183-197.
- Brandes, E., Kodama, N., Whittaker, K., Weston, C., Rennenberg, H., Keitel, C., Adams, A. M, Gessler, A. 2006. Short-term variation in the isotopic composition of organic matter allocated from the leaves to the stem of *Pinus sylvestris*: effects of photosynthetic and postphotosynthetic carbon isotope fractionation. *Global Change Biology* 12(10): 1922-1939.
- Brugnoli, E., Hubick, T. K, Caemmerer, von S, Wong, C. S, Farquhar, D. G. 1988. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of  $\text{C}_3$  plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiology* 88(4): 1418-1424.
- Cernusak, A. L, Farquhar, D. G, Pate, S. J. 2005. Environmental and physiological controls over oxygen and carbon isotope composition of Tasmanian blue gum, *Eucalyptus globulus*. 25(2): 129-146.
- Cernusak, A. L, Tcherkez, G., Keitel, C., Cornwell, K. W, Santiago, S. L, Knohl, A., Barbour, M. M, Williams, G. D, Reich, B. P, Ellsworth, S. D, Dawson, E. T, Griffiths, G. H, Farquhar, D. G, Wright, J. I. 2009. Why are non-photosynthetic tissues generally  $^{13}\text{C}$  enriched compared with leaves in  $\text{C}_3$  plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology* 36(3): 199-213.
- Damesin, C., Lelarge, C. 2003. Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant Cell and Environment* 26(2): 207-219.
- Devaux, M., Ghashghaie, J., Bert, D., Lambrot, C., Gessler, A., Bathellier, C., Ogée, J., Loustau, D. 2009. Carbon stable isotope ratio of phloem sugars in mature pine trees throughout the growing season: comparison of two extraction methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 2511-2518.
- Duranceau, M., Ghashghaie, J., Badeck, F., Deleens, E., Cornic, G. 1999.  $\delta^{13}\text{C}$  of  $\text{CO}_2$  respired in the dark in relation to  $\delta^{13}\text{C}$  of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L-under progressive drought. *Plant Cell and Environment* 22(5): 515-523.
- Farquhar, D. G, O'Leary, H. M, Berry, A. J. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9(2): 121-137.
- Francey, J. R, Farquhar, D. G. 1982. An explanation of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  variations in tree rings. *Nature* 297(5861): 28-31.
- Gessler, A., Brandes, E., Buchmann, N., Helle, G., Rennenberg, H., Barnard, L. R. 2009. Tracing carbon and oxygen isotope signals from newly assimilated sugars in the leaves to the tree-ring archive. *Plant Cell and Environment* 32(7): 780-795.



- Gessler, A., Keitel, C., Kodama, N., Weston, C., Winters, J. A., Keith, H., Grice, K., Leuning, R., Farquhar, D. G. 2007.  $\delta$  C-13 of organic matter transported from the leaves to the roots in *Eucalyptus delegatensis*: short-term variations and relation to respired CO<sub>2</sub>. *Functional Plant Biology* 34(8): 692-706.
- Ghashghaie, J., Duranceau, M., Badeck, W. F., Cornic, G., Adeline, T. M., Deleens, E. 2001.  $\delta$  C-13 of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to  $\delta$  C-13 of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant Cell and Environment* 24(5): 505-515.
- Ghashghaie, Jaleh, Badeck, W. F., Lanigan, Gary, Nogués, Salvador, Tcherkez, Guillaume, Deléens, Eliane, Cornic, Gabriel, Griffiths, Howard. 2003. Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C<sub>3</sub> plants. *Phytochemistry Reviews* 2(1): 145-161.
- Helle, G., Schleser, H. G. 2004. Beyond CO<sub>2</sub>-fixation by Rubisco - an interpretation of C-13/C-12 variations in tree rings from novel intra-seasonal studies on broad-leaf trees. *Plant Cell and Environment* 27(3): 367-380.
- Hemming, D., Fritts, H.C., Leavitt, S.W., Wright, W., Long, A., Shashkin, A. 2001. Modelling tree-ring  $\delta^{13}C$ . *Dendrochronologia* 19: 23-38.
- Hymus, J. G., Maseyk, K., Valentini, R., Yakir, D. 2005. Large daily variation in C-13-enrichment of leaf-respired CO<sub>2</sub> in two *Quercus* forest canopies. *New Phytologist* 167(2): 377-384.
- Keel, G. S., Siegwolf, W. RT, Jaggi, Maya, Korner, Christian. 2007. Rapid mixing between old and new C pools in the canopy of mature forest trees. *Plant, Cell & Environment* 0(0): ???-???
- Keitel, C., Adams, A. M., Holst, T., Matzarakis, A., Mayer, H., Rennenberg, H., Gessler, A. 2003. Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-term measure for stomatal conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Cell and Environment* 26(7): 1157-1168.
- Kodama, Naomi, Barnard, Romain, Salmon, Yann, Weston, Christopher, Ferrio, Juan, Holst, Jutta, Werner, Roland, Saurer, Matthias, Rennenberg, Heinz, Buchmann, Nina, Gessler, Arthur. 2008. Temporal dynamics of the carbon isotope composition in a *Pinus sylvestris* stand: from newly assimilated organic carbon to respired carbon dioxide. *Oecologia*.
- Leavitt, S.W., Danzer, S.R. 1993. Method for batch processing small wood samples to holocellulose for stable-carbon isotope analysis. *Analytical Chemistry* 65: 87-89.
- Loader, J. N., Robertson, I., McCarroll, D. 2003. Comparison of stable carbon isotope ratios in the whole wood, cellulose and lignin of oak tree-rings. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 196(3-4): 395-407.
- Loustau, D., Granier, A., Moussa, H. FE. 1990. Seasonal-Variations of Sap Flow in a Maritime Pine Stand. *Annales Des Sciences Forestieres* 47(6): 599-618.
- Maunoury, F., Berveiller, D., Lelarge, C., Pontailier, Y. J., Vanbostal, L., Damesin, C. 2007. Seasonal, daily and diurnal variations in the stable carbon isotope composition of carbon dioxide respired by tree trunks in a deciduous oak forest. *Oecologia* 151(2): 268-279.
- McCarroll, D., Loader, J. N. 2004. Stable isotopes in tree rings. *Quaternary Science Reviews* 23(7-8): 771-801.
- Ogée, J., Barbour, M.M., Wingate, L., Bert, B., Bosc, A., Stievenard, M., C., Lambrot, M., Pierre, T., Bariac, D., Loustau, C. R., Dewar. 2009. A single-substrate model to interpret intra-annual stable isotope signals in tree-ring cellulose. 32(8): 1071-1090.
- Ogée J, Brunet Y. 2002. A forest floor model for heat and moisture including a litter layer. *Journal of Hydrology* 255: 212-233.

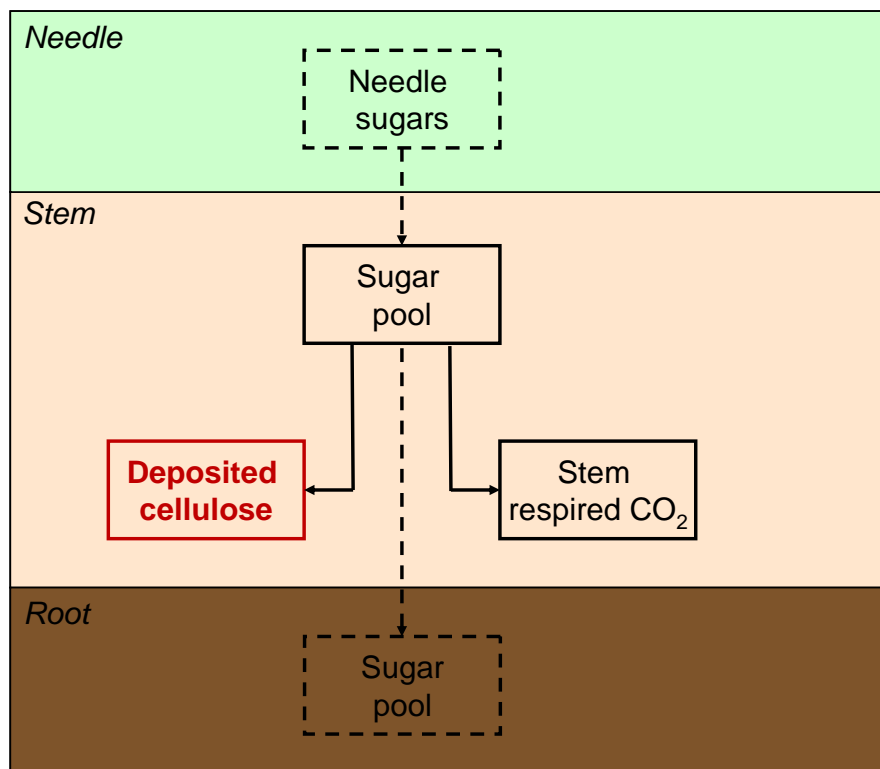
- Pate, J., Shedley, E., Arthur, D., Adams, M. 1998. Spatial and temporal variations in phloem sap composition of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. *Oecologia* 117(3): 312-322.
- Peuke, D. A., Gessler, A., Rennenberg, H. 2006. The effect of drought on C and N stable isotopes in different fractions of leaves, stems and roots of sensitive and tolerant beech ecotypes. *Plant Cell and Environment* 29(5): 823-835.
- Plomion, Christophe, Leprovost, Gregoire, Stokes, Alexia. 2001. Wood Formation in Trees. 127(4): 1513-1523.
- Porté A, Bosc A, Champion I, Loustau D. 2000. Estimating the foliage area of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) branches and crowns with application to modelling the foliage area distribution in the crown. *Annals of Forest Science* 57: 73-86.
- Rossi, S., Deslauriers, A., Morin, H. 2003. Application of the Gompertz equation for the study of xylem cell development. *Dendrochronologia* 21(1): 33-39.
- Skomarkova, V. M., Vaganov, A. E, Mund, M., Knohl, A., Linke, P., Boerner, A., Schulze, D. E. 2006. Inter-annual and seasonal variability of radial growth, wood density and carbon isotope ratios in tree rings of beech (*Fagus sylvatica*) growing in Germany and Italy. *Trees-Structure and Function* 20(5): 571-586.
- Stella, P., Lamaud, E., Brunet, Y., Bonnefond, J.-M., Loustau, D., Irvine, M. 2009. Simultaneous measurements of CO<sub>2</sub> and water exchanges over three agroecosystems in South-West France. *Biogeosciences* 6: 2957-2971.
- Tcherkez, G., Nogues, S., Bleton, J., Cornic, G., Badeck, F., Ghashghaie, J. 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO<sub>2</sub> in French bean. *Plant Physiology* 131(1): 237-244.
- Troughton, H. J, Card, A. K, Hendy, H. C. 1974. Photosynthetic pathways and carbon isotope discrimination by plants. *Carnegie Institution Year Book*(73): 768-780.
- Werner, C., Wegener, F., Unger, S., Nogues, S., Priault, P. 2009. Short-term dynamics of isotopic composition of leaf-respired CO<sub>2</sub> upon darkening: measurements and implications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23(16): 2428-2438.
- Wilson, T. A, Grinsted, J. M. 1977. <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C in cellulose and lignin as palaeothermometers. *Nature* 265(5590): 133-135.
- Wingate, L., Ogée, J., Burlett, R., Bosc, A. 2010. Strong seasonal disequilibrium measured between the oxygen isotope signals of leaf and soil CO<sub>2</sub> exchange. *Global Change Biology*.



*Les cernes annuels*



## Contrôle biologique et environnemental des variations spatiales et temporelles de la composition isotopique de la cellulose des cernes annuels



### Publication:

Devaux et al. Dynamics of carbon isotope ratio of tree-rings of maritime pines over 2001-2008 period in relationship with the climate (in preparation)

## Sommaire

Summary .....	111
1 Introduction .....	112
2 Material and Methods.....	114
2.1 Experimental sites .....	114
2.2 Tree-ring analysis .....	115
2.2.1 Tree sampling.....	115
2.2.2 Cellulose extraction and carbon isotope analysis.....	116
2.2.3 Wood density analysis.....	116
2.3 Radial growth monitoring .....	116
2.4 Environmental data .....	117
2.5 Statistical analysis .....	117
3 Results .....	117
3.1 Water regime comparison between sites .....	117
3.2 Inter-site and inter-annual variations of $\delta^{13}\text{C}$ of cellulose .....	118
3.3 Intra-annual dynamics of $\delta^{13}\text{C}$ of cellulose.....	120
4 Discussion .....	125
4.1 Difference in annual $\delta^{13}\text{C}$ values between years.....	125
4.2 Earlywood – latewood difference in $\delta^{13}\text{C}$ values .....	126
4.3 Between site differences.....	127
4.4 Intra-annual dynamics of $\delta^{13}\text{C}$ .....	127
5 Conclusions .....	128
Annexe 1. Table 2 .....	130
REFERENCES.....	131

## Dynamics of carbon isotope ratio of tree-rings of maritime pines over 2001-2008 period in relationship with the climate

Devaux et al.

Proposition of Journal :

Trees Structure and Function

### Summary

- The aim was to study the inter-annual and intra-annual variations of  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose of tree-rings for three contrasted *Pinus pinaster* stands, that differ in their soil water content and
- The mean carbon isotope ratio of cellulose is significantly more enriched in  $^{13}\text{C}$  at Vielle Haut site than at Vielle Bas and Le Bray sites, without relationship with the hydrological status of the site..
- The  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose of tree-rings presented contrasted differences between years. In case of dry years, the mean  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose is  $^{13}\text{C}$ -enriched and the amplitude of variations of  $\delta^{13}\text{C}$  is up to 4 ‰. At the opposite the mean  $\delta^{13}\text{C}$  is less depleted in  $^{13}\text{C}$  compared to dry years and the amplitude of variations are much lower, with a value of 1-2 ‰.
- Intra-annual variations of the  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose within tree-rings exhibited periodic pattern for all the seven study years. Two phases were noticeable: a  $^{13}\text{C}$ -enrichment of  $\delta^{13}\text{C}$  until two thirds of the growing season and a  $^{13}\text{C}$ -depletion that reaching at the end the most depleted  $\delta^{13}\text{C}$ -value.
- This pattern appears consistent with the photosynthetic carbon discrimination model proposed by Farquhar et al. (1982).

### Key-words:

Tree-ring, carbon isotope ratio, cellulose, latewood, earlywood, density, pine, climate, environment, dendrochronology



## 1 Introduction

The carbon isotope signal,  $\delta^{13}\text{C}$ , of annual tree-rings is a good recorder of tree ecophysiological processes that are directly affected by environmental conditions changes (Schweingruber 1996; Saurer, Aellen, & Siegwolk 1997; Schelser et al. 1999; Treydte et al. 2001, 2006; Leavitt 2002; Wimmer 2002; McCarroll and Loader 2004). The environmental variations occurring along each annual growing season are indeed fixed within  $\delta^{13}\text{C}$  profiles of annual tree-rings. Consequently, exploring the variability of carbon isotope composition of wood or of cellulose within tree-rings archives has the potential to enhance our understanding of tree ecophysiological responses to the past climatic events, such as drought or frost. Under current climate change that directly affects plant growth and forests productivity, a better interpretation of these natural climate archives and a sensitivity analysis of their environmental control may improve our capacity to predict plant performance under unexperimented environmental conditions.

The carbon isotope ratio of tree-rings is usually related to the carbon isotope composition of leaf assimilates, newly synthesised during photosynthesis, that are transported through the tree phloem until their consumption for new tree-ring. Therefore, as photosynthesis discrimination ( $\Delta$ ) depends to the change in the ratio of leaf intercellular and ambient  $\text{CO}_2$  concentration ( $c_i/c_a$ ) through stomata diffusion ( $a = 4.4 \text{ ‰}$ ) and  $\text{CO}_2$  carboxylation ( $b = 27\text{-}29 \text{ ‰}$ ) by the enzyme *RubisCO* (Farquhar et al. 1982, 1989), the carbon isotope fractionation varied as a function of changes in stomatal conductance ( $g_s$ ) driven by environmental conditions such as water and light availability (Gessler et al. 2001). For instance, the stomata closure induced by water shortage generally reduces  $c_i$  and leads to an increase of the  $\delta^{13}\text{C}$  of organic matter in leaves, phloem and tree-rings (Farquhar, O'Leary & Berry 1982; Keitel et al. 2003). Accordingly, Porté and Loustau (2001) related the latewood cellulose carbon isotope composition to the apparent water use efficiency A/E at the stand level and found a correlation for the period 1977-1994 in the maritime pine stand of the Carboeurope *Le Bray* site. Walcroft et al. (1997) found similar results on radiata Pine, investigating for the first time the intra-annual  $\delta^{13}\text{C}$  variability.

Previous researches on the climate control of  $\delta^{13}\text{C}$  of tree rings focused mainly on the potential effect of meteorological variables like temperature, precipitation or relative humidity on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in tree-rings (Wilson and Grinsted 1978; Leavitt and Long 1991; Leavitt 1993; Yakir et al. 1994; Zimmermann, Schleser and Bräuning 1997; Hemming et al. 1998; Edwards et al. 2000). In addition, studies were performed on the relationship between carbon isotope ratios and soil water content (Dupouey et al. 1993; Walcroft et al. 1997), or water-use efficiency (Bert, Leavitt and Dupouey 1997; Dusquesnay et al. 1998; Ponton et al. 2001). Despite these many results on various tree species, studied sites and years, the link between tree-ring carbon isotope ratios and climate is unclear and remains an open question.

Recently, studies of intra-annual variations of the carbon isotope composition within tree-rings were performed to help understanding their relationship with climate (Helle and Schleser et al. 2004; Scartazza et al. 2004; Vaganov et al. 2009). According to Helle and Schleser (2004), who studied intra-annual variations of  $\delta^{13}\text{C}$  of wood of deciduous tree species assessed at a very fine resolution, a specific and seasonally tri-phase pattern in tree-rings was found and explained by the effect of carbon storage and re-mobilisation of reserves. The carbon isotope ratios within tree-ring may be affected by the isotopic fractionation occurring during reserves storage and remobilisation in leaves (Gleixner et al. 1998) and in stems (Skomarkova et al. 2006). As the carbon isotope composition of reserves, especially starch, is  $^{13}\text{C}$ -enriched by 1 to 4 ‰ (Wilson and Grinsted, 1977), the re-allocation of reserves in sugar pool may induce a  $^{13}\text{C}$ -enrichment within the tree-ring. Reserves are often used for maintenance respiration, growth resumption and foliage building and also for tree protection against environmental stresses such as drought (Breda et al. 2006) or frost (Morin et al. 2007). Recently, changes in carbon allocation for storage process were linked to the decrease of growth related to the stand age (Genet et al. 2010).

In addition, other fractionation processes occurring after photosynthesis, named post-photosynthetic fractionations, were recently highlighted (Badeck et al. 2005; Cernusak et al. 2009; Gessler et al. 2009) and may also consequently affect the  $\delta^{13}\text{C}$  signal within tree-rings. Indeed, the  $\delta^{13}\text{C}$  of wood or of cellulose is found to be  $^{13}\text{C}$ -enriched compared to their substrate, i.e. phloem carbohydrates, by about 1 ‰ (Gessler et al. 2009; Devaux et al. in preparation).

In order to reduce the uncertainty in the interpretation of the role of the climate and water stress on the tree-ring carbon isotope ratios and their response to climate, our objectives were (a) to explore the inter-annual and intra-annual variations of carbon isotope ratio of cellulose of tree-rings at high temporal resolution for conifer trees growing in the same area (b) to relate the intra- and inter-annual variability of  $\delta^{13}\text{C}$  signals to climate and (c) to determine to what extent may a difference in soil water availability explain a putative difference in carbon isotope composition between trees. In order to test these hypotheses, we measured the  $\delta^{13}\text{C}$  of the cellulose of tree rings for a sample of trees chosen in three maritime pine stands growing along a range of soil hydric status. The  $\delta^{13}\text{C}$  values were determined at high and low temporal resolution over the period from 2001 to 2008 which included two major water shortage events in 2002 and 2005 and the 2003 summer heat wave (Delzon and Loustau, 2005, Ciais et al. 2005). The sites chosen differ in their water holding capacity and the proximity of a permanent water table from the soil rooted zone. It was assumed that these contrasted conditions may have created a range of water availability and drought intensity which may amplify differences in the values of  $\delta^{13}\text{C}$  of the tree-rings cellulose and make their interpretation easier in relationship with climatic variables and soil conditions.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Experimental sites

Experiments on tree-rings were conducted on three sites located in the Landes de Gascogne in France and covered by mature stands of the native species *Pinus pinaster* Ait.: Le Bray site, a 39yr-old pine stand located at about 20km south-west from Bordeaux (44°42'N, 0°46'W, altitude 62m) and two stands at Vielle Soubiran site, located at about 30km north-east from Mont-de-Marsan (42°02'N, 0°11'W, altitude 108m) (Table 1): “Vielle Haut”, a 33yr-old pine stand and “Vielle Bas”, a 30yr-old pine stand, that differed by their contrasted localisation compared to the groundwater table, Vielle Haut being at few meters higher than Vielle Bas.

The three stands are principally composed of maritime pines (*Pinus pinaster* Ait.), but the understory vegetation is different. Le Bray site is mainly composed of purple moor-grass *Molinia Coerulea* L. and of some ferns *Pteridium aquilinum* L.. Vielle Haut site is composed of only ferns *Pteridium aquilinum* L. whereas the Vielle Bas undertorey is dominated heather *Calluna vulgaris* L.. Soil at the Bray site is a sandy hydromorphic humic podzol, subject to high water table rise in winter and pronounced edaphic stress in summer. The rooted zone is limited to the top 0.8 m of the soil by a cemented pan layer so that the water holding capacity is low, ca 90-100 mm. At Vielle, the soil is a sandy podzol which shows no limitation to root penetration and living roots have been observed down to 3m in the soil profile (Augusto and Bakker, pers. comm.). Water holding capacity is not known for this specific site but is estimated to 70-80 mm for this soil type by the national French soil Inventory (in Choisnel et al. 1987).

The main stand characteristics of each site are described in Table 1. Dominant height at the age of 25 year is similar in Le Bray and Vielle Haut stand and significantly lower at Vielle Bas, indicating that site productivity in the latter is much lesser than in Le Bray and Vielle Haut. Foliar analysis revealed that all sites are close from deficiency in major elements, nitrogen and phosphorus, according to standard values known in this area (Trichet et al. 2008). Leaf area index, LAI, as estimated from hemispherical photographs is higher in Le Bray site by a factor of 1.5 as compared with Vielle Bas, either for the pine canopy and the undertorey (Yauschew-Raguenes, 2010, personal communication).

**Table 1** | Climate and stand characteristics of Le Bray site and Vielle Soubiran sites (Vielle Haut and Vielle Bas).

Site	Le Bray	Vielle Haut	Vielle Bas
Latitude longitude	44°42N 0°46W	42°02N 0°11W	42°02N 0°11W
Altitude (m)	62	108	108
Tree species	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Pinus pinaster</i>
Understory	<i>Molinia caerulea</i> <i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Calluna vulgaris</i>
Plantation year	1971	1977	1980
Stand age <sup>a</sup> (years)	36	30	27
Stand basal area <sup>a</sup> (m <sup>2</sup> .ha <sup>-1</sup> )	28.2	24.9	19.7
Stand density (trees.ha <sup>-1</sup> )	313	416	441
Mean diameter at breast height (m)	0.339	0.273	0.236
Mean height (m)	21.4	18.9	15.1
LAI overstory (m <sup>2</sup> .m <sup>-2</sup> )	2-3	-	2
LAI understory (m <sup>2</sup> .m <sup>-2</sup> )	2-3	-	1.5-2
RU	90-100	70-80	70-80

<sup>a</sup> Stand BA (basal area), density, diameter at breast height (DBH) and Height were assessed in 2007.

## 2.2 Tree-ring analysis

### 2.2.1 Tree sampling

For each experimental site, wood samplings were performed in order to analyse inter-annual and intra-annual variations of tree-rings and to measure intra-annual wood density of tree-rings over the period 2001-2008.

For carbon isotope ratio analysis of cellulose, three trees per experimental sites were cored at breast height along the East-West azimuthal axis using an increment borer with a large internal diameter (12 mm). Two additional cores were sampling on two of the three studied trees of Le Bray site in order to perform repetitions of carbon isotope analysis. The cores were then smoothed with a sharp blade and scanned with 1200-dpi resolution to measure the tree-ring, earlywood and latewood width using the Windendro software (Regent Instruments Inc., Québec City, Canada). Using a rotary microtome (LEICA RM2255, Leica Microsystems, Bensheim, Germany), wood slices were performed according to two methods of cutting: (1) a rough resolution, i.e. only four wood slices per tree-rings and (2) a finest resolution, i.e. 13 to 15 wood slices per tree-rings or depending on the annual tree-ring, 100 $\mu\text{m}$ -thick wood slices. Over the long period from 2001 to 2007, the first method was applied on the three wood cores collected at le Bray site and two of the three wood cores sampled at each Vielle site. Over the period 2005 - 2008, the second method was used on the two additional wood cores collected at le Bray site and on the last wood core sampled at each Vielle site.

For wood density analysis, one wood core was sampled at breast height from pith to bark on the eastern azimuth using an increment borer with a thin internal diameter (5 mm) on 17 trees

from Le Bray stand, on 6 trees from Vielle Haut and on 6 trees from Vielle Bas stand. The 6 trees per experimental sites were selected because wood increment was also measured at breast height until 2005. In addition to these six trees at Le Bray site, 11 others trees were furthermore sampled with the aim to perform coupled carbon isotope experiments, such as phloem sugars analysis and  $\text{CO}_2$  gas exchange measurements thanks tuneable diode laser spectrometer (Devaux et al. 2009; Wingate et al. 2010; Devaux et al. in preparation).

### **2.2.2 Cellulose extraction and carbon isotope analysis**

Wood slices were first milled in 1.5 mL Eppendorf tubes of using an ultra-centrifugal crusher (Retsch MM300, Hann, Germany). Holocellulose was then extracted following an adaptation of Jayme-Wise method (Leavitt and Danzer 1993). For that, wood powders were introduced into Teflon membrane filters of 47 mm of diameter and 1.2  $\mu\text{m}$  of pore size (11803-047 N, Sartorius, Palaiseau, France) sealed with labelled Teflon tape. Pouches were then placed into a soxhlet apparatus for the cellulose purification first step, i.e. the extraction with a 2:1 toluene (99 %):ethanol (96 %) at about 100 °C for 29 h and then with pure ethanol (96 %) at 80 °C for 16h to remove oils, waxes and resins. Second, water-soluble molecules were removed with agitated hot water at 100°C for 6 h. Third, pouches were introduced four times into a agitated mix of sodium chlorite and glacial acetic acid (7 g  $\text{NaClO}$ , 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  in 700 mL distilled water at 70 °C). Lastly, pouches were rinsed in cold, agitated distilled water for 24 h and then 4 times before drying in the oven at 65 °C.

To assess carbon isotope ratio of cellulose, 1 mg of cellulose was transferred into tin capsule and introduced into an elemental analyser (N-A-1500, Carlo-Erba, Milan, Italy) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (DeltaS, Finnigan, Bremen, Germany). The carbon isotope composition of cellulose is expressed in  $\delta^{13}\text{C}$  notation (‰ units), relative to the international standard (Pee Dee Belemnite). Laboratory standards were measured every 12 samples for correction of the possible drift of the IRMS instrument.

### **2.2.3 Wood density analysis**

Wood cores were cut into 2-mm-long slats using a double blade saw, soaked in pentane (80 - 95 %) for 24 h to remove resins and stored at 12 % humidity before exposure to X-rays (Seiffert Isovolt 3003 X-ray generator, GE Sensing & Inspection Technologies, Ahrensburg, Germany). Radial wood density profile was then obtained using Windendro software (Regent Instruments Inc., Québec City, Canada) after calibration on reference density scale.

## **2.3 Radial growth monitoring**

To date the measured carbon isotope profiles of cellulose within tree-rings, stem growth increment was monitored hourly by 2 $\mu\text{m}$ -resolution point dendrometers at breast height on six trees per experimental sites until 2005. A polynomial curve was fitted on each growth curve to assess the date of each wood fraction using the method proposed by Ogée et al. (2009). in

Addition, the stem circumference at breast height of a sample of ~2000, 450 and 400 trees was measured to the nearest mm every year at Le Bray site and in 2000, 2005, 2006 and 2007 at Vielle sites respectively.

## **2.4 Environmental data**

On the three maritime pine experimental stands, climatic and physiological variables were intensively measured, as the stands were included in several European networks like the Carboeurope project's. Among these variables, air temperature, rainfall, soil water content, groundwater level, transpiration and predawn water potential were particularly important to find their correlation with the measured carbon isotope composition of cellulose. Soil moisture was determined by Soil TDR probes (CS 615 probes, Campbell Sci. Lts, Logan, USA) used for sampling 4 soil profiles at Le Bray, with 5 probes per profile, and 2 profiles in each Vielle site, each with 3 probes at -15 cm, 2 probes at -30 cm et one probe at each deeper depth, down to 2.50m depth in Vielle bas site. Sap flow was estimated using Granier's sensors installed on the main stem, beneath the crown according to Delzon et al. (2005). 6 trees were equipped in each sites but due to dysfunctions, a variable number of measurements could be used for transpiration estimates. micrometeorological data were measured above the canopy as described by Stella et al (2009) and Jarosz et al. (2008).

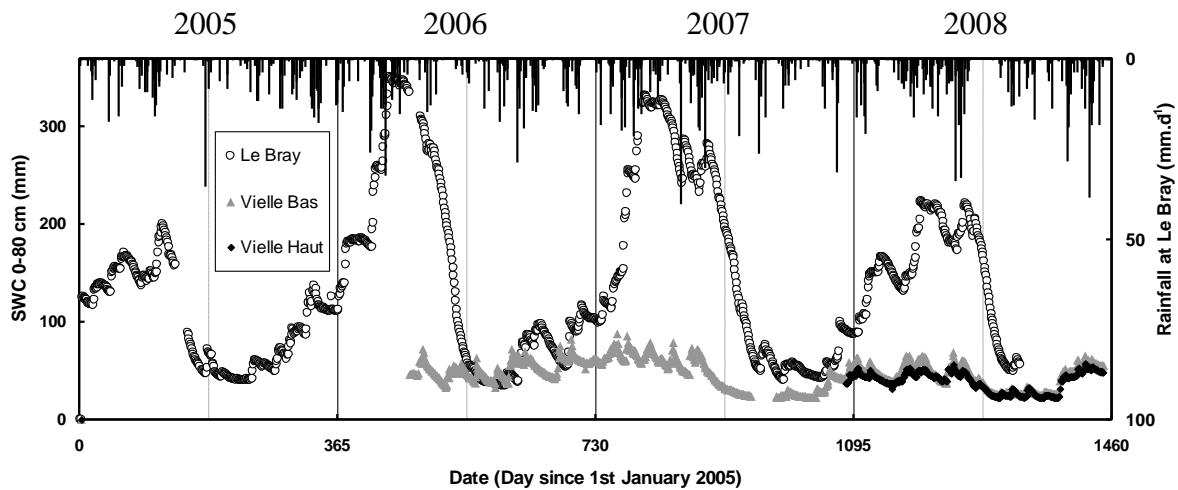
## **2.5 Statistical analysis**

Statistical analyses were achieved in order to interpret the inter-annual and intra-annual variations of the carbon isotope ratio of cellulose. A variance analysis was performed using ANOVA procedure with repeated measurements and the SAS software (General Linear Model, SAS software v 9.2).

# **3 Results**

## **3.1 Water regime comparison between sites**

Figure 1 shows the time course of the soil water content for the 0-80 cm layer and along the period from 1<sup>st</sup> January 2005 to 31<sup>st</sup> December 2008. It confirms that the Vielle sites are more xeric than Le Bray. Minimal values reached each summer are presumably close from the wilting point during the driest years, 2005 and 2006. The minimal soil water content is estimated to 35-40 mm at Le Bray and 22-25 mm at Vielle sites. Maximal water content after gravitational drainage is estimated at 130-140 mm at Le Bray against ca 90mm at Vielle so that the water holding capacity of the top 0.8 m of the soil is 50% higher at Le Bray (105 vs 65-68 mm). In addition, the water table is much deeper at Vielle (-5.0 at -8.0 m for Vielle Haut and Vielle Bas respectively) than Le Bray where it rises up to the top of soil and saturates the entire soil profile (350 mm) in wetter winters such as 2006 and 2007.



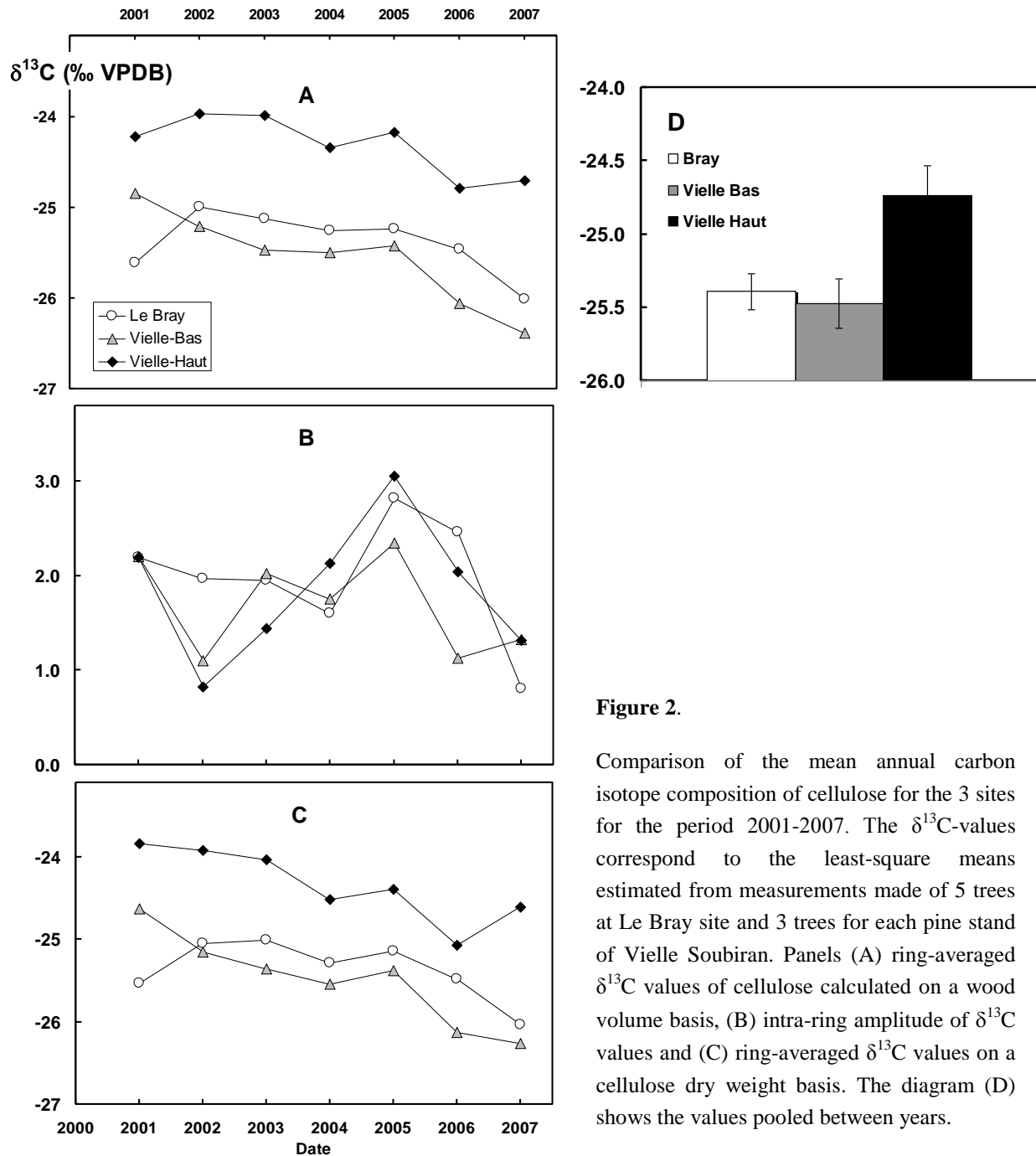
**Figure 1.** Soil water content from -0.8 to 0 m during the 2005-2008 period at Le Bray and Vielle sites, together with the time series of daily rainfall at Le Bray (vertical bars).

Sap flow was occasionally measured at Vielle and continuously at Le Bray site so that we can compare the time course of the estimated transpiration during the year 2006, considered as a “dry year”, between Le Bray and Vielle. Despite the more favourable situation of water availability at Le Bray site, these data shows that water stress and stomatal closure was dramatic at the Bray site but, if any, remained undetectable at Vielle (data not shown).. This surprising observation may be explained by the rooting pattern and an adaptation of the tree LAI to the water regime at Vielle. Even if the top 0.8m of soil is unable to retain a large amount of water at Vielle, the deeper rooting depth (roots were observed down to 3m below the soil surface, Bakker, pers. comm.) allows trees to access to water despite an increased hydraulic resistance (gravitational lift, root resistance). Contrastingly, the strict limitation of pine roots to the top 0.8m soil at Le Bray exclude them from access to deep water during summer. Additionally, the lower LAI at Vielle reduces also the evapotranspiration and slows down the soil water depletion, delaying the occurrence of water stress (data not shown).

### **3.2 Inter-site and inter-annual variations of $\delta^{13}\text{C}$ of cellulose**

Inter-annual variations of the mean carbon isotope composition of cellulose of tree-rings are presented for the three study sites, Le Bray, Vielle Bas and Vielle Haut, over the period from 2001 to 2007 in figure 2. Independent of the calculation basis for averaging  $\delta^{13}\text{C}$  of the annual ring, wood volume, cellulose content or wood dry weight, Vielle Haut  $\delta^{13}\text{C}$  values are on average 1.1‰ higher than Vielle Bas and Le Bray, despite the fact that these latter are the most contrasted ecologically. Inter annual variations are otherwise similar with a between-year amplitude of 1.5‰. There is an overall decreasing trend of annual mean values over the period 2001-2007. The difference in the mean carbon isotope composition of cellulose measured over the whole study period between Vielle Haut and the other sites is significant ( $p=0.008$  and  $p=0.002$ , paired T-test,) whereas mean  $\delta^{13}\text{C}$  values of Le Bray site and Vielle Bas site are similar ( $p=0.62$ , paired T-test) (Figure 2D). Furthermore, the mean carbon isotope composition of cellulose of tree-rings over all studied pines from each

experimental site differs significantly among years (ANOVA with repeated measurements,  $P=0.02$ , see table 2 in appendix). At the Bray site, the intra annual amplitude of  $\delta^{13}\text{C}$  values is maximum during dry years (2005 and 2006) and minimum during wet years (2007). Vielle Haut exhibits a similar pattern but Vielle Bas shows less marked difference between years. However, 2002, considered as a very dry year, shows a lower intra annual amplitude in both Vielle sites.



**Figure 2.**

Comparison of the mean annual carbon isotope composition of cellulose for the 3 sites for the period 2001-2007. The  $\delta^{13}\text{C}$ -values correspond to the least-square means estimated from measurements made of 5 trees at Le Bray site and 3 trees for each pine stand of Vielle Soubiran. Panels (A) ring-averaged  $\delta^{13}\text{C}$  values of cellulose calculated on a wood volume basis, (B) intra-ring amplitude of  $\delta^{13}\text{C}$  values and (C) ring-averaged  $\delta^{13}\text{C}$  values on a cellulose dry weight basis. The diagram (D) shows the values pooled between years.



The mean annual values of  $\delta^{13}\text{C}$  were partitioned among earlywood and latewood and results are shown in Figure 3. Latewood cellulose composition is either equal or  $^{13}\text{C}$  enriched as compared with earlywood and shows similar annual variation that total wood.

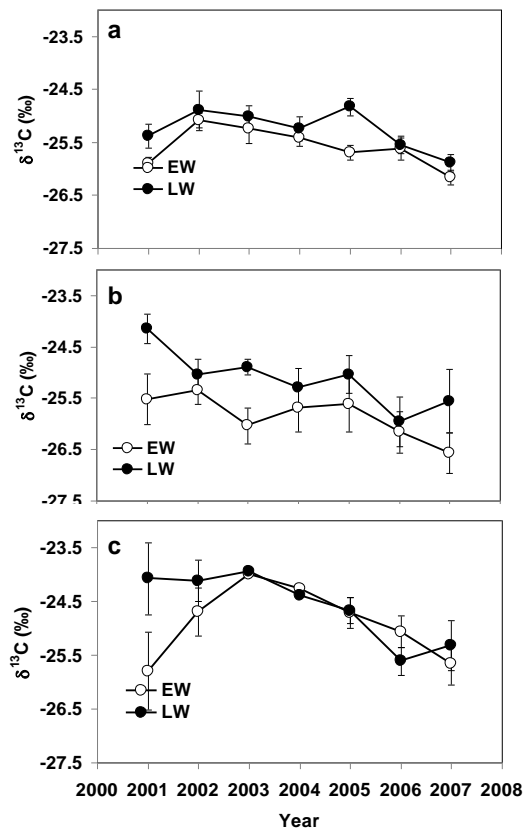


Figure 3. Latewood (LW) and earlywood (EW) annual mean values of  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose calculated on wood volume basis at the le Bray (a), Vielle Bas (b) and Vielle Haut (c) sites.

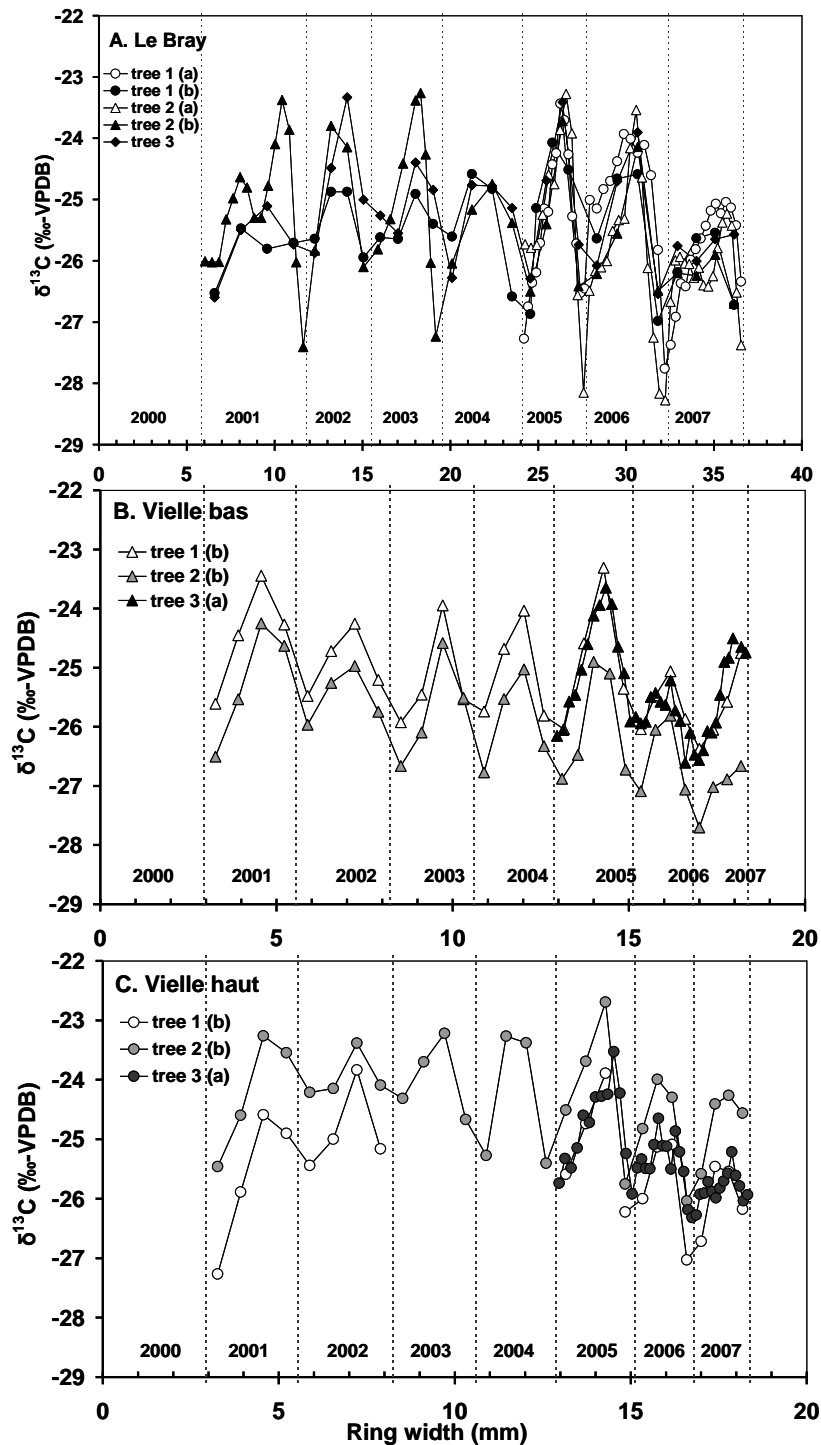
Highest latewood  $\delta^{13}\text{C}$  are observed during dry years 2002 and 2005 whereas no similar pattern is revealed by Vielle sites data. The latter decreases from 2001 to 2008 except the earlywood values at Vielle Haut in 2001 and 2002.

### 3.3 Intra-annual dynamics of $\delta^{13}\text{C}$ of cellulose

The intra-annual dynamics of the carbon isotope composition of cellulose of annual tree-rings from three pine stands from 2001 to 2007 show that the radial variations of  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose varied according to a recurring pattern (Figure 4). Strikingly, the mean intra-annual amplitude of  $\delta^{13}\text{C}$  values reaches up to 3‰ exceeding by far the inter annual variations of 1.5‰. Individual trees even exhibits an amplitude larger than 4‰ at Le Bray site.

The intra annual dynamics of  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose can be described by two successive phases. The first part of the annual pattern starts from the annual minimum of  $\delta^{13}\text{C}$ -value that ranged between -26‰ and -28 ‰ according to the site and year. During this phase, the  $\delta^{13}\text{C}$  of

cellulose increases up to the two thirds of the ring thickness, this rise being either slow and progressive during wet years (2004 and 2007) or very steep during dry years (2005 and 2006).



**Figure 4.** Intra-annual dynamics of the carbon isotope composition of cellulose measured (A) on 3 trees from 'Le Bray' site, (B) on 3 trees from 'Vielle Bas' site and (C) on 3 trees from 'Vielle Haut' site over the period 2001-2007 versus the normalised mean ring width. The mean ring width used for the normalisation is the mean on all studied trees, i.e. 3 trees at 'Le Bray' site and 6 trees at 'Vielle' site (without any difference between 'Vielle Haut' and 'Vielle Bas'). For each site, the  $\delta^{13}\text{C}$ -values of

cellulose purified on each tree-ring are determined from two different resolutions: (a) high resolution, i.e. about 13-14 wood slices per tree-ring (the minimal wood section is 100 $\mu\text{m}$ ) and (b) low resolution with 4 wood slices per tree-rings. Limits between each year are displayed as dashed lines.

In case of dry years, e.g. 2005, this rise of  $\delta^{13}\text{C}$  is indeed the most pronounced and the maximal  $\delta^{13}\text{C}$  value reached its less negative maximum at about -23‰. At the opposite, the intra-annual change during the wet years is smoothed, the  $\delta^{13}\text{C}$  value does not peak but plateaus instead during the growing season at a value of -25‰. The second phase is a decrease of the  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose until the end of the growing season / ring width, which is especially marked at Le Bray site, reaching values as low as -27‰ and even -28‰. This phase is almost symmetric from the first phase although its duration is shorter, i.e. steeper during the drier years.

The periodic intra-annual pattern is shown by all trees of the three pine stands, whatever their climate and soil characteristics, and for all the studied chronology, from the wetter years (2007, for instance) to the drier years (2005, for example). Moreover, as reported by Porté and Loustau (2001), we observed that the intra-annual variations of  $\delta^{13}\text{C}$  of the individual trees are parallel, which is especially noticeable from 2005 to 2008 at Le Bray site. In case of Vielle sites, the  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose measured on one tree is constantly  $^{13}\text{C}$ -enriched by about 1 ‰ compared to the two other measured trees. Indeed, one tree exhibits a  $^{13}\text{C}$ -depleted pattern by about 1 ‰ in comparison to the two others trees at Vielle bas site. At the opposite, one tree shows a  $^{13}\text{C}$ -enriched pattern by about 1 ‰ in comparison to the two others.

Using the micrometric recordings of stem growth measured at the Le Bray and Vielle sites from 2005 to 2009 and the cellulose relative content of each ring fraction analysed for  $\delta^{13}\text{C}$ , the timing of carbon isotope deposition along the annual ring could be estimated for years 2005 to 2008 (Figure 5). Deposition of cellulose starts every year at DOY  $100 \pm 10$  days apart from the year 2008 at Vielle where secondary growth is delayed by 2 to 3 weeks. By contrast, the cessation of growth occurs earlier during the dry years 2005 and 2006 so that the cellulose deposition was achieved up to 50 days ahead of the wetter years 2007 and 2008. The mid-season peak of  $\delta^{13}\text{C}$  values is sharper and higher by 2‰ during the dry years, 2005 and 2006. The initial and final fractions of cellulose were  $^{13}\text{C}$  depleted as compared with mid season values. The between trees differences was more pronounced at the Vielle sites and are maintained along the entire period 2006-2008.

Since only basic meteorological and hydrological data were finally available at the remote Vielle sites, we focus our investigation on the determination of  $\delta^{13}\text{C}$  short term variations at the Bray site only, where a full and continuous characterisation of carbon, water flux and energy balance is available. We shall then compare and discuss the Bray pattern with the two remaining sites in Vielle. Following Porté and Loustau (2001), who found a correlation

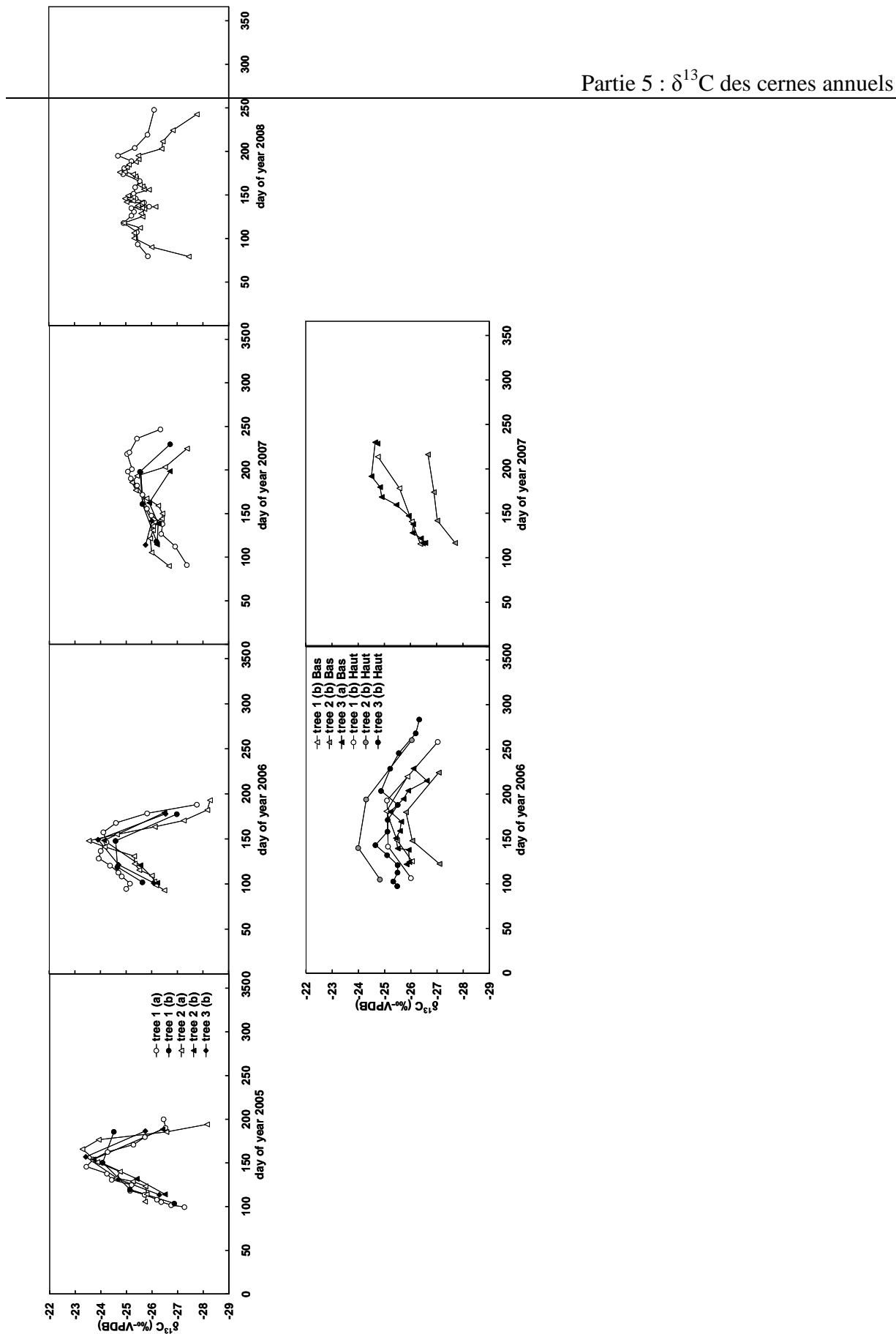
between modelled values of  $\text{GPP} \times \text{VPD} \times E_{\text{pine}}^{-1}$  and latewood  $\delta^{13}\text{C}$  at the Bray site, we calculate an ecosystem proxy of intrinsic water use efficiency as the ratio of the photosynthetic carbon assimilation times VPD to the stand evapotranspiration:

$$\text{GPP} \times \text{VPD} \times \text{LE}^{-1}$$

where:

- GPP ( $\text{gC}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) is the daily sum of gross primary production calculated after gap filling and partitioning the net  $\text{CO}_2$  flux measured by eddy covariance at  $\sim 15$  m above the canopy according to Reichstein et al. (2005);
- VPD (hPa) is the daily aggregated value of the water vapour saturation deficit above the canopy;
- LE, ( $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) the latent heat flux measured by eddy covariance, gap-filled and averaged over the day.

This approach assumes implicitly that the product  $\text{VPD} \times \text{LE}^{-1}$  may approximate the canopy stomatal conductance and GPP the net carbon assimilation. We compare this value to the values of the  $\delta^{13}\text{C}$  of the cellulose deposited concurrently in the xylem of annual ring (Figure 6). After appropriate scaling, we observe that both variables vary roughly in parallel along this period except from the last part of the 2005 and 2006 growing season. There, the drop of  $\delta^{13}\text{C}$  values is not paralleled by the proxy  $\text{GPP} \times \text{VPD} \times \text{LE}^{-1}$ . The abrupt drop of  $\delta^{13}\text{C}$  values in mid summers 2005 and 2006 is simultaneous with growth cessation and with a clear depletion of both GPP and NEE. It is noteworthy the NEE annual pattern matches the  $\delta^{13}\text{C}$  radial profile within the annual ring. In 2005 and 2006, NEE drops in mid summer at DOY180-190 simultaneously from the drop in  $\delta^{13}\text{C}$  whereas in following years, the cellulose deposition and  $\delta^{13}\text{C}$  values are maintained together with a negative NEE (net carbon uptake) until DOY 250.



**Figure 5.** Intra-annual dynamics of the carbon isotope composition of cellulose synchronised with time using microdendrometric recordings and cellulose content of each ring fraction. Upper diagrams: trees from Le Bray site and years 2005 to 2008; lower diagrams: trees from Vielle Haut and Vielle Bas sites over the period 2006-2007.

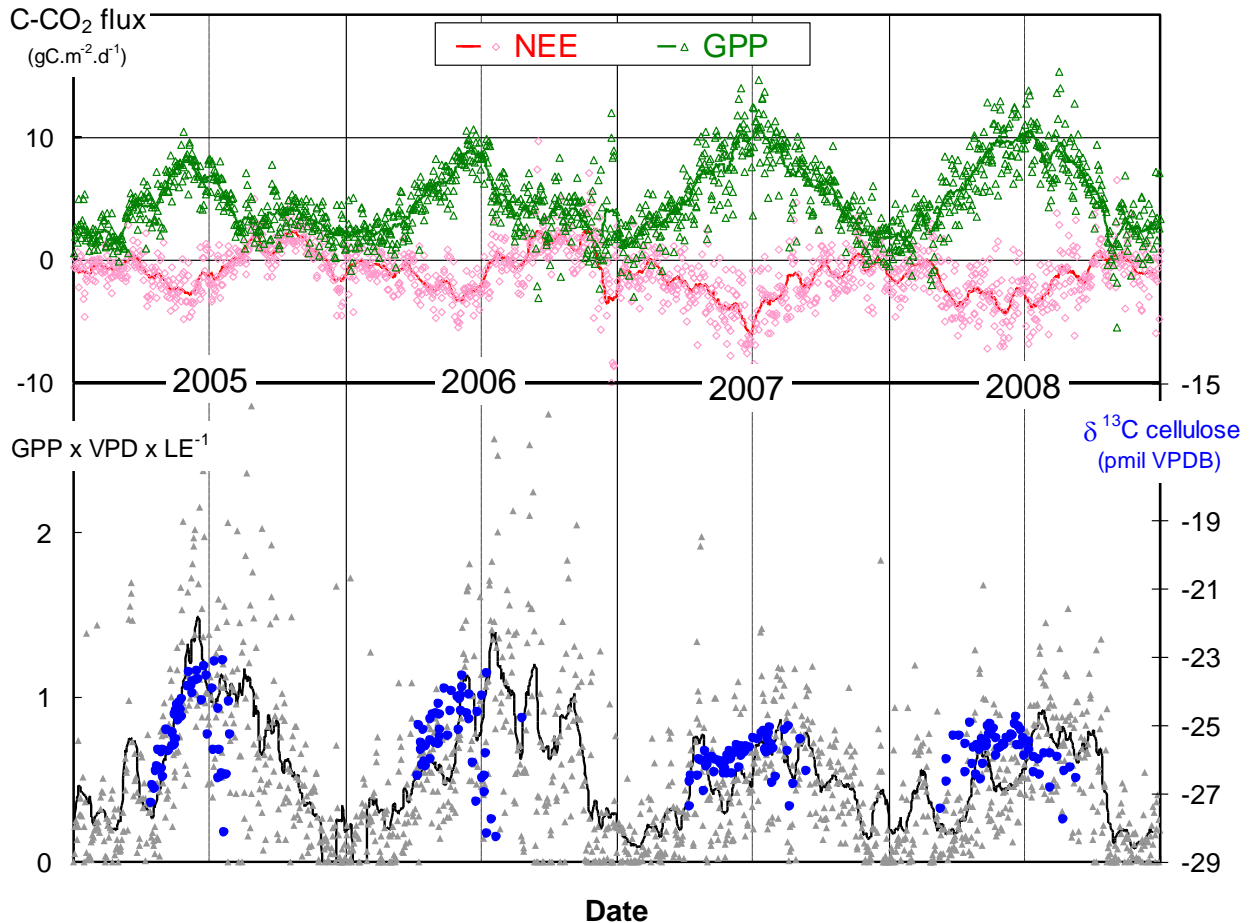


Figure 6. Time course of the daily sums of GPP and NEE with their running means ( $n=20$ ) from 2005 to 2008 at the Le Bray site, upper graph. The lower diagram shows the value  $\text{GPP} \times \text{VPD} \times \text{LE}^{-1}$ , a big-leaf proxy of  $A \cdot g_s^{-1}$ , calculated from daily eddy flux data measured at Le Bray site and the cellulose  $\delta^{13}\text{C}$  values of individual trees synchronised with time using micrometric recordings of stem enlargement, densitometry profiles and cellulose content of the wood fractions analysed according to the method described in Ogée et al. (2009) and chapter 5.

## 4 Discussion

### 4.1 Difference in annual $\delta^{13}\text{C}$ values between years

Our objective was to determine and compare the cellulose  $\delta^{13}\text{C}$  values of the wood xylem and its temporal pattern between ecologically contrasted sites. Although we had to restrict the size

of samples and measurements for technical reasons, we could evidence some difference between site and years according to ecological and climate parameters.

Although N'Guyen-Queyrens et al. (1998), and Porté and Loustau (2001) found correlations between modelled water stress index or water use efficiency and carbon isotope composition of maritime Pine tree cellulose with a between year difference reaching up to 3‰, other authors like De Micco et al. (2007) found more recently no between year difference in  $\delta^{13}\text{C}$  even under climatic summer conditions which differed dramatically between different years. The latter study concerned only four years. Our results confirm that the variation in values of  $\delta^{13}\text{C}$  averaged per annum or ring may reflect a climate or soil water signal. However, we found only a slight difference of 0.5 to 0.8 ‰ between 2005 and 2007 which were clearly contrasted in soil water.

The inter annual changes in the amplitude of within-ring  $\delta^{13}\text{C}$  variations vary from less than 1 to 3‰ and are much stronger than for mean values. Indeed, during dry years the  $\delta^{13}\text{C}$  increased strongly during the first part of the growing season, peaking at a higher  $\delta^{13}\text{C}$ -value than in wet years. Similarly, Walcroft et al. (1997) showed an amplitude of  $\delta^{13}\text{C}$  on tree-rings of *Pinus radiata* of 1-2 ‰ in case of wet years and 4 ‰ in case of dry years. For the year 2004, Gessler et al. (2009) presented also intra-annual dynamics that do exceed 1.5‰.

#### **4.2 Earlywood – latewood difference in $\delta^{13}\text{C}$ values**

No dramatic difference in  $\delta^{13}\text{C}$  between earlywood and latewood was evidenced by our data whereas Porte et Loustau (2001) have shown a significant difference with the most enriched  $\delta^{13}\text{C}$ -value within latewood of *Pinus pinaster*. On the same species, De Micco et al. (2007) showed opposite differences between  $\delta^{13}\text{C}$  of earlywood and latewood, the latter being more depleted in  $^{13}\text{C}$  at the end of the wood formation. Indeed, Porte et Loustau (2001) measured only two fractions of total wood so that each fraction integrate  $\delta^{13}\text{C}$  variations along half growing season. Consequently, as Micco et al. (2007) analysed four fractions of wood, their description of  $\delta^{13}\text{C}$  variability is more accurate which explains why the  $\delta^{13}\text{C}$  in latewood became more  $^{13}\text{C}$ -depleted, as our result at low or high resolution also showed.

Our results allow to better understand the difference found between latewood and early wood isotopic composition. Depending on the time of transition from earlywood to latewood formation, the symmetric pattern of  $\delta^{13}\text{C}$  variations exhibited for almost all years investigated and for all sites demonstrates that no systematic difference between latewood and earlywood should be expected in our study case, as we actually found. For *Pinus pinaster* and presumably other related coniferous species, a better characterisation of the climatic control of tree growth and water use efficiency may be expected from an assessment of the range of within-ring  $\delta^{13}\text{C}$  values.

### 4.3 Between site differences.

Surprisingly the supposedly “dry” sites did not reveal higher  $\delta^{13}\text{C}$  values than the Bray site where the water table enters the rooted zone for more than half of the year. Despite scattered data, we even found that the pine trees there do not exhibit clear sign of water stress such as a reduction in sap flow density or a drop in predawn water potential during summer. Moreover, the increment in basal area and height growth, a proxy of site fertility, were quite similar between the Le Bray and Vielle Haut stands. Indeed the Vielle Bas site, where water table is beyond the root depth, has a lesser productivity. Accordingly, both the mean values and the within-ring variations in  $\delta^{13}\text{C}$  values at Vielle showed no dramatic differences with the Le Bray site as expected. Moreover, the within-ring pattern of both Vielle sites was more dampened during the dry years 2006 than Le Bray’s. We assume that the pine stand there is actually adapted to the low water availability and that LAI and rooting patterns have co-evolved in such a way that severe water stress is avoided. Pine trees have access to deep ground water table at Vielle Haut and LAI is reduced at Vielle Bas by 30% of the Bray value. Hence, the tree water regime may be more steady at Vielle than at Le Bray, where the pan layer restricts roots to the upper 0.8m and exposed trees to an alternance of immersed soil conditions in winter and severe water stress during dry years.

### 4.4 Intra-annual dynamics of $\delta^{13}\text{C}$

As found for deciduous and conifers species (Helle and Schleser, 2004; De Micco et al. 2007), intra-annual dynamics of  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose of tree-rings from *Pinus pinaster* exhibits a clear recurring pattern. De Micco et al. (2007) found the same periodic intra-annual pattern when measuring the  $\delta^{13}\text{C}$  of wood of *Pinus pinaster* on four distinctive wood fractions in tree-rings: earlywood, “IADF”, transition early/latewood and latewood at the San Rossore forest, an Italian cousin of the Bray Site. The “IADF” fraction corresponds to a part of the annual ring exhibiting abrupt changes of wood density, that are related to environmental conditions, especially changing water availability during summer drought periods. The most enriched  $\delta^{13}\text{C}$ -value was found on the “IADF” fraction along four studied years from 1999 to 2002. This pattern matches clearly the peak values we found in 2005 and 2006 at the Bray site. Furthermore, our result is consistent with the intra-annual pattern assessed at high resolution on *Pinus sylvestris* tree that is flat (1 % of amplitude) and slightly variable along the growing season during wet years (Gessler et al., 2009). They found that the  $\delta^{13}\text{C}$  signal in tree-rings is uncoupled with the  $\delta^{13}\text{C}$  signal of sugars because of variable  $^{13}\text{C}$  enrichment of sugars related to phloem loading and transport. Transitory starch accumulation and remobilisation that induce  $\delta^{13}\text{C}$  variations of sugars seems not to have an effect on the  $\delta^{13}\text{C}$  signal in tree-rings. Our results of intra-annual variations of cellulose differs largely from the pattern found for deciduous trees (beech, poplar, oak) by Helle and Schleser (2004). Indeed, Helle and Schleser (2004) found in European beech a triphasic pattern of the intra-annual variations of  $\delta^{13}\text{C}$  of wood assessed at a high temporal resolution with an earlier peak in  $\delta^{13}\text{C}$  values followed by a



continuous decrease. This is clearly evoking a mobilisation of carbohydrate reserves enriched in  $^{13}\text{C}$  at the beginning of the growing season. The effect of storage and remobilisation of reserves, like starch, is also invoked by Skomarkova et al. (2006) on the same beech species. Starch, that is presumably  $^{13}\text{C}$ -enriched compared to total organic matter by 1 to 4 ‰ (Wilson and Wilson, 1977) ( $\delta^{13}\text{C}$ -value of -24 ‰) should be remobilised in carbohydrate pool used for tree-ring formation. Moreover, the remobilisation of starch is often linked with period of water shortage (drought) because of stomatal closure and decrease of carbon assimilation. As the offer in carbon by assimilation is not enough in comparison to the demand in carbon for wood synthesis, reserves are consequently mixed into sugar pool. In our case, the observed pattern seems to be representative to the isotopic discrimination during photosynthetic assimilation for the first part of the growth period. Indeed, the noticeable  $\delta^{13}\text{C}$ -values are consistent with  $\delta^{13}\text{C}$ -values of photoassimilates.

The strong  $^{13}\text{C}$ -enrichment could be explained by two hypotheses. First, the  $\delta^{13}\text{C}$  increased because of stomatal closure in summer that induced the enrichment of phloem sugars and of tree-rings. Indeed, the good synchronism between the Big Leaf WUE proxy, NEE, and the within-ring pattern of  $\delta^{13}\text{C}$  is in favour of this hypothesis. Accordingly, providing the cellulose deposition can be properly timed, the variations of  $\delta^{13}\text{C}$  found along the ring radius would reflect the photosynthetic discrimination that has occurred over the same time period. Second, this increase could be caused at least for a part by the effect of remobilisation of reserves in period of water shortage. The  $\delta^{13}\text{C}$  enrichment at the middle of the tree-rings can be due to both processes. The decline in  $\delta^{13}\text{C}$  values in the late part of the ring and growing season is more uncertain because we know that cellulose deposition could be much slower during this phase (Vaganov et al. 2006, Ugglá et al. 2001) so that our timing calculation used in Figure 6 may be biased.

## 5 Conclusions

Our objective was to determine and compare the cellulose  $\delta^{13}\text{C}$  values of the wood xylem and its temporal pattern between ecologically contrasted sites. Although we had to restrict the size of samples and measurements for technical reasons, we could evidence some differences between sites and years according to ecological and climate parameters. We conclude that drought is the main driver of the between-ring difference in  $\delta^{13}\text{C}$  and affects mainly the within-ring profile of  $\delta^{13}\text{C}$  -values and its amplitude. After synchronisation of the cellulose deposition with time (see chapter 5), we found a good analogy of  $\delta^{13}\text{C}$  with the Big-Leaf proxy of the intrinsic water use efficiency and with ecosystem GPP and NEE, which is in accordance with the photosynthetic carbon discrimination proposed by Farquhar et al. (1982). The symmetric variation of  $\delta^{13}\text{C}$  profile in the two halves of the annual ring explains the slight difference found between early- and late-wood. Our results demonstrate also that the

mean values of  $\delta^{13}\text{C}$  of either the entire annual ring or its earlywood and latewood parts may not be a good proxy for understanding climate signals. Instead, the amplitude of within ring values is clearly related to drought periods in the case studies here.

## Annexe 1

**Table 2** | Effect of site and year on wood measurements. Upper part of the table gives mean  $\pm$ SE values of carbon isotope ratio ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of cellulose of annual tree-rings,  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose in earlywood (EW) and in latewood (LW), mean ring width and mean wood density for three contrasted sites, Le Bray, Vielle Haut and Vielle Bas (Table 1) and for 7 years from 2001 to 2007. The  $\delta^{13}\text{C}$  values correspond of the mean over 5 cores ( $\pm$ SE) and the wood density values obtained by X-ray densitometry are mean on 6 trees ( $\pm$ SE) for the two stands from Vielle Soubiran site and mean on 17 trees ( $\pm$ SE) for Le Bray site. Bottom part of the table gives probability values of significant effects of the site, the year and interaction (ANOVA with repeated measurements, proc GLM, SAS software v 9.3). 'ns' means non-significant effect on the parameter.

Site	Wood measurements					Year
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ EW (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ LW (‰)	Ring width (mm)	Wood density ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )	
Le Bray	-25.6 $\pm$ 0.2	-25.9 $\pm$ 0.2	-25.4 $\pm$ 0.2	4.8	426 $\pm$ 8	2001
Vielle Haut	-24.9 $\pm$ 0.7	-24.9 $\pm$ 0.7	-25.8 $\pm$ 0.8	3.5	408 $\pm$ 19	
Vielle Bas	-24.8 $\pm$ 0.3	-25.5 $\pm$ 0.7	-24.2 $\pm$ 0.3	1.7	415 $\pm$ 6	
Le Bray	-25.0 $\pm$ 0.2	-25.1 $\pm$ 0.1	-24.9 $\pm$ 0.4	3.1	394 $\pm$ 9	2002
Vielle Haut	-24.4 $\pm$ 0.5	-24.4 $\pm$ 0.5	-24.7 $\pm$ 0.5	3.4	400 $\pm$ 23	
Vielle Bas	-25.2 $\pm$ 0.3	-25.4 $\pm$ 0.3	-25.0 $\pm$ 0.3	1.9	400 $\pm$ 7	
Le Bray	-25.1 $\pm$ 0.1	-25.2 $\pm$ 0.5	-25.0 $\pm$ 0.2	2.2	411 $\pm$ 10	2003
Vielle Haut	-24.0	-	-	2.8	378 $\pm$ 22	
Vielle Bas	-25.5 $\pm$ 0.2	-26.0 $\pm$ 0.3	-24.9 $\pm$ 0.2	2.0	374 $\pm$ 15	
Le Bray	-25.33 $\pm$ 0.05	-25.4 $\pm$ 0.2	-25.2 $\pm$ 0.2	3.8	421 $\pm$ 10	2004
Vielle Haut	-24.3	-	-	2.6	404 $\pm$ 25	
Vielle Bas	-25.5 $\pm$ 0.4	-25.7 $\pm$ 0.5	-25.3 $\pm$ 0.4	1.9	418 $\pm$ 18	
Le Bray	-25.27 $\pm$ 0.09	-25.7 $\pm$ 0.1	-24.8 $\pm$ 0.2	3.1	390 $\pm$ 9	2005
Vielle Haut	-24.7 $\pm$ 0.3	-24.7 $\pm$ 0.3	-24.7 $\pm$ 0.3	2.9	416 $\pm$ 25	
Vielle Bas	-25.3 $\pm$ 0.4	-25.6 $\pm$ 0.5	-25.0 $\pm$ 0.4	1.6	418 $\pm$ 11	
Le Bray	-25.4 $\pm$ 0.2	-25.6 $\pm$ 0.2	-25.5 $\pm$ 0.2	3.7	405 $\pm$ 8	2006
Vielle Haut	-25.3 $\pm$ 0.3	-25.3 $\pm$ 0.3	-25.1 $\pm$ 0.6	2.0	424 $\pm$ 18	
Vielle Bas	-26.0 $\pm$ 0.3	-26.2 $\pm$ 0.4	-26.0 $\pm$ 0.5	1.4	415 $\pm$ 15	
Le Bray	-26.0 $\pm$ 0.1	-26.2 $\pm$ 0.1	-25.9 $\pm$ 0.2	4.3	424 $\pm$ 14	2007
Vielle Haut	-25.5 $\pm$ 0.4	-25.5 $\pm$ 0.4	-25.7 $\pm$ 0.6	1.7	453 $\pm$ 35	
Vielle Bas	-26.1 $\pm$ 0.5	-26.6 $\pm$ 0.4	-25.6 $\pm$ 0.6	1.4	444 $\pm$ 15	
Site	0.01	0.003	0.05			
Year	0.01	0.001	0.002			
Site * Year	0.02	ns.	ns.			

## REFERENCES

- Badeck, W. F, Tcherkez, G., Nogues, S., Piel, C., Ghashghaie, J. 2005. Post-photo synthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs - a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(11): 1381-1391.
- Bert, D., Leavitt, W. S, Dupouey, L. J. 1997. Variations of wood delta C-13 and water-use efficiency of *Abies alba* during the last century. *Ecology* 78(5): 1588-1596.
- Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. In. 625-644.
- Cernusak, A. L, Tcherkez, G., Keitel, C., Cornwell, K. W, Santiago, S. L, Knohl, A., Barbour, M. M, Williams, G. D, Reich, B. P, Ellsworth, S. D, Dawson, E. T, Griffiths, G. H, Farquhar, D. G, Wright, J. I. 2009. Why are non-photosynthetic tissues generally  $^{13}\text{C}$  enriched compared with leaves in  $\text{C}_3$  plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology* 36(3): 199-213.
- Choisnel E., D. Payen and P. Lamarque, 1987. Climatologie de la Zone du projet HAPEX - MOBILHY, Météorologie Nationale, Paris (FRA), 75 p.
- Ciais P., M. Reichstein, N. Viovy, A. Granier, J. Ogee, V. Allard, M. Aubinet, N. Buchmann, C. Bernhofer, A. Carrara, F. Chevallier, N. De Noblet, A.D. Friend, P. Friedlingstein, T. Grunwald, B. Heinesch, P. Keronen, A. Knohl, G. Krinner, D. Loustau, G. Manca, G. Matteucci, F. Miglietta, J.M. Ourcival, D. Papale, K. Pilegaard, S. Rambal, G. Seufert, J.F. Soussana, M.J. Sanz, E.D. Schulze, T. Vesala and R. Valentini, 2005. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* 437(7058): 529-533.
- Delzon S. and D. Loustau, 2005. Age-related decline in stand water use: sap flow and transpiration in a pine forest chronosequence. *Agric For Meteorol* 129(3-4): 105-119.
- De Micco, V., Saurer, M., Aronne, G., Tognetti, R., Cherubini, P. 2007. Variations of wood anatomy and delta C-13 within-tree rings of coastal *Pinus pinaster* showing intra-annual density fluctuations. *IAWA Journal* 28(1): 61-74.
- Dupouey, L. J, Leavitt, S., Choisnel, E., Jourdain, S. 1993. Modeling Carbon-Isotope Fractionation in Tree-Rings Based on Effective Evapotranspiration and Soil-Water Status. *Plant Cell and Environment* 16(8): 939-947.
- Duquesnay, A., Breda, N., Stievenard, M., Dupouey, L. J. 1998. Changes of tree-ring delta C-13 and water-use efficiency of beech (*Fagus sylvatica* L.) in north-eastern France during the past century. *Plant Cell and Environment* 21(6): 565-572.
- Edwards, D. TW, Graf, W., Trimborn, P., Stichler, W., Lipp, J., Payer, D. H. 2000. delta C-13 response surface resolves humidity and temperature signals in trees. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64(2): 161-167.
- Farquhar, D. G, O'Leary, H. M, Berry, A. J. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9(2): 121-137.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503-537.

- Gessler A, Schrempp S, Matzarakis A, Mayer H, Rennenberg H, Adams M 2001. Radiation modifies the effect of water availability on the carbon isotope composition of beech (*Fagus sylvatica*). In. 653-664.
- Genet, H., Breda, N., Dufrene, E. Age-related variation in carbon allocation at tree and stand scales in beech (*Fagus sylvatica* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. *Tree Physiology* 30(2): 177-192.
- Gessler, A., Brandes, E., Buchmann, N., Helle, G., Rennenberg, H., Barnard, L. R. 2009. Tracing carbon and oxygen isotope signals from newly assimilated sugars in the leaves to the tree-ring archive. *Plant Cell and Environment* 32(7): 780-795.
- Gleixner, G., Scrimgeour, C., Schmidt, L. H, Viola, R. 1998. Stable isotope distribution in the major metabolites of source and sink organs of *Solanum tuberosum* L.: a powerful tool in the study of metabolic partitioning in intact plants. *Planta* 207(2): 241-245.
- Hemming, L. D, Switsur, R. V, Waterhouse, S. J, Heaton, E. TH, Carter, C. AH. 1998. Climate variation and the stable carbon isotope composition of tree ring cellulose: an intercomparison of *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* and *Pinus silvestris*. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 50(1): 25-33.
- Helle, G., Schleser, H. G. 2004. Beyond CO<sub>2</sub>-fixation by Rubisco - an interpretation of C-13/C-12 variations in tree rings from novel intra-seasonal studies on broad-leaf trees. *Plant Cell and Environment* 27(3): 367-380.
- Jarosz N., Y. Brunet, E. Lamaud, M. Irvine, J.M. Bonnefond and D. Loustau, 2008. Carbon dioxide and energy flux partitioning between the understorey and the overstorey of a maritime pine forest during a year with reduced soil water availability. *Agric For Meteorol* 148(10): 1508-1523.
- Keitel, C., Adams, A. M, Holst, T., Matzarakis, A., Mayer, H., Rennenberg, H., Gessler, A. 2003. Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-term measure for stomatal conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Cell and Environment* 26(7): 1157-1168.
- Leavitt, W. S, Long, A. 1991. Seasonal Stable-Carbon Isotope Variability in Tree Rings - Possible Paleoenvironmental Signals. *Chemical Geology* 87(1): 59-70.
- Leavitt, W. S. 1993. Seasonal C-13/C-12 Changes in Tree Rings - Species and Site Coherence, and a Possible Drought Influence. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 23(2): 210-218.
- Leavitt, W. S. 2002. Prospects for reconstruction of seasonal environment from tree-ring delta C-13: baseline findings from the Great Lakes area, USA. *Chemical Geology* 192(1-2): 47-58.
- McCarroll, D., Loader, J. N. 2004. Stable isotopes in tree rings. *Quaternary Science Reviews* 23(7-8): 771-801.
- Morin, X., Ameglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Miglietta, F., Chuine, I. 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology* 27(6): 817-825.
- Nguyen-Queyrens, A., Ferhi, A., Loustau, D., Guehl, M. J. 1998. Within-ring delta C-13 spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 28(5): 766-773.

- Ogee J., M.M. Barbour, L. Wingate, D. Bert, A. Bosc, M. Stievenard, C. Lambrot, M. Pierre, T. Bariac, D. Loustau and R.C. Dewar, 2009. A single-substrate model to interpret intra-annual stable isotope signals in tree-ring cellulose. *Plant, Cell and Env.* 32(8): 1071-1090.
- Porte A. and D. Loustau, 2001. Seasonal and interannual variations in carbon isotope discrimination in a maritime pine (*Pinus pinaster*) stand assessed from the isotopic composition of cellulose in annual rings. *Tree Physiol* 21(12-13): 861-868.
- Ponton, S., Dupouey, L. J, Breda, N., Feuillat, F., Bodenès, C., Dreyer, E. 2001. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant Cell and Environment* 24(8): 861-868.
- Reichstein M., E. Falge, D. Baldocchi, D. Papale, M. Aubinet, P. Berbigier, C. Bernhofer, N. Buchmann, T. Gilmanov, A. Granier, T. Grunwald, K. Havrankova, H. Ilvesniemi, D. Janous, A. Knohl, T. Laurila, A. Lohila, D. Loustau, G. Matteucci, T. Meyers, F. Miglietta, J.M. Ourcival, J. Pumpanen, S. Rambal, E. Rotenberg and M. Sanz, 2005. On the separation of net ecosystem exchange into assimilation and ecosystem respiration: review and improved algorithm. *Global Change Biol.* 11(9): 1424-1439.
- Saurer, M., Aellen, K., Siegwolf, R. 1997. Correlating delta C-13 and delta O-18 in cellulose of trees. *Plant Cell and Environment* 20(12): 1543-1550.
- Scartazza, Andrea, Mata, Catarina, Matteucci, Giorgio, Yakir, Dan, Moscatello, Stefano, Brugnoli, Enrico. 2004. Comparisons of  $\delta^{13}\text{C}$  of photosynthetic products and ecosystem respiratory  $\text{CO}_2$  and their responses to seasonal climate variability. *Oecologia* 140(2): 340-351.
- Schleser, H. G, Helle, G., Lucke, A., Vos, H. 1999. Isotope signals as climate proxies: the role of transfer functions in the study of terrestrial archives. *Quaternary Science Reviews* 18(7): 927-943.
- Schweingruber FH 1996. Tree rings and environment: dendroecology. *Tree rings and environment: dendroecology*. Berne Switzerland: Paul Haupt AG Bern, 609 pp.
- Skomarkova, V. M, Vaganov, A. E, Mund, M., Knohl, A., Linke, P., Boerner, A., Schulze, D. E. 2006. Inter-annual and seasonal variability of radial growth, wood density and carbon isotope ratios in tree rings of beech (*Fagus sylvatica*) growing in Germany and Italy. *Trees-Structure and Function* 20(5): 571-586.
- Stella P., E. Lamaud, Y. Brunet, J.M. Bonnefond, D. Loustau and M. Irvine, 2009. Simultaneous measurements of  $\text{CO}_2$  and water exchanges over three agroecosystems in South-West France. *Biogeosciences* 6(12): 2957-2971.
- Treydte, K., Schleser, H. G, Schweingruber, H. F, Winiger, M. 2001. The climatic significance of delta C-13 in subalpine spruces (Lotschental, Swiss Alps) - A case study with respect to altitude, exposure and soil moisture. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 53(5): 593-611.
- Treydte, S. K, Schleser, H. G, Helle, G., Frank, C. D, Winiger, M., Haug, H. G, Esper, J. 2006. The twentieth century was the wettest period in northern Pakistan over the past millennium. *Nature* 440(7088): 1179-1182.
- Trichet P., D. Loustau, C. Lambrot and S. Linder, 2008. Manipulating nutrient and water availability in a maritime pine plantation: effects on growth, production,

- and biomass allocation at canopy closure. *Annals of Forest Science* 65(8): 814p811-814p811.
- Uggla C., E. Magel, T. Moritz and B. Sundberg, 2001. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. *Plant Physiology* 125(4): 2029-2039.
- Vaganov E.A., 2006.
- Vaganov, E. A, Schulze, D. E, Skomarkova, V. M, Knohl, A., Brand, A. W, Roscher, C. 2009. Intra-annual variability of anatomical structure and delta C-13 values within tree rings of spruce and pine in alpine, temperate and boreal Europe. *Oecologia* 161(4): 729-745.
- Walcroft A.S., W.B. Silvester, D. Whitehead and F.M. Kelliher, 1997. Seasonal Changes in Stable Carbon Isotope Ratios within Annual Rings of *Pinus radiata* Reflect Environmental Regulation of Growth Processes. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 57-68.
- Wilson, T. A, Grinsted, J. M. 1977.  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  in cellulose and lignin as palaeothermometers. *Nature* 265(5590): 133-135.
- Wimmer R. 2002. Wood anatomical features in tree-rings as indicators of environmental change. *Dendrochronologia* 20(1-2): 21-36.
- Yakir, D., Issar, A., Gat, J., Adar, E., Trimborn, P., Lipp, J. 1994. C-13 and O-18 of Wood from the Roman Siege Rampart in Masada, Israel (Ad 70-73) - Evidence for a Less Arid Climate for the Region. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58(16): 3535-3539.
- Zimmermann, B., Schleser, H. G, Brauning, A. 1997. Preliminary results of a Tibetan stable C-isotope chronology dating from 1200 to 1994. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 33(1-2): 157-165.







Chapitre 6

---

Conclusion et Perspectives



Dans le cadre général de la compréhension du cycle biogéochimique du carbone, la démarche de mes recherches fut d'utiliser l'atome de carbone comme traceur isotopique en abondance naturelle au sein du végétal, afin de mieux comprendre la réponse fonctionnelle du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.), à son environnement climatique et hydrologique dans le contexte des Landes de Gascogne. Le but fut de construire un bilan de masse isotopique simple et partiel du carbone au niveau du tronc des arbres. A cette fin, les variations temporelles de la composition isotopique du carbone dans les trois principaux compartiments et flux de CO<sub>2</sub> du tronc ont été caractérisées à haute résolution pendant deux années consécutives, 2007 et 2008. Le suivi intensif du  $\delta^{13}\text{C}$  des trois composantes : (1) le pool de sucres phloémiens dans le tronc, (2) le CO<sub>2</sub> respiré au niveau du tronc et (3) la cellulose des cernes annuels du tronc a aussi permis de caractériser la variabilité temporelle des différents compartiments et de mettre en évidence l'existence de processus de fractionnement isotopique lors de la respiration du tronc et de la synthèse de la cellulose du bois, qui utilisent tous deux les sucres phloémiens comme substrat. De plus, les hypothèses proposées pour l'analyse de la composition isotopique du carbone des cernes annuels ont été vérifiées pour un ensemble de sites à conditions environnementales contrastées. Pour cela, la composition isotopique de la cellulose des cernes annuels des extrêmes écologiques rencontrés dans le massif forestier des Landes de Gascogne sur une période allant de plusieurs années allant de 2001 à 2007 a été mesurée.

## 1 Avancées méthodologiques

### 1.1 Extraction des sucres phloémiens

Le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres extraits du phloème par deux méthodes, l'exsudation et la centrifugation, a été suivi mensuellement de juin 2007 à décembre 2008 sur 5 à 10 arbres à 1,30 m de hauteur du site « Le Bray ».

La technique d'exsudation, la plus couramment utilisée, adaptée de Gessler et al. (2004), consista à plonger trois disques de phloème prélevés autour du tronc d'un arbre dans un solvant, soit de l'eau déminéralisée, pendant 4 heures à température ambiante. Par osmose, les sucres du phloème sont transférés du phloème (la partie la plus concentrée en sucres) vers l'eau déminéralisée (la partie la moins concentrée). D'un point de vue méthodologique, des tests sur le choix du temps d'exsudation et de la composition du solvant ont été réalisés (cf. Article 1). La deuxième technique, nommée « centrifugation », fut une nouvelle méthode d'extraction sans solvant développée en collaboration et qui a été améliorée et testée dans le cadre de ma thèse. Elle consista à passer à la centrifugeuse trois disques de phloème à travers du coton de verre pendant 10 min à 14000 g. L'intérêt était de récolter directement la sève phloémienne sans aucun ajout de solvant.

Afin de comparer ces deux méthodes d'extraction de sucres, les deux solutions de sucres extraits ont été analysées en teneur en sucres totaux par spectrophotométrie UV-Visible, en  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens par EA-IRMS (couplage d'un analyseur élémentaire avec un spectromètre de masse) et en  $\delta^{13}\text{C}$  des principaux constituants des solutions de sucres extraits, c'est-à-dire le saccharose, le glucose, le fructose et le pinitol (un cyclitol présent dans les conifères uniquement) par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) puis EA-IRMS. Les mesures par HPLC ont été réalisées lors d'une mission à Orsay dans le laboratoire ESE avec J. Ghashghaie et les analyses isotopiques de sucres ont été effectuées par la Plateforme « Métabolisme-Métabolome » de l'IFR 87 "La plante et son environnement".

Nous montrons que le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres totaux extraits par centrifugation et par exsudation est significativement identique, ce qui permet de dire que les deux méthodes d'extraction de sucres du phloème sont équivalentes. Par contre, la teneur en sucres extraits par centrifugation est deux fois moins importante que par exsudation pour des volumes différents. Le volume de sucres phloémiens extraits par centrifugation est de l'ordre du  $\mu\text{L}$  alors que par exsudation, on obtient une solution de sucres de l'ordre du mL. En effet par centrifugation on récolte directement la sève phloémienne alors que dans le cas de l'exsudation les sucres sont dilués dans un solvant, l'eau distillée. De plus, la méthode de centrifugation est plus rapide (10mn contre 4heures) et exige moins de manipulation que l'exsudation. Sachant que les deux méthodes d'extraction de sucres sont équivalentes du point de vue du  $\delta^{13}\text{C}$ , la méthode d'extraction de sucres par centrifugation serait donc la méthode la plus adéquate en comparaison de la méthode par exsudation.

De plus, la méthode de centrifugation est particulièrement prometteuse pour les mesures de  $\delta^{18}\text{O}$ . En effet, l'atome d'oxygène peut être échangé entre le phloème et l'eau distillée lors de l'extraction des sucres par exsudation. Afin de prendre en compte ce taux de transfert d'oxygène et donc d'accéder à la valeur de  $\delta^{18}\text{O}$  des sucres phloémiens, on utilise deux types d'eau dont on connaît le  $\delta^{18}\text{O}$ . Ceci rend donc la méthode encore plus fastidieuse à effectuer et en double le nombre d'analyses isotopiques à réaliser. Il reste encore à vérifier que le  $\delta^{18}\text{O}$  mesuré sur des sucres extraits par exsudation et par centrifugation est bien significativement identique, comme nous avons pu le démontrer dans le cas du carbone.

## **1.2 Mesure du $\delta^{13}\text{C}$ du $\text{CO}_2$ respiré au niveau du tronc par TDLAS**

Le  $\delta^{13}\text{C}$  des échanges gazeux de  $\text{CO}_2$  au niveau du tronc a été suivi en continu et à haute fréquence en 2007 et en 2008 par une technique de spectrométrie optique récente et nouvellement acquise dans le cadre du projet régional aquitain « Durabilité de la production forestière de Pin maritime ». Elle avait pour but de quantifier simultanément les flux de photosynthèse et de respiration (tronc, sol et écosystème) et leurs compositions isotopiques en carbone et en oxygène. Pour mesurer en continu les flux isotopiques ( $^{12}\text{CO}_2$ ,  $^{13}\text{CO}_2$ ,  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ) de photosynthèse et de respiration, les techniques classiques de spectrométrie (en

infrarouge à basse résolution spectrale) sont inappropriées. C'est pourquoi on utilise un spectromètre à diode laser modulable (TDLAS ou Tuneable Diode Laser Analyser System) multiplexé à des chambres de mesure d'échanges gazeux qui permet de mesurer les concentrations de ses flux isotopiques. Les adaptations techniques nécessaires à la mise en œuvre de cet instrument pour les mesures en multiplex opérées en mode quasi continu durant deux saisons de croissance ont été développées par R. Burlett, A. Bosc, J. Ogée et L. Wingate au cours de ma thèse et je m'y suis occasionnellement impliquée. Elles sont résumées dans l'article de L. Wingate (soumis) et présentées en annexe (Annexe III). La fréquence et la séquence d'échantillonnage et de calibration, la vidange des gaz résiduels dans le circuit de distribution (manifold) et le conditionnement des lignes de mesures ont été les principaux points améliorés et demeurent encore susceptibles d'amélioration.

Afin de mesurer le  $\delta^{13}\text{C}$  du flux de  $\text{CO}_2$  sortant du tronc, qui atteint des valeurs de  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , un développement méthodologique pour la construction de chambre de tronc ainsi que pour la mesure de flux isotopiques a été mené. En effet, la mesure de flux de très faible intensité au niveau du tronc de pin maritime s'est avérée complexe. Les améliorations ont porté sur le design de la forme de la chambre ainsi que le système de pompage d'air au travers de la chambre, qui est maintenant mise en pression au lieu d'être en dépression. L'incertitude de mesure obtenue par TDLAS après ces améliorations techniques a pu être diminuée à moins de 1 %. En complément, des mesures du flux total de  $\text{CO}_2$  respiré par le tronc ont été simultanément mesurées par spectromètre à infrarouge (IRGA) afin d'évaluer nos mesures de flux obtenus par TDLAS. Les mesures obtenues par TDLAS sont en accord avec celles mesurées par IRGA. Cependant, il est nécessaire de continuer à développer cette technique afin de réduire encore l'incertitude de mesure.

### **1.3 Mesure à haute résolution du $\delta^{13}\text{C}$ de la cellulose des cernes**

La mesure du  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes annuels, c'est-à-dire l'analyse isotopique du bois total, du bois initial et final, était une méthode déjà développée au laboratoire (Nguyen-Queyrens *et al.*, 1998 ; Porté et Loustau, 2001). Par la suite, les recherches sur la variabilité et le déterminisme du  $\delta^{13}\text{C}$  des cernes annuels ont conduit à la découpe des cernes à plus haute résolution, c'est-à-dire à des coupes de cernes de  $100 \mu\text{m}$  d'épaisseur uniquement. J'avais en effet participé en début de thèse à des coupes de cernes de  $100 \mu\text{m}$  sur 10 ans (1997 à 2007) sur une carotte prélevée sur un pin maritime du même site que celui étudiée pendant ma thèse (Le Bray) ainsi qu'à la purification de la cellulose dans un extracteur (soxhlet) selon une adaptation de la procédure Jayme-Wise (Leavitt *et al.* 1993) et sa mise en capsules dans le but d'analyser le  $\delta^{13}\text{C}$  et le  $\delta^{18}\text{O}$  de la cellulose par EA-IRMS. Cependant, pendant ma thèse, le plan expérimental était bien plus important ; il représentait plus de 500 échantillons de fractions de bois découpées dont on voulait analyser le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose extraite. En effet, comme le but était de comparer plusieurs sites (3 parcelles de pins maritimes) à caractères

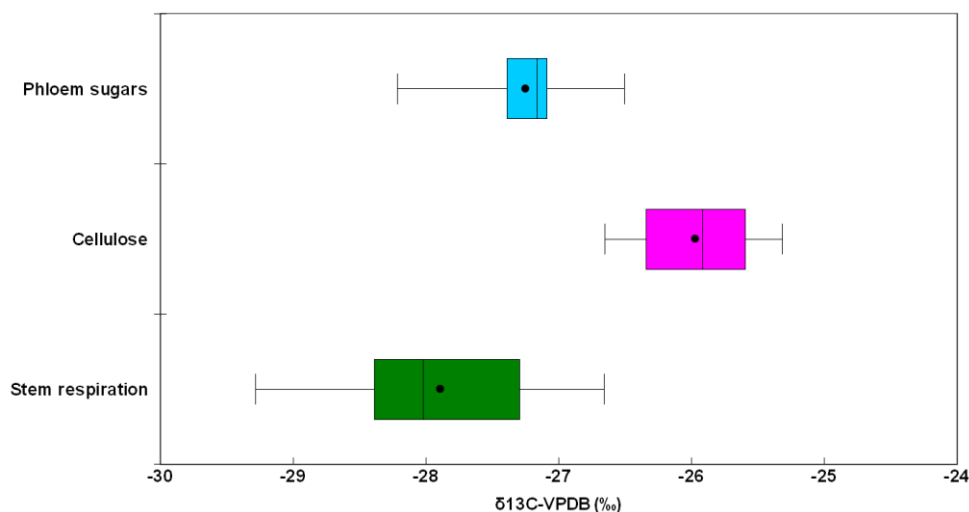
climatiques et pédologiques différents sur plusieurs années de croissance des cernes incluant des années de sécheresse et des années à caractère humide, on a donc mesuré le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose sur 7 années de 2001 à 2007 sur plusieurs arbres (3 arbres par parcelle de pins maritimes) et à différentes résolutions de découpe : de basse (4 coupes par cernes) à haute résolution (des fraction de bois de  $100\mu\text{m}$  d'épaisseur). Cette technique pourrait maintenant être développée à plus haut débit, moyennant quelques aménagements.

## 2 Résultats marquants

Dans le but de caractériser la composition isotopique des différents compartiments du tronc ainsi que leurs variations temporelles et d'étudier les fractionnements post-photosynthétiques correspondants, une année intensive d'expérimentation a été menée sur des pins maritimes de 36ans sur le site expérimental Le Bray. La première phase de la thèse fut donc une étude expérimentale de la composition isotopique à haute résolution temporelle de ces trois composantes tout au long de l'année 2007 afin de pouvoir comprendre comment fonctionne le pin maritime, en particulier en période de sécheresse estivale. En effet, les événements de sécheresse estivale sont fréquents sur ce site et ont été observés les années 2002, 2003, 2005 et 2006 et induisent chez le pin maritime un stress hydrique bien caractérisé et qui affecte potentiellement la signature isotopique des composantes du cycle du carbone dans l'arbre. Malheureusement, les deux années que nous avons pu étudier, 2007 et 2008, n'ont pratiquement connu aucune période de déficit en eau ; les pins étudiés n'ont donc subi aucun stress hydrique important. Finalement, ces deux années caractéristiques sont donc deux années de référence « témoin ». Nous avons cependant pu comparer le profil de  $\delta^{13}\text{C}$  intra-cerne à celui des cernes des années précédentes durant lesquelles une sécheresse plus ou moins intense avait eu lieu. De plus, le deuxième volet de mes recherches était de comparer les résultats obtenus sur le site du Bray en Lande humide avec un site caractéristique de la Lande sèche de la région landaise, « Vielle Soubiran ». Pour cela, le  $\delta^{13}\text{C}$  des cernes annuels a été finement étudiés sur les deux sites contrastés, depuis 2001 jusqu'à 2007 afin de comparer le  $\delta^{13}\text{C}$  des deux sites et des différentes années.

Les mesures de la signature isotopique en carbone des trois principaux compartiments du tronc de pins maritimes du « Bray » pendant l'année 2007 montrent que le  $\delta^{13}\text{C}$  moyen de la cellulose est enrichi en  $^{13}\text{C}$  d'environ 1‰ et que le  $\delta^{13}\text{C}$  moyen du  $\text{CO}_2$  respiré du tronc est, par contre, appauvri en  $^{13}\text{C}$  de 0 à 1‰ en comparaison de leur substrat, les sucres phloémiens (Figure 1). On constate une forte amplitude de variation du  $\delta^{13}\text{C}$  entre les trois composantes étudiées, la respiration du tronc, les sucres phloémiens et la cellulose du cerne de 2‰ avec une gamme de  $\delta^{13}\text{C}$  moyen allant de -26‰ à -28‰. L'amplitude de variations intra-annuelles des  $\delta^{13}\text{C}$  de chaque constituant varie d'environ 0.3‰ pour la cellulose des cernes, d'environ 0,7‰ pour les sucres phloémiens et d'environ 1‰ pour le  $\text{CO}_2$  respiré. Les mesures de  $\delta^{13}\text{C}$  des autres compartiments de l'écosystème forestier indiquent une amplitude de variation totale de 9‰ dont la matière organique des sucres solubles des aiguilles est la signature

isotopique la plus appauvrie en  $^{13}\text{C}$  (-31‰), et la respiration au niveau des branches de la canopée est la signature isotopique la plus enrichie en  $^{13}\text{C}$  (-22‰) (Annexe I).



**Figure 1.** Synthèse des compositions isotopiques en carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) mesurées au Bray pendant l'année 2007 sur les trois compartiments du tronc : les sucres phloémiens (en haut), la cellulose des cernes (au milieu) et le  $\text{CO}_2$  « respiré » par le tronc (en bas). Les points représentent la moyenne ; la boîte représente la médiane et les quartiles (25%) et les barres extrêmes sont les limites des données à 10% et 90%.

Cette amplitude de variation du  $\delta^{13}\text{C}$  au sien de la plante confirme qu'il est possible d'étudier le fonctionnement de la plante par comparaison des signatures isotopiques entre les différents compartiments ainsi que d'utiliser les variabilités temporelles du  $\delta^{13}\text{C}$  de chaque compartiment comme traceurs de fonctionnement.

## 2.1 Le $\delta^{13}\text{C}$ des sucres phloémiens

La teneur en sucres et la composition isotopique en carbone des sucres phloémiens ont été étudiées à plusieurs échelles de temps : diurne, journalière et saisonnière. On étudie à la fois les sucres totaux ainsi que les principaux sucres et constituants (le saccharose, le glucose, le fructose et le pinitol).

A l'échelle diurne, ni la teneur en sucres, ni le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens ne varie significativement dans le temps pour les deux méthodes d'extraction de sucres. La teneur en sucres n'est pas significativement variable d'un jour à l'autre pendant une période de 20 jours en 2008. Ce résultat nous permet d'être confiant sur les variations de  $\delta^{13}\text{C}$  observés à l'échelle saisonnière pour laquelle les mesures de teneur en sucres et aussi de  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres, a été mesurées mensuellement.

A l'échelle saisonnière, nous avons montré que la teneur en sucres totaux dans le tronc de l'arbre à 1.30m varie au cours du temps avec des valeurs basses en été lorsque le pool de sucres phloémiens est utilisé pour la synthèse de la cellulose des cernes et des valeurs élevées en hiver lors de la période de non-croissance du cerne (Partie 3). De plus, les sucres phloémiens sont plus enrichis en  $^{13}\text{C}$  pendant la période de croissance et plus appauvris en



période de non croissance (Partie 3 et 4). En conclusion, nous avançons que les variations saisonnières de la teneur et des  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres sont en fait directement reliées à la saisonnalité de la croissance du cerne annuel.

## **2.2 Le $\delta^{13}\text{C}$ du $\text{CO}_2$ respiré par le tronc**

Pendant deux années, les cinétiques saisonnières du  $\delta^{13}\text{C}$  de la respiration du tronc ont été étudiées *in situ* à haute résolution par TDLAS. On montre que le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré par le tronc a tendance à augmenter au cours de la saison de croissance et à diminuer en fin d'année. Cependant et en dépit des améliorations constamment apportées au dispositif de mesure, ces mesures sont encore entachées d'une incertitude de mesure telle qu'il a été délicat de relier les variations observées avec les conditions climatiques environnantes. Les mesures de  $\delta^{13}\text{C}$  de la respiration au niveau du tronc réalisées à deux niveaux, sous la couronne et à la base du tronc pendant une quinzaine de jours en hiver 2008 montrent des signatures isotopiques identiques, mais avec un décalage dans le temps de quelques jours. Nous concluons de ces mesures qu'il n'y aurait pas de fractionnement isotopique post-photosynthétique lors du transfert des sucres via le phloème. Le temps de parcours des sucres phloémiens depuis la canopée où ils sont assimilés jusqu'à la base du tronc serait de quelques jours et correspondrait donc à une vitesse de transfert comprise entre 0.1 et 0.2  $\text{m.h}^{-1}$ , en cohérence avec les données collectées sur de grands arbres et rapportées dans la littérature (Partie 4 et Annexe I).

## **2.3 Le $\delta^{13}\text{C}$ de la cellulose des cernes annuels**

Le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes annuels sur trois placettes, Le Bray et Vielle Haut et Vielle Bas a été caractérisé. Ces placettes ont été choisies car elles possèdent des caractères hydrologiques et pédologiques contrastées : Vielle Bas à sous-bois de callune est une lande sèche alors que Vielle Haut à sous-bois de fougères est une lande mésophile et Le Bray est caractéristique de la lande humide. De façon inattendue, nous montrons que ces caractéristiques ne se reflètent pas de façon claire dans les dynamiques temporelles de  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose du bois. On s'attendait à ce que le  $\delta^{13}\text{C}$  soit nettement plus enrichi en  $^{13}\text{C}$  pour les sites (saisons) secs (à Vielle Bas) et que le  $\delta^{13}\text{C}$  soit plus appauvri en  $^{13}\text{C}$  pour les sites (saisons) humides (Vielle Haut). Pour expliquer ce résultat contraire, nous avançons l'hypothèse que le fonctionnement hydraulique des arbres du site de Vielle se serait adapté à leur environnement, c'est-à-dire une faible teneur en eau du sol dans les 80 premiers cm du sol. Au contraire, au site du Bray, la teneur en eau du sol fluctue saisonnièrement de façon spectaculaire, elle est bien plus importante en hiver en présence de la nappe phréatique et chute fortement en période estivale atteignant rapidement le point de flétrissement en période de sécheresse. Cette alternance saisonnière expose les arbres du Bray au stress hydrique estival alors que la relative stabilité des conditions hydrologiques en lande sèche et l'accès des arbres aux ressources hydriques en profondeur auraient permis une adaptation du peuplement. Cette adaptation supposée expliquerait que la composition isotopique des arbres de ces sites

« secs » soit plus stable dans le temps que celle des arbres d'un site « humide » comme Le Bray.

Sur la série temporelle étudiée qui va de 2001 à 2008, nous observons pour toutes les années et tous les sites étudiés, un patron commun de dynamique intra-annuelle du  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose lors de sa déposition dans le cerne annuel. Cette dynamique est différente selon les conditions climatiques qui diffèrent d'une année à l'autre. En 2007 et 2008, ce pattern est très plat, quasi invisible puisque ces deux années consécutives sont très humides avec aucun déficit en eau alors qu'en 2005 et 2006, la dynamique annuelle présente une augmentation initiale rapide, puis un pic marqué à mi saison suivi d'une chute rapide des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$ . L'amplitude des valeurs atteinte pour ces années est le double (4 ‰) avec des valeurs allant de -28 ‰ à -24 ‰ de ce qu'elle est en année humide. Cette dynamique une fois synchronisée avec le fonctionnement biophysique annuel des peuplements, ainsi que ses variations inter-annuelles et inter-sites, apparaissent bien compatibles avec le modèle de discrimination photosynthétique de Farquhar et al. (1982). Les résultats de cette partie de notre travail ne permettent cependant pas de mettre en évidence ou de contredire un rôle possible d'une discrimination post photosynthétique liée à la mobilisation de réserves.

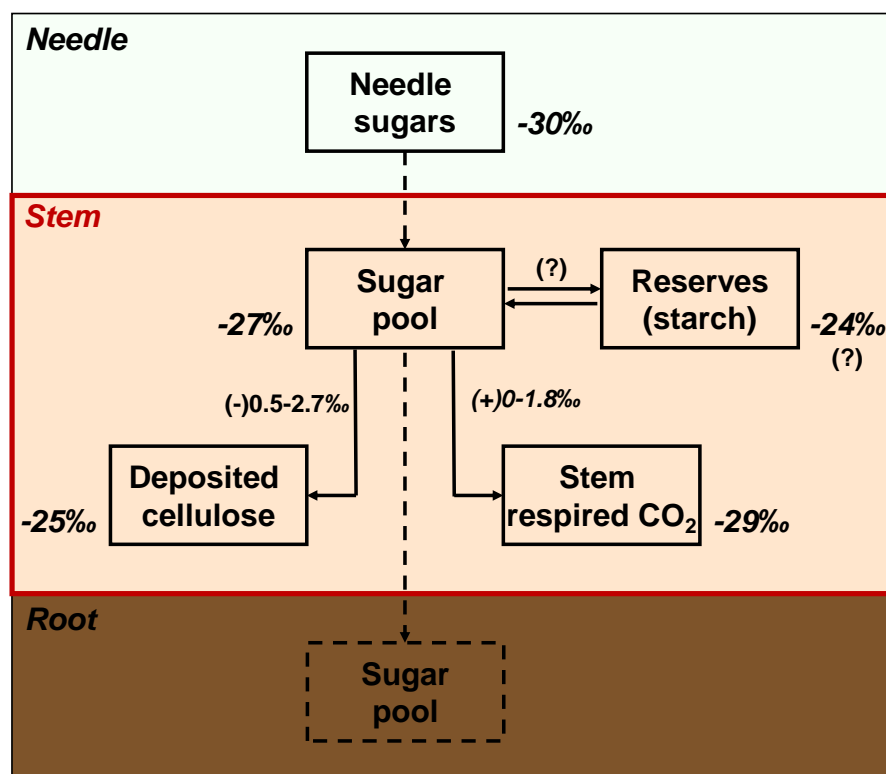
Nous retiendrons ici que le signal isotopique du carbone de la cellulose du xylème du Pin maritime est cohérent avec le modèle de discrimination de Farquhar à haute résolution. Nous montrons que l'utilisation de ce signal pour la reconstruction fine du fonctionnement des arbres et de sa sensibilité au climat suppose la mobilisation de données supplémentaires essentielles comme le profil microdensitométrique du bois et la phénologie de l'activité cambiale. Nous concluons à cet égard que l'amplitude intra-cerne du signal apparaît un proxy climatique plus sensible que sa valeur moyenne saisonnière ou annuelle.

#### **2.4 Processus de fractionnement post-photosynthétique**

Peu d'ensemble de données expérimentales aussi détaillé que celui présenté ici ont été publiés à ce jour. Seules quelques synthèses utilisant les résultats de plusieurs études (Badeck et al. 2005, Cernusak et al. 2009, Gessler et al. 2009) montrent les dernières avancées sur l'existence des processus de fractionnement post-photosynthétique. De ce fait, un objectif de la thèse fut de montrer s'il existait ou non des processus de fractionnement post-photosynthétique en comparant le  $\delta^{13}\text{C}$  du substrat et le  $\delta^{13}\text{C}$  du produit du processus de fractionnement à l'étude. Dans le cas de la respiration, on a comparé les séries temporelles de  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  « respiré » au niveau du tronc (le produit) avec celles du  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens au même niveau (le substrat). De la même manière, on a comparé le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes (le produit) avec le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens (le substrat).

Les résultats obtenus sont résumés sur le schéma conceptuel de ma démarche de recherche dans lequel les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  mesurés ont été ajoutées pour les différents compartiments et processus (Figure 2). On montre que les processus de discrimination post-photosynthétique de

respiration du tronc et de synthèse de cellulose opèrent des fractionnements opposés pendant la saison de croissance. En effet, les sucres phloémiens sont enrichis en  $^{13}\text{C}$  par comparaison au  $\text{CO}_2$  respiré au niveau du tronc. Ils sont inversement appauvris en  $^{13}\text{C}$  par rapport au  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose déposée dans le cerne. En période de non-croissance des cernes annuels, ce fractionnement isotopique semble bien s'annuler (Partie 5).



**Figure 2.** Schéma conceptuel de la thèse résumant les différents résultats de fractionnement isotopique de discrimination du carbone

Par conséquent, on montre bien l'existence de processus de fractionnement isotopique post-photosynthétique lors de la croissance de nouveaux tissus : un fractionnement positif lors de la respiration au niveau du tronc et un fractionnement négatif lors de la synthèse de la cellulose (Partie 5).

Nos résultats ne sont pas en accord avec la littérature. Par exemple, nous avons montré que le  $\text{CO}_2$  respiré au niveau du tronc était appauvri en  $^{13}\text{C}$ , comparé aux substrats de la respiration (les sucres du phloème). Cependant certaines études montrent que la respiration au niveau du tronc est enrichie en  $^{13}\text{C}$  (Maunoury *et al.*, 2007 ; Kodama *et al.*, 2006 ; Brandes *et al.*, 2006). L'appauvrissement en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré observé dans notre étude est cependant en accord avec les études menées sur la respiration des racines (Klumpp *et al.*, 2005 ; Bathellier *et al.*, 2009). En opposition au processus de photosynthèse pour lequel l'isotope lourd ( $^{13}\text{C}$ ) est discriminé en faveur de l'isotope léger ( $^{12}\text{C}$ ), laissant le  $\text{CO}_2$  atmosphérique enrichi en  $^{13}\text{C}$  et les feuilles appauvries en  $^{13}\text{C}$  (Farquhar *et al.* 1982, 1989), la respiration libère un  $\text{CO}_2$  appauvri en  $^{13}\text{C}$  en laissant le substrat de la respiration enrichi en  $^{13}\text{C}$ .

Cependant, notre étude étant basée sur la construction d'un bilan isotopique simple dans lequel le  $\delta^{13}\text{C}$  des principaux compartiments a simultanément été mesuré, permet de démontrer que l'enrichissement isotopique des sucres du phloème lors de la respiration du tronc est contrebalancé par leur appauvrissement lors de la synthèse de la cellulose des cernes annuels. En effet, lors de la croissance des nouveaux tissus, un fractionnement positif est démontré, laissant les sucres phloémiens appauvris en  $^{13}\text{C}$  et la cellulose synthétisée enrichie en  $^{13}\text{C}$ . Ce résultat est en accord avec Gessler et al (2009) qui montre également un enrichissement de la cellulose en  $^{13}\text{C}$  en comparaison avec son substrat, les sucres du phloème.

De plus, on présume, en surcroît de la discrimination isotopique du carbone lors de l'assimilation photosynthétique, un effet de stockage et remobilisation des réserves, l'amidon. En effet, comme le  $\delta^{13}\text{C}$  de la cellulose des cernes atteint parfois des valeurs de -24 ‰, qui correspondent à la signature isotopique de l'amidon, on peut se demander si, spécialement en période sécheresse, l'amidon ne pourrait se remobiliser dans le phloème, enrichissant ainsi la signature isotopique des sucres et par conséquent, celles de la cellulose. Cette hypothèse reste ouverte puisque nous n'avons pas pu mesurer le  $\delta^{13}\text{C}$  des réserves au cours de nos expérimentations.

### 3 Perspectives

Les résultats du bilan isotopique simple au niveau du tronc de conifères montrent des dynamiques temporelles des  $\delta^{13}\text{C}$  des principaux compartiments du tronc ainsi que l'existence de processus de fractionnement post-photosynthétique lors de la respiration du tronc et lors de la synthèse de la cellulose, dont les flux de masse se compensent pendant la période de croissance. Ce bilan ignore toutefois des constituants organiques importants du tronc dont la teneur isotopique est connue pour s'écarter négativement de celle des sucres du phloème comme la lignine, les lipides et les composés terpéniques formant la résine. Ce point pourrait faire l'objet d'un volet supplémentaire dans cette thématique de recherche.

Les expérimentations menées pendant ma thèse se sont déroulées durant deux années humides, pour lesquelles on n'a pas pu étudier la réponse fonctionnelle des arbres à un déficit en eau. Il demeure donc pertinent de mener les expérimentations pour des années de type 2003 et 2005 ou en induisant de façon expérimentale un état de stress chez de gros arbres. Le fait d'étudier deux années humides nous a cependant permis de comprendre le fonctionnement de pins maritimes hors stress hydrique intense. Il serait bien évidemment très intéressant de continuer à mener ces expérimentations les années suivantes afin (i) de comparer les résultats obtenus en 2007 et 2008 avec des résultats en années sèches avec stress hydrique intense et de (ii) de vérifier que le bilan de masse isotopique au niveau du tronc se maintient dans le cas de stress hydrique. De plus, il faudrait simultanément mesurer le  $\delta^{13}\text{C}$  des réserves afin de tester l'hypothèse de remobilisation des réserves telle quelle a été démontrée pour les feuillus.

Cependant ces expérimentations de suivi de la composition isotopique du  $\delta^{13}\text{C}$  en abondance naturelle sur de grands arbres, tels les pins maritimes de 36 ans étudiés au Bray nécessitent d'importantes contributions techniques qui réclament des mises au point méthodologiques (mesure par TDLAS, découpe fine de fractions de bois au microtome, etc.) et un suivi intensif et long s'étalant sur une saison de croissance ou même sur une année complète de mesure. De ce fait, afin de s'affranchir de quelques contraintes, on pourrait imaginer des expériences de mises en sécheresse des arbres afin de pouvoir effectivement étudier le fonctionnement des arbres en période de sécheresse. On pourrait ainsi mesurer le  $\delta^{13}\text{C}$  des sucres phloémiens, réserves, composés lipidiques et terpéniques ainsi que la lignine, le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  respiré et de la cellulose du bois synthétisée avant et pendant la période de stress hydrique afin de compléter le modèle isotopique construit pendant ma thèse. Ce type d'expérimentation comporte d'importantes contraintes techniques mais il permettrait de répondre plus rapidement et de façon contrôlée à ces questions.

De plus, pour aider à la compréhension du fonctionnement des arbres au niveau du tronc ou à l'échelle du plante entière, des expériences de traçage isotopique par marquage du carbone assimilé tels que cela est actuellement en cours dans le projet ANR CATS auquel j'ai contribué de façon marginale à la fin de ma thèse, permettront de suivre le carbone marqué depuis l'assimilation photosynthétique jusqu'à la respiration au niveau du tronc, au niveau du sol et des racines. Le but serait de mesurer le temps de transfert des sucres phloémiens et ses variations saisonnières et d'estimer la part de carbone utilisé dans la respiration du tronc, du sol et des racines ainsi que celle allouée pour la synthèse du bois.

# *Références bibliographiques*



- Bachelier, G., Gavinelli, R. 1966.** Dosage global des glucides du sol par les méthodes colorimétriques à l'antrone et à l'orcino. *Cah. ORSTOM. sér. Pédol.* **IV**(3): 97-103.
- Badeck, W. F., Tcherkez, G., Nogues, S., Piel, C., Ghashghaie, J. 2005.** Post-photo synthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs - a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**(11): 1381-1391.
- Barbour, M. M., McDowell, G. N., Tcherkez, Guillaume, Bickford, P. C., Hanson, T. D. 2007.** A new measurement technique reveals rapid post-illumination changes in the carbon isotope composition of leaf-respired CO<sub>2</sub>. **30**(4): 469-482.
- Barbour, M. M., Walcroft, S. A., Farquhar, D. G. 2002.** Seasonal variation in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of cellulose from growth rings of *Pinus radiata*. *Plant Cell Environment* **25**(11): 1483-1499.
- Barbour MM, Walcroft AS, Farquhar GD 2002.** Seasonal variation in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of cellulose from growth rings of *Pinus radiata*. In. 1483-1499.
- Bathellier, C., Badeck, W. F., Couzi, P., Harscoet, S., Mauve, C., Ghashghaie, J. 2008.** Divergence in  $\delta^{13}\text{C}$  of dark respired CO<sub>2</sub> and bulk organic matter occurs during the transition between heterotrophy and autotrophy in *Phaseolus vulgaris* plants. *New Phytologist* **177**(2): 406-418.
- Bathellier, C., Tcherkez, G., Bligny, R., Gout, E., Cornic, G., Ghashghaie, J. 2009.** Metabolic origin of the  $\delta^{13}\text{C}$  of respired CO<sub>2</sub> in roots of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* **181**(2): 387-399.
- Berbigier P, Bonnefond J-M, Mellmann P. 2001.** CO<sub>2</sub> and water vapour fluxes for 2 years above Euroflux forest site. *Agricultural and Forest Meteorology* **108**: 183-197.
- Bert, D., Leavitt, W. S., Dupouey, L. J. 1997.** Variations of wood  $\delta^{13}\text{C}$  and water-use efficiency of *Abies alba* during the last century. *Ecology* **78**(5): 1588-1596.
- Bowling, R. D., Pataki, E. D., Randerson, T. J. 2008.** Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO<sub>2</sub> fluxes. *New Phytologist* **178**(1): 24-40.
- Brandes, E., Kodama, N., Whittaker, K., Weston, C., Rennenberg, H., Keitel, C., Adams, A. M., Gessler, A. 2006.** Short-term variation in the isotopic composition of organic matter allocated from the leaves to the stem of *Pinus sylvestris*: effects of photosynthetic and postphotosynthetic carbon isotope fractionation. *Global Change Biology* **12**(10): 1922-1939.
- Brandes, E., Wenninger, J., Koeniger, P., Schindler, D., Rennenberg, H., Leibundgut, C., Mayer, H., Gessler, A. 2007.** Assessing environmental and physiological controls over water relations in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stand through analyses of stable isotope composition of water and organic matter. *Plant Cell and Environment* **30**(1): 113-127.
- Brugnoli, E., Hubick, T. K., Caemmerer, von S, Wong, C. S, Farquhar, D. G. 1988.** Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C<sub>3</sub> plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiology* **88**(4): 1418-1424.
- Cernusak, A. L, Farquhar, D. G, Pate, S. J. 2005.** Environmental and physiological controls over oxygen and carbon isotope composition of Tasmanian blue gum, *Eucalyptus globulus*. **25**(2): 129-146.
- Cernusak, A. L, Tcherkez, G., Keitel, C., Cornwell, K. W, Santiago, S. L, Knohl, A., Barbour, M. M, Williams, G. D, Reich, B. P, Ellsworth, S. D, Dawson, E. T, Griffiths, G. H, Farquhar, D. G, Wright, J. I. 2009.** Why are non-photosynthetic tissues generally  $^{13}\text{C}$  enriched compared with leaves in C<sub>3</sub> plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology* **36**(3): 199-213.



- Chevallier, F., Fortems, A., Bousquet, P., Pison, I., Szopa, S., Devaux, M., Hauglustaine, A. D. 2009.** African CO emissions between years 2000 and 2006 as estimated from MOPITT observations. *Biogeosciences* **6**(1): 103-111.
- Ciais, P., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogee, J., Allard, V., Aubinet, M., Buchmann, N., Bernhofer, C., Carrara, A., Chevallier, F., Noblet D, N., Friend, D. A, Friedlingstein, P., Grunwald, T., Heinesch, B., Keronen, P., Knohl, A., Krinner, G., Loustau, D., Manca, G., Matteucci, G., Miglietta, F., Ourcival, M. J, Papale, D., Pilegaard, K., Rambal, S., Seufert, G., Soussana, F. J, Sanz, J. M, Schulze, D. E, Vesala, T., Valentini, R. 2005.** Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **437**(7058): 529-533.
- Craig H. 1954.** Carbon 13 in Plants and the Relationships between Carbon 13 and Carbon 14 Variations in Nature. *The Journal of Geology* **62**(2): 115-149.
- Damesin, C., Lelarge, C. 2003.** Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant Cell and Environment* **26**(2): 207-219.
- Dawson, E T, Siegwolf, W RT. 2007.** *Stable isotopes as indicators of ecological change*: Elsevier.
- Dawson, E. T, Mambelli, S., Plamboeck, H. A, Templer, H. P, Tu, P. K. 2002.** Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 507-559.
- Deleens E. 1976.** C-13 Discrimination and 3 Metabolism Types of Plants. *Physiologie Vegetale* **14**(3): 641-656.
- Devaux, Marion, Ghashghaie, Jaleh, Bert, Didier, Lambrot, Catherine, Gessler, Arthur, Bathellier, Camille, Ogee, Jérôme, Loustau, Denis. 2009.** Carbon stable isotope ratio of phloem sugars in mature pine trees throughout the growing season: comparison of two extraction methods. **23**(16): 2511-2518.
- Dupouey, L. J, Leavitt, S., Choisnel, E., Jourdain, S. 1993.** Modeling Carbon-Isotope Fractionation in Tree-Rings Based on Effective Evapotranspiration and Soil-Water Status. *Plant Cell and Environment* **16**(8): 939-947.
- Duranceau, M., Ghashghaie, J., Badeck, F., Deleens, E., Cornic, G. 1999.** delta C-13 of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to delta C-13 of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L-under progressive drought. *Plant Cell and Environment* **22**(5): 515-523.
- Duranceau, M., Ghashghaie, J., Bruognoli, E. 2001.** Carbon isotope discrimination during photosynthesis and dark respiration in intact leaves of *Nicotiana sylvestris*: comparisons between wild type and mitochondrial mutant plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**(1): 65-71.
- Edwards, D. TW, Graf, W., Trimborn, P., Stichler, W., Lipp, J., Payer, D. H. 2000.** delta C-13 response surface resolves humidity and temperature signals in trees. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**(2): 161-167.
- Eglin, T., Fresneau, C., Lelarge-Trouverie, C., Francois, C., Damesin, C. 2009.** Leaf and twig C-13 during growth in relation to biochemical composition and respired CO<sub>2</sub>. *Tree Physiology* **29**(6): 777-788.
- Ehleringer, R. J, Field, B. C, Lin, F. Z, Kuo, Y. C. 1986.** Leaf Carbon Isotope and Mineral-Composition in Subtropical Plants Along an Irradiance Cline. *Oecologia* **70**(4): 520-526.
- Falkowski, P., Scholes, J. R, Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Hogberg, P., Linder, S., Mackenzie, T. F, Moore, B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V., Steffen, W. 2000.** The global carbon cycle: A test of our knowledge of earth as a system. *Science* **290**(5490): 291-296.
- Farquhar, D. G. 1983.** On the Nature of Carbon Isotope Discrimination in C-4 Species. *Australian Journal of Plant Physiology* **10**(2): 205-226.

- Farquhar, D. G, O'Leary, H. M, Berry, A. J. 1982.** On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **9**(2): 121-137.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989.** Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 503-537.
- Ferrio, P. J, Voltas, J. 2005.** Carbon and oxygen isotope ratios in wood constituents of *Pinus halepensis* as indicators of precipitation, temperature and vapour pressure deficit. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* **57**(2): 164-173.
- Gagen, M., McCarroll, D., Loader, J. N, Robertson, L., Jalkanen, R., Anchukaitis, J. K. 2007.** Exorcising the 'segment length curse': Summer temperature reconstruction since AD 1640 using non-detrended stable carbon isotope ratios from pine trees in northern Finland. *Holocene* **17**(4): 435-446.
- Gessler, A., Brandes, E., Buchmann, N., Helle, G., Rennenberg, H., Barnard, L. R. 2009.** Tracing carbon and oxygen isotope signals from newly assimilated sugars in the leaves to the tree-ring archive. *Plant Cell and Environment* **32**(7): 780-795.
- Gessler, A., Keitel, C., Kodama, N., Weston, C., Winters, J. A, Keith, H., Grice, K., Leuning, R., Farquhar, D. G. 2007.**  $\delta$  C-13 of organic matter transported from the leaves to the roots in *Eucalyptus delegatensis*: short-term variations and relation to respired CO<sub>2</sub>. *Functional Plant Biology* **34**(8): 692-706.
- Gessler, A., Rennenberg, H., Keitel, C. 2004.** Stable isotope composition of organic compounds transported in the phloem of European beech - Evaluation of different methods of phloem sap collection and assessment of gradients in carbon isotope composition during leaf-to-stem transport. *Plant Biology* **6**(6): 721-729.
- Ghashghaie, J., Duranceau, M., Badeck, W. F, Cornic, G., Adeline, T. M, Deleens, E. 2001.**  $\delta$  C-13 of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to  $\delta$  C-13 of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant Cell and Environment* **24**(5): 505-515.
- Gillon, S. J, Griffiths, H. 1997.** The influence of (photo)respiration on carbon isotope discrimination in plants. *Plant Cell and Environment* **20**(10): 1217-1230.
- Helle, G., Schleser, H. G. 2004.** Beyond CO<sub>2</sub>-fixation by Rubisco - an interpretation of C-13/C-12 variations in tree rings from novel intra-seasonal studies on broad-leaf trees. *Plant Cell and Environment* **27**(3): 367-380.
- Hemming, D., Yakir, D., Ambus, P., Aurela, M., Besson, C., Black, K., Buchmann, N., Burlett, R., Cescatti, A., Clement, R., Gross, P., Granier, A., Grunwald, T., Havrankova, K., Janous, D., Janssens, A. I, Knohl, A., Ostner, K. B, Kowalski, A., Laurila, T., Mata, C., Marcolla, B., Matteucci, G., Moncrieff, J., Moors, J. E, Osborne, B., Pereira, S. J, Pihlatie, M., Pilegaard, K., Ponti, F., Rosova, Z., Rossi, F., Scartazza, A., Vesala, T. 2005.** Pan-European  $\delta$  C-13 values of air and organic matter from forest ecosystems. *Global Change Biology* **11**(7): 1065-1093.
- Hemming D, Yakir D, Ambus P, Aurela M, Besson C, Black K, Buchmann N, Burlett R, Cescatti A, Clement R, Gross P, Granier A, Grunwald T, Havrankova K, Janous D, Janssens IA, Knohl A, Ostner BK, Kowalski A, Laurila T, Mata C, Marcolla B, Matteucci G, Moncrieff J, Moors EJ, Osborne B, Pereira JS, Pihlatie M, Pilegaard K, Ponti F, Rosova Z, Rossi F, Scartazza A, Vesala T 2005.** Pan-European  $\delta$  C-13 values of air and organic matter from forest ecosystems. In. 1065-1093.
- Hymus, J. G, Maseyk, K., Valentini, R., Yakir, D. 2005.** Large daily variation in C-13-enrichment of leaf-respired CO<sub>2</sub> in two *Quercus* forest canopies. *New Phytologist* **167**(2): 377-384.

- Keeling, D. C, Bacastow, B. R, Bainbridge, E. A, Ekdahl, A. C, Guenther, R. P, Waterman, S. L, Chin, S. JF. 1976.** Atmospheric Carbon-Dioxide Variations at Mauna-Loa Observatory, Hawaii. *Tellus* **28**(6): 538-551.
- Keeling, D. C, Mook, G. W, Tans, P. P. 1979.** Recent Trends in the C-13-C-12 Ratio of Atmospheric Carbon-Dioxide. *Nature* **277**(5692): 121-123.
- Klein, T., Hemming, D., Lin, B. T, Grunzweig, M. J, Maseyk, K., Rotenberg, E., Yakir, D. 2005.** Association between tree-ring and needle delta C-13 and leaf gas exchange in *Pinus halepensis* under semi-arid conditions. *Oecologia* **144**(1): 45-54.
- Klumpp, K., Schaufele, R., Lotscher, M., Lattanzi, A. F, Feneis, W., Schnyder, H. 2005.** C-isotope composition of CO<sub>2</sub> respired by shoots and roots: fractionation during dark respiration? *Plant Cell and Environment* **28**(2): 241-250.
- Kodama, Naomi, Barnard, Romain, Salmon, Yann, Weston, Christopher, Ferrio, Juan, Holst, Jutta, Werner, Roland, Saurer, Matthias, Rennenberg, Heinz, Buchmann, Nina, Gessler, Arthur. 2008.** Temporal dynamics of the carbon isotope composition in a *Pinus sylvestris* stand: from newly assimilated organic carbon to respired carbon dioxide. *Oecologia*.
- Kowalski S, Sartore M, Burlett R, Berbigier P, Loustau D. 2003.** The annual carbon budget of a French pine forest (*Pinus pinaster*) following harvest. *Global Change Biology* **9**(7): 1051-1065.
- Leavitt, S.W, Danzer, S.R. 1993a.** Method for batch processing small wood samples to holocellulose for stable-carbon isotope analysis. *Analytical Chemistry* **65**: 87-89.
- Leavitt, W. S, Danzer, R. S. 1993b.** Method for Batch Processing Small Wood Samples to Holocellulose for Stable-Carbon Isotope Analysis. *Analytical Chemistry* **65**(1): 87-89.
- Livingston, J. N, Whitehead, D., Kelliher, M. F, Wang, P. Y, Grace, C. J, Walcroft, S. A, Byers, N. J, McSeveny, M. T, Millard, P. 1998.** Nitrogen allocation and carbon isotope fractionation in relation to intercepted radiation and position in a young *Pinus radiata* D. Don tree. *Plant Cell and Environment* **21**(8): 795-803.
- Marino, D. B, McElroy, B. M. 1991.** Isotopic Composition of Atmospheric CO<sub>2</sub> Inferred from Carbon in C<sub>4</sub> Plant Cellulose. *Nature* **349**(6305): 127-131.
- Maunoury, F., Berveiller, D., Lelarge, C., Pontailier, Y. J, Vanbostal, L., Damesin, C. 2007.** Seasonal, daily and diurnal variations in the stable carbon isotope composition of carbon dioxide respired by tree trunks in a deciduous oak forest. *Oecologia* **151**(2): 268-279.
- McCarroll, D., Loader, J. N. 2004.** Stable isotopes in tree rings. *Quaternary Science Reviews* **23**(7-8): 771-801.
- Nguyen-Queyrens, A., Ferhi, A., Loustau, D., Guehl, M. J. 1998.** Within-ring delta C-13 spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* **28**(5): 766-773.
- O'Leary MH. 1981.** Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* **20**(4): 553-567.
- O'Leary MH. 1984.** Measurement of the isotope fractionation associated with diffusion of carbon dioxide in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry* **88**(4): 823-825.
- Ocheltree, W. T, Marshall, D. J. 2004.** Apparent respiratory discrimination is correlated with growth rate in the shoot apex of sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Experimental Botany* **55**(408): 2599-2605.
- Ogée, J., Barbour, M.M., Wingate, L., Bert, B., Bosc, A., Stievenard, M., C., Lambrot, M., Pierre, T., Bariac, D., Loustau, C. R, Dewar. 2009.** A single-substrate model to interpret intra-annual stable isotope signals in tree-ring cellulose. **32**(8): 1071-1090.

- Osmond, B. C, Chow, S. W. 1988.** Ecology of Photosynthesis in the Sun and Shade - Summary and Prognostications - Introduction. *Australian Journal of Plant Physiology* **15**(1-2): 1-9.
- Park, R., Epstein, S. 1961.** Metabolic Fractionation of C13 and C12 in Plants. *Plant Physiology* **36**(2): 133-&.
- Plomion, Christophe, Leprovost, Gregoire, Stokes, Alexia. 2001.** Wood Formation in Trees. **127**(4): 1513-1523.
- Ponton, S., Dupouey, L. J, Breda, N., Dreyer, E. 2002.** Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiology* **22**(6): 413-422.
- Porte, A., Loustau, D. 2001.** Seasonal and interannual variations in carbon isotope discrimination in a maritime pine (*Pinus pinaster*) stand assessed from the isotopic composition of cellulose in annual rings. In. 861-868.
- Prater, L. J, Mortazavi, B., Chanton, P. J. 2006.** Diurnal variation of the delta C-13 of pine needle respired CO<sub>2</sub> evolved in darkness. *Plant Cell and Environment* **29**(2): 202-211.
- Rossmann, Andreas, Butzenlechner, Maria, Schmidt, Hanns-Ludwig. 1991.** Evidence for a Nonstatistical Carbon Isotope Distribution in Natural Glucose. **96**(2): 609-614.
- Saugier, B., Roy, J., Mooney, H.A. 2001.** Estimations of global terrestrial productivity : converging toward a single number? In: Press A ed. *Terrestrial Global Productivity*, 543-557.
- Saurer, M., Aellen, K., Siegwolf, R. 1997.** Correlating delta C-13 and delta O-18 in cellulose of trees. *Plant Cell and Environment* **20**(12): 1543-1550.
- Saurer, M., Siegenthaler, U., Schweingruber, F. 1995.** The Climate-Carbon Isotope Relationship in Tree-Rings and the Significance of Site Conditions. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* **47**(3): 320-330.
- Sharp Z. 2007.** *Principles of Stable Isotope Geochemistry*. New Jersey.
- Skomarkova, V. M, Vaganov, A. E, Mund, M., Knohl, A., Linke, P., Boerner, A., Schulze, D. E. 2006.** Inter-annual and seasonal variability of radial growth, wood density and carbon isotope ratios in tree rings of beech (*Fagus sylvatica*) growing in Germany and Italy. *Trees-Structure and Function* **20**(5): 571-586.
- Tans, P. P. 1991.** Uncertainties in the Global Carbon-Cycle. *Pure and Applied Chemistry* **63**(5): 766-768.
- Tcherkez, G., Nogues, S., Bleton, J., Cornic, G., Badeck, F., Ghashghaie, J. 2003.** Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO<sub>2</sub> in French bean. *Plant Physiology* **131**(1): 237-244.
- Treydte, S. K, Schleser, H. G, Helle, G., Frank, C. D, Winiger, M., Haug, H. G, Esper, J. 2006.** The twentieth century was the wettest period in northern Pakistan over the past millennium. *Nature* **440**(7088): 1179-1182.
- Wilson, T. A, Grinsted, J. M. 1977.** <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C in cellulose and lignin as palaeothermometers. *Nature* **265**(5590): 133-135.
- Wingate, L., Seibt, U., Moncrieff, B. J, Jarvis, G. P, Lloyd, J. 2007.** Variations in <sup>13</sup>C discrimination during CO<sub>2</sub> exchange by *Picea sitchensis* branches in the field. *Plant, Cell and Environment* **30**(5): 600-616.
- Xu, Y. C, Lin, H. G, Griffin, L. K, Sambrotto, N. R. 2004.** Leaf respiratory CO<sub>2</sub> is C-13-enriched relative to leaf organic components in five species of C-3 plants. *New Phytologist* **163**(3): 499-505.



# Annexes



## *Table des annexes*

### *Annexe 1*

Article en co-auteur : Wingate et al., *New Phytologist* (2010) ..... 161

### *Annexe 2*

Posters ..... 177





## Article en co-auteur

Wingate et al., *New Phytologist* (2010)

Research

New  
Phytologist 

### Photosynthetic carbon isotope discrimination and its relationship to the carbon isotope signals of stem, soil and ecosystem respiration

---

Lisa Wingate<sup>1,2,4</sup>, Jérôme Ogée<sup>2</sup>, Régis Burllett<sup>2</sup>, Alexandre Bosc<sup>2</sup>, Marion Devaux<sup>2</sup>, John Grace<sup>1</sup>, Denis Loustau<sup>2</sup> and Arthur Gessler<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of GeoSciences, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JN, UK; <sup>2</sup>INRA, UR1263 Ephyse, F-33130 Villenave d'Ornon, France; <sup>3</sup>Institut für Landschaftsstoffdynamik, Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research (ZALF), Eberswalder Straße 84, D-15374, Müncheberg, Germany; <sup>4</sup>Present address: The Department of Plant Sciences, University of Cambridge, CB2 3EA, Cambridge, UK



# Photosynthetic carbon isotope discrimination and its relationship to the carbon isotope signals of stem, soil and ecosystem respiration

Lisa Wingate<sup>1,2,4</sup>, Jérôme Ogée<sup>2</sup>, Régis Burette<sup>2</sup>, Alexandre Bosc<sup>2</sup>, Marion Devaux<sup>2</sup>, John Grace<sup>1</sup>, Denis Loustau<sup>2</sup> and Arthur Gessler<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of GeoSciences, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3JN, UK; <sup>2</sup>INRA, UR1263 Ephyse, F-33130 Villenave d'Ornon, France; <sup>3</sup>Institut für Landschaftsstoffdynamik, Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research (ZALF), Eberswalder Straße 84, D-15374, Müncheberg, Germany; <sup>4</sup>Present address: The Department of Plant Sciences, University of Cambridge, CB2 3EA, Cambridge, UK

## Summary

Author for correspondence:

Lisa Wingate

Tel: +44 (0)1223 330212

Email: l.wingate@ed.ac.uk

Received: 23 February 2010

Accepted: 1 June 2010

*New Phytologist* (2010) **188**: 576–589

doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03384.x

**Key words:** <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, autotrophic respiration, carbon isotopes, forests, maritime pine, photosynthesis, plant allocation, tuneable diode laser.

- Photosynthetic carbon (C) isotope discrimination ( $\Delta_A$ ) labels photosynthates ( $\delta_A$ ) and atmospheric CO<sub>2</sub> ( $\delta_a$ ) with variable C isotope compositions during fluctuating environmental conditions. In this context, the C isotope composition of respired CO<sub>2</sub> within ecosystems is often hypothesized to vary temporally with  $\Delta_A$ .
- We investigated the relationship between  $\Delta_A$  and the C isotope signals from stem ( $\delta_w$ ), soil ( $\delta_s$ ) and ecosystem ( $\delta_E$ ) respired CO<sub>2</sub> to environmental fluctuations, using novel tuneable diode laser absorption spectrometer instrumentation in a mature maritime pine forest.
- Broad seasonal changes in  $\Delta_A$  were reflected in  $\delta_w$ ,  $\delta_s$  and  $\delta_E$ . However, respired CO<sub>2</sub> signals had smaller short-term variations than  $\Delta_A$  and were offset and delayed by 2–10 d, indicating fractionation and isotopic mixing in a large C pool. Variations in  $\delta_s$  did not follow  $\Delta_A$  at all times, especially during rainy periods and when there is a strong demand for C allocation above ground.
- It is likely that future isotope-enabled vegetation models will need to develop transfer functions that can account for these phenomena in order to interpret and predict the isotopic impact of biosphere gas exchange on the C isotope composition of atmospheric CO<sub>2</sub>.

## Introduction

Measurements of discrimination against <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> during photosynthesis ( $\Delta_A$ ) are useful for assessing the impact of environmental variability on plant metabolism and water relations over daily, seasonal and inter-annual time-frames (Farquhar *et al.*, 1989; Lloyd & Farquhar, 1994). They are also necessary for constraining the influence of terrestrial ecosystems on the atmospheric mass balance of <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (Ciais *et al.*, 1995; Francey *et al.*, 1995; Battle *et al.*, 2000; Randerson *et al.*, 2002). Yet, direct measurements of  $\Delta_A$  in the field remain sparse (Wingate *et al.*, 2007; Bowling *et al.*, 2008). Instead, a number of different approaches are often employed to estimate plant and ecosystem-scale  $\Delta_A$ . The most common approach is to either measure or predict

the ratio of CO<sub>2</sub> partial pressure in the stomatal cavity relative to that in ambient air ( $C_i/C_a$ ) and relate this linearly to variations in  $\Delta_A$  (Farquhar *et al.*, 1982). Alternatively the carbon (C) isotope composition of plant and soil bulk organic matter or CO<sub>2</sub> in air within and above plant canopies are also considered suitable proxies (Keeling, 1961; Kaplan *et al.*, 2002; Baldocchi & Bowling, 2003; Lai *et al.*, 2005; Aranibar *et al.*, 2006). However, these approaches tend to integrate the isotopic signals of post photosynthetic fractionations caused by the construction of biomass or respiratory metabolism and can obscure the relationship between  $\Delta_A$  and environmental fluctuations (Bowling *et al.*, 2008).

Despite these caveats a number of studies have found correlations between the C isotope composition of

ecosystem-respired CO<sub>2</sub> ( $\delta_E$ ), soil-respired CO<sub>2</sub> ( $\delta_S$ ) and environmental drivers such as relative humidity, temperature, precipitation and soil moisture over daily and monthly time-frames (e.g. (Ekblad & Högberg, 2001; Bowling *et al.*, 2002; Barbour *et al.*, 2005; Ekblad *et al.*, 2005; Knohl *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2005)). These correlations are hypothesized to result from short- to medium-term variations in  $\Delta_A$  that give rise to detectable variations in the isotopic composition of the metabolic substrates used to fuel respiration (Cernusak *et al.*, 2002; Gessler *et al.*, 2007, 2008). Because it is more practical to measure  $\delta_E$  than  $\Delta_A$  for long periods in the field, it would be useful to validate this hypothesized link between  $\Delta_A$  and  $\delta_E$  and develop robust <sup>13</sup>C transfer functions of ground-based isoflux (defined as the product of a gross CO<sub>2</sub> flux ( $F_x$ ) and its isotopic composition ( $\delta_x$ ):  $I_x = F_x \delta_x$ ) measurements to the larger-scale measurement and modelling efforts of the atmospheric community.

In addition, it has also been postulated that these temporal correlations between  $\delta_E$ ,  $\delta_S$  and environmental fluctuations can be used to gauge the 'speed of link' between photosynthetic activity and the transport of C belowground in large trees (Ekblad & Högberg, 2001). Based on monthly measurements over the growing season, Ekblad & Högberg (2001) first demonstrated a 2–4 d lag between atmospheric humidity and the  $\delta^{13}\text{C}$  of the soil CO<sub>2</sub> flux in chambers for a mature Scots pine forest of 20–25 m height growing in Northern Sweden. Similar results from soil and ecosystem scale measurements using natural abundance concentrations of <sup>13</sup>C have since been found for many coniferous and deciduous forests (Bowling *et al.*, 2002; Bhupinderpal-Singh *et al.*, 2003; Steinmann *et al.*, 2004; Barbour *et al.*, 2005; Ekblad *et al.*, 2005; Knohl *et al.*, 2005; Mortazavi *et al.*, 2005; Schaeffer *et al.*, 2008; Marron *et al.*, 2009). More recently, <sup>13</sup>C pulse labelling studies have confirmed similar findings (Högberg *et al.*, 2008; Bahn *et al.*, 2009; Plain *et al.*, 2009; Ruehr *et al.*, 2009; Subke *et al.*, 2009). However, there are some field studies that have found no significant correlation between  $\delta_S$ ,  $\delta_E$  and environmental variables (Bowling *et al.*, 2002; Mortazavi & Chanton, 2002; McDowell *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2008) indicating an apparent decoupling of the belowground link to recently fixed photosynthates. A clearer explanation of why these biological patterns are occasionally obscured at the soil and ecosystem scale should be sought as they may provide important insights on plant C allocation dynamics below ground in response to environmental stress and phenology.

The purpose of this study was to test directly and for the first time the hypothesis that variations in the C isotope signals of stem, soil and ecosystem respired CO<sub>2</sub> are caused by fluctuations in photosynthetic <sup>13</sup>C discrimination observed in the field. This hypothesis was explored by examining the extent of coupling between aboveground and belowground C

transfer in tall trees using correlation analysis applied to the natural variations in C isotope signals of CO<sub>2</sub> released by each component of the ecosystem. This was achieved using (1) a novel tuneable diode laser absorption spectrometer (TDLAS), that continuously measured the concentrations of the different CO<sub>2</sub> isotopologues inside branch, stem and soil chambers in addition to the surrounding canopy atmosphere of a maritime pine forest located in France and (2) an isotope-enabled canopy model that allowed us to compare branch chamber measurements with theory and upscale them to the entire canopy. Using this approach we could also explore whether C transfer times between aboveground and belowground organs in tall trees remained static or fluctuated over the growing season in response to environmental conditions or plant allocation patterns, in order to provide an explanation of why some studies observe a strong link between environmental conditions and  $\delta_E$ , while others do not. Finally this dataset allowed us to test whether isotopic differences between specific component fluxes and corresponding C pools were consistent with post-photosynthetic fractionation theories currently proposed to explain the natural isotopic patterns found in ecosystems, and explore how they affect the C isotope composition of atmospheric CO<sub>2</sub>.

## Materials and Methods

### Site description

The study took place at the Bray experimental site, located at *c.* 20 km from Bordeaux, France (44°42' N, 0°46' W, altitude 62 m), in a nearly homogeneous maritime pine stand (*Pinus pinaster* Ait.) planted in 1970. Mean tree height was 20 m and the leaf area index, confined in the top 6 m, was *c.* 3 m<sup>2</sup> m<sup>-2</sup>. The understorey mainly consists of grass (*Molinia coerulea* L.) whose roots and clumps remain throughout the year but whose leaves are green only from April to late November, with maximum leaf area index and height of 1.4–2.0 m<sup>2</sup> m<sup>-2</sup> and 0.6–0.8 m, respectively. A 5 cm-thick litter layer composed of compacted grass, dead needles and woody debris remains present all year long. This site has formed part of the CarboEurope and Fluxnet networks since 1996 (Berbigier *et al.*, 2001) and was previously investigated for the C isotope composition of CO<sub>2</sub> during a short study in 1997 (Ogée *et al.*, 2003b, 2004).

### Eddy covariance and sapflux measurements

The experimental set-up that provided the meteorological and net ecosystem CO<sub>2</sub> exchange (NEE) measurements used in this study was installed following the requirements of the European project CarboEurope (Berbigier *et al.*, 2001).

A cluster of nine trees were also equipped with sap flow sensors just beneath the live crown, as described in Granier

& Loustau (1994). Raw sap flow data was corrected for stem diameter according to Delzon *et al.* (2004).

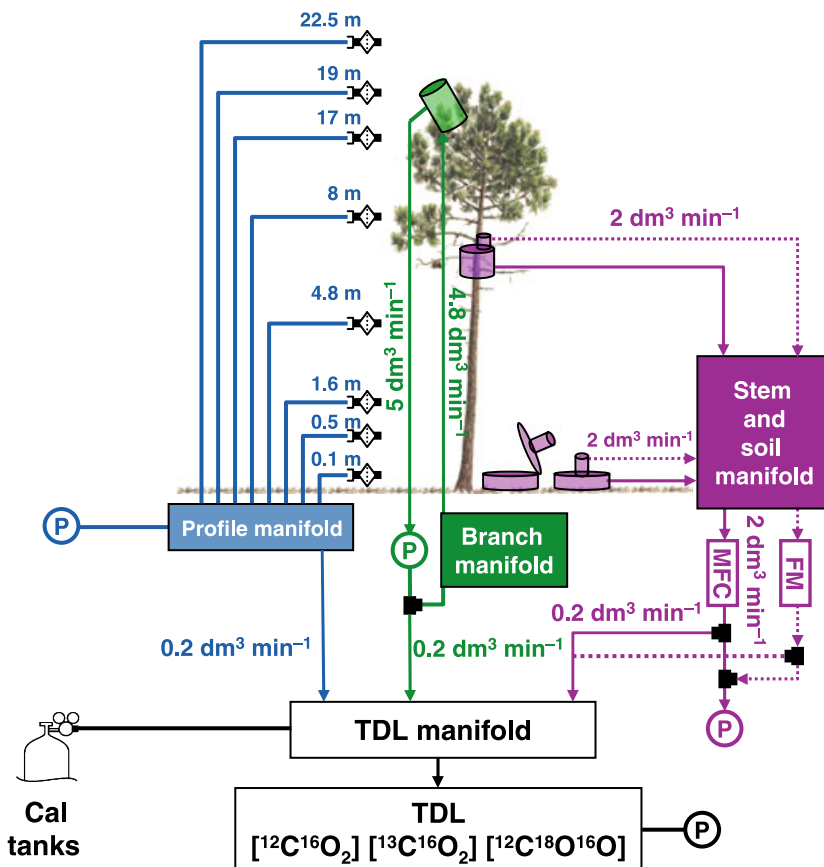
### TDLAS sampling system

In this study,  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  and  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$  concentrations were measured *in situ* using a TDLAS (TGA100A; Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA) housed in an unheated shed at the Bray site. These concentrations were converted to delta notations (and noted  $\delta^{13}\text{C}$ ) and are expressed on the VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) scale. The specifications of this analyser for the study of both C and oxygen isotope ratios is described in detail elsewhere (Griffis *et al.*, 2008; Wingate *et al.*, 2010). Further details on the instrument specifications and calibration are provided in the Supporting Information, Methods S1.

A multi-inlet sampling system was designed to automatically select and measure the gas exchange and environmental conditions for one of three different components, including a vertical atmospheric profile below, within and above the canopy (0.1 m, 0.5 m, 1.6 m, 4.8 m, 8 m, 17 m, 19 m, 22.5 m), three open soil chambers or an open stem chamber and a closed branch chamber (Fig. 1). A detailed description of each component is given in Methods S1.

### Sampling sequence

Each component as well as calibration tanks were scanned at 1 Hz over a 30-min sampling sequence (Fig. S1). During the experiment this sampling sequence changed slightly depending on how many components were being measured. In brief, at the beginning of every 30-min cycle, each calibration tank was scanned for 60 s (only 30 s at the beginning of the experiment, see Table S1 and Fig S2). The precision of the instrument at reproducing calibration tank values was between 0.3‰ and 0.6‰ for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  (Table S2). The soil chamber manifold was then selected and, over 8 min, the inlet and outlet airstreams of either the stem or of one of the three soil chambers were scanned four times alternatively for a 1-min period. A second scan of the calibration tanks was then repeated as described earlier. The closed dynamic branch chamber was then selected for 5 min. For the initial 150 s the branch chamber was kept open and ventilated to establish the initial concentration. This was followed by a final scan of the calibration tanks, before scanning each inlet of the ecosystem profile for 60 s each. Each soil chamber was revisited and scanned every 2.5 h. An example of our sampling sequence can be seen in Methods S1, Fig. S1 alongside details of our calibration, data averaging and filtering procedure (see Figs S2–S4).



**Fig. 1** Experimental set-up used to measure the isotope signals of  $\text{CO}_2$  exchanged between forest ecosystem components and the atmosphere that included the routine measurement of one branch, one stem and three soil chambers. MFC, mass flow controller; FM, flow meter; P, pump.

Carbon isotope composition of the net CO<sub>2</sub> flux from branch, soil and stem chambers

Branch CO<sub>2</sub> flux ( $F_A$ ) was calculated from the rate of change in total CO<sub>2</sub> mixing ratio observed in a branch chamber between 0 and 60 s after closure (Wingate *et al.*, 2010). Net branch isotope discrimination  $\Delta_A$  was calculated over the same 60-s period according to (McNevin *et al.*, 2006):

$$\Delta_A = \frac{d(\log_e[^{12}\text{CO}_2])}{d(\log_e[^{13}\text{CO}_2])} - 1 \quad \text{Eqn 1}$$

A linear regression between  $\log_e[^{12}\text{CO}_2]$  and  $\log_e[^{13}\text{CO}_2]$  was performed and when the correlation coefficient was < 0.98 the data were discarded from further analysis. The C isotope signal of the net branch CO<sub>2</sub> flux was then calculated from the data as  $\delta_A = (\delta_a - \Delta_A)/(1 + \Delta_A)$ , where  $\delta_a$  is the C isotope composition of atmospheric CO<sub>2</sub> surrounding the foliage inside the chamber while ventilated.

For each stem or soil chamber, the steady-state net CO<sub>2</sub> flux  $F_W$  and  $F_S$ , respectively, and its C isotope signal ( $\delta_w$  and  $\delta_s$ , respectively) was calculated using a simple isotopic mass balance (Wingate *et al.*, 2008; Maseyk *et al.*, 2009). For example, for soil chambers,  $F_S = u(C_o - C_e)/S$  and:

$$\delta_s = \frac{\delta_o C_o - \delta_e C_e}{C_o - C_e} \quad \text{Eqn 2}$$

( $u$  is the flow rate of air through the chamber (2 dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> for the soil and 2 dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> until day 268 and 1 dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> thereafter for the stem);  $S$  is the surface area of the chamber (0.07 m<sup>2</sup> for the soil and 0.09 m<sup>2</sup> for the stem);  $C_o$ ,  $C_e$  and  $\delta_o$ ,  $\delta_e$  are the mole fractions and C isotopic compositions of CO<sub>2</sub> in the air leaving and entering the chamber, respectively). For each measurement, four replicates were performed (see Fig. S1) and used to calculate a standard deviation for  $F_S$  and  $\delta_s$ .

## Carbon isotope composition of ecosystem respiration from canopy profiles

For each night, the C isotope composition of ecosystem respired CO<sub>2</sub> ( $\delta_E$ ) was determined from the 'instant' slope of the regression between the product  $C_a\delta_a$  and  $C_a$  (Bakwin *et al.*, 1998; Miller & Tans, 2003; Ogee *et al.*, 2003b) using measurements from 01:00 h until dawn. All air profile levels were included as well as soil chamber inlets in order to increase the number of measurements close to the ground, and an orthogonal distance regression was used to account for errors both on  $\delta_a$  and  $C_a$  (taken as the standard deviation of the mean for each measurement). Regression analysis was restricted to those nights where the CO<sub>2</sub> concentration range exceeded 60  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  (Zobitz *et al.*, 2006).

## Carbon isotope composition of ecosystem C pools

Needle samples were collected monthly from three locations in the upper canopy, pooled in glass containers and frozen in the field. In the laboratory, samples were then freeze-dried, ground and weighed into tin cups for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of bulk organic matter (BOM). Isotope ratio mass spectrometer (IRMS) analysis was completed on a Delta V mass spectrometer coupled online to a FlashEA elemental analyser (both Thermo Scientific, Bremen, Germany) at the Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research (ZALF). Precision was 0.1‰. This ground material was also used to obtain the  $\delta^{13}\text{C}$  composition of the water-soluble organic matter (WSOM) fraction of needles following the method described by Brandes *et al.* (2006).

The  $\delta^{13}\text{C}$  composition of phloem WSOM was also analysed on phloem discs sampled monthly at breast height. From this analysis we obtained information on the  $\delta^{13}\text{C}$  composition of total extracts as well as those of glucose and sucrose. Full details of these analyses are provided in Devaux *et al.* (2009).

In addition, two tree cores were taken at breast height at the end of the experiment to obtain the cellulose deposited in the 2007 tree ring. This core was sliced using a microtome, lignin was extracted from the whole wood and the cellulose was purified and analysed for its  $\delta^{13}\text{C}$  composition following the procedure described in Ogee *et al.* (2009).

Finally, litter and soil samples were collected on two occasions during April and August 2007 at six different locations nearby the soil chambers for each date. The soil samples were collected at six depths for each location (0–5, 5–10, 10–15, 15–20, 20–25 and 25–30 cm depth). The samples were dried, ground and weighed into tin cups for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis using an elemental analyser (CE Instruments NA2500 Elemental Analyser, CE Instruments, Wigan, UK) connected to a dual inlet IRMS (VG Prism, Micromass, Manchester, UK) at the School of GeoSciences in The University of Edinburgh, UK. Precision was 0.1‰.

## Representativeness of chamber-based estimates

Because of restricted canopy access, we were unable to install more than one branch chamber in the canopy. For a number of reasons we decided to place this branch chamber on an entire 1-yr-old shoot near the top of the canopy. For this forest, 1-yr-old shoots have been found to contribute the largest photosynthetic surface area to the total foliage surface area (*c.* 48%, see Porté *et al.* (2000)) and exhibit the largest CO<sub>2</sub> assimilation rates (Porté & Loustau, 1998). Furthermore, because these shoots are also located on the outer edges of the crown they are relatively unshaded compared with the older shoots.

Because of these sampling limitations we calculated  $\Delta_A$  (see Methods S1 for further details) using the isotope-

enabled multilayer canopy model MuSICA (Ogée *et al.*, 2003a,b, 2004) to verify whether the temporal patterns and absolute values of observed  $\Delta_A$  were similar to those predicted by theory. This was completed for both 1-yr-old sun shoots and the whole canopy in order to compare with branch chamber observations and verify the representativeness of 1-yr-old shoot measurements. This model has been validated against several gas-exchange and isotope datasets in this forest (Ogée *et al.*, 2003a,b, 2004) and is therefore a highly suitable tool for this analysis.

Stem chamber measurements during 2007 were also limited to one tree and height beneath the canopy. However, in 2008 we also performed similar stem chamber measurements at two heights and on three different trees and found very consistent isotopic signals and flux rates between all the chambers (M. Devaux *et al.*, unpublished data).

Lastly, three soil chambers were used throughout the entire study period to estimate the average soil CO<sub>2</sub> efflux rate and corresponding C isotope composition. In the following, standard deviations on soil chamber data represent the spatial variability between these three soil chambers.

## Results

### Seasonal patterns in component CO<sub>2</sub> fluxes

The meteorological conditions experienced by our maritime pine forest during the 2007 growing season are shown in Fig. 2. This growing season was characterized by mild temperatures that rarely fell below 0°C and relatively humid conditions, with moderately high vapour pressure deficits (VPD) occurring in April and occasionally during July to September. Rainfall was almost evenly distributed throughout the year, although the end of the growing season (September–November) received comparatively less rain, leading to a moderate soil water deficit. These weather conditions could have been ideal for C uptake by the vegetation, had incoming radiation not been limiting, especially in May and August. Indeed the forest was a net sink for C between the months of March and October (Fig. 3), but a couple of synoptic events did cause the ecosystem to lose C to the atmosphere. The most striking period occurred at the end of August when a weather system releasing a substantial amount of rain passed through, reduced incoming radiation and recharged soil water slightly (shaded panel in Fig. 3). Inspection of the chamber flux data indicates that an increase in soil respiratory losses primarily led to this ecosystem becoming a source of CO<sub>2</sub> to the atmosphere (Fig. 3). The observed net ecosystem exchange (NEE) of CO<sub>2</sub> did not, however, display exactly the same shape as the soil flux data but rather consisted of a ‘double hump’. This particular pattern seems to have resulted from dynamic variations in the day-to-day rates of photosynthesis by the canopy. This is most clearly illustrated by the modelled photosynthetic rate

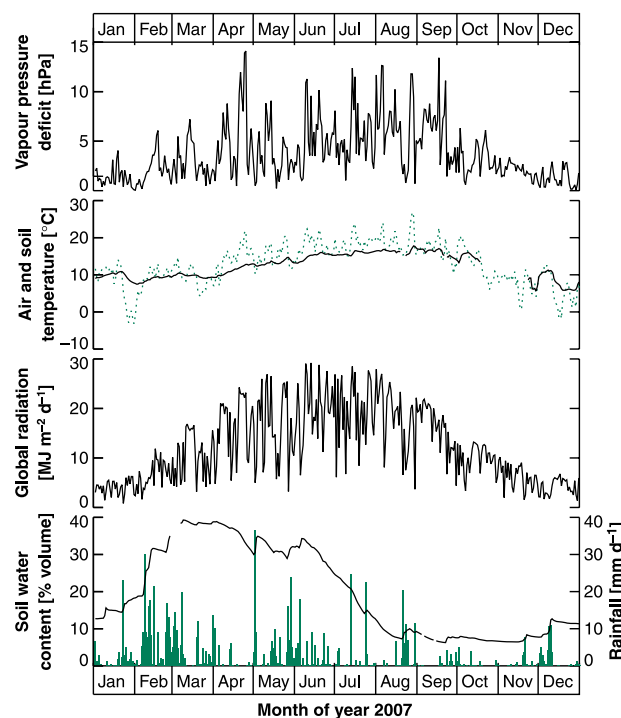


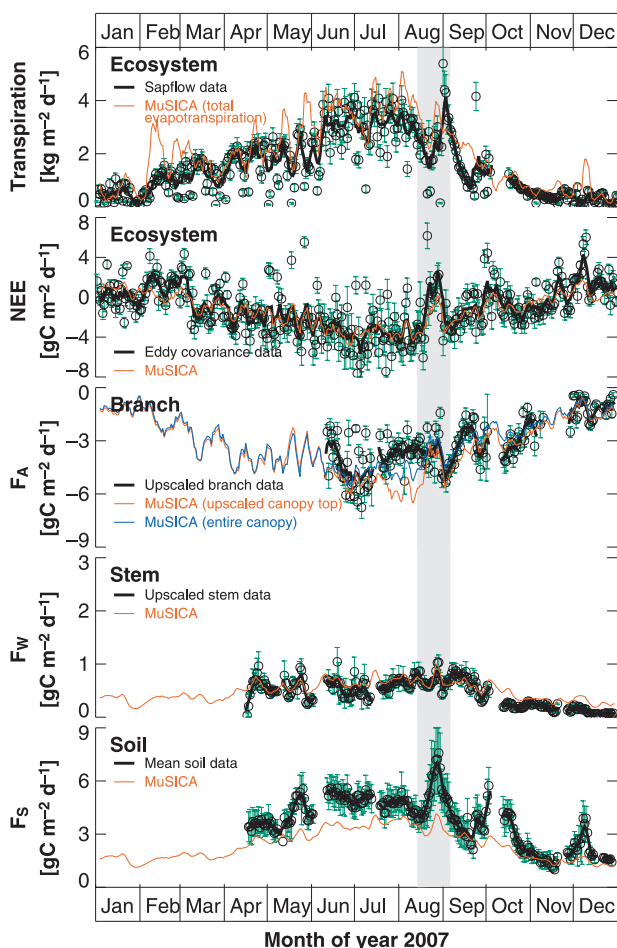
Fig. 2 Seasonal variations in mean daily vapour pressure deficit, air temperature (dotted line), soil temperature (solid line), global radiation, soil water content and rainfall (solid bars) during the 2007 growing season.

that shows a strong reduction before the increase in the soil CO<sub>2</sub> efflux. However, this temporary reduction in  $F_A$  is not apparent in the observed 5-d running mean shown in Fig. 3 because low rates of photosynthesis, not predicted by our model, were already observed before the rainy period. This unsettled weather was sharply replaced by more persistent warm, clear and dry conditions that led to a recovery of the C sink status with increased levels of photosynthetic activity displayed by the data and the model. Immediately after the rainy period (end of the shaded area in Fig. 3) both CO<sub>2</sub> assimilation and transpiration rapidly dropped to rates lower than those observed before the rainy period, indicating that our branch and forest may have been experiencing a certain degree of water stress. A similar situation seems likely to have occurred again at the beginning of October although system failures restrict any detailed analysis of the interactions between photosynthesis and respiration during this other period.

### Diurnal and seasonal patterns in branch photosynthetic discrimination

Diurnal and seasonal patterns of branch <sup>13</sup>C discrimination ( $\Delta_A$ ) measured over the 2007 growing season are presented in Fig. 4. Over this period the majority of daytime  $\Delta_A$  values ranged between 10‰ and 35‰. The highest values of  $\Delta_A$  typically occurred at dusk throughout the growing





**Fig. 3** Seasonal variations in the observed mean daily (circles) or 5-d running mean (thick solid black lines) of sap flux-derived transpiration rates, modelled ecosystem evapotranspiration rates (thin red line) (includes canopy, soil and understorey contributions) and net CO<sub>2</sub> exchange measured and modelled (thin red line) at the ecosystem (NEE), branch (F<sub>A</sub>), stem (F<sub>w</sub>) and soil (F<sub>s</sub>) scale during 2007. Branch fluxes are shown for daytime conditions only and are expressed on a ground area basis using the total canopy leaf area predicted by the model. Modelled branch fluxes are for either the entire canopy (thin blue line) or a canopy of 1-yr-old shoots only (thin red line).

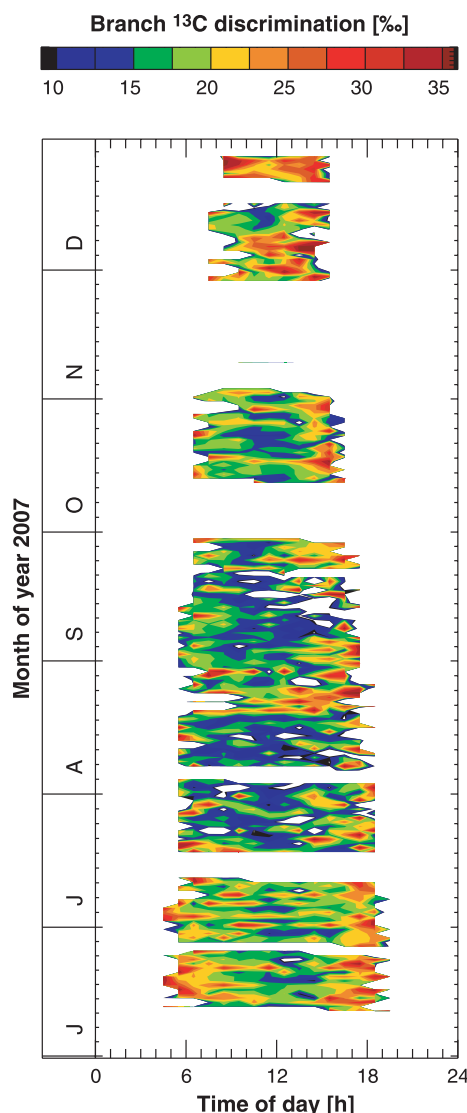
season, but also in the early mornings of June and July and throughout the day during the winter months. This generally led to an asymmetric daily pattern in  $\Delta_A$  with highest values occurring when CO<sub>2</sub> uptake was low, indicating a relatively high proportion of CO<sub>2</sub> molecules being respired that could contain a slightly different isotopic composition to that of current assimilates (Wingate *et al.*, 2007).

During June and the start of July when weather conditions were still relatively wet and cloudy, midday  $\Delta_A$  values tended to be high (> 15‰) with lower values observed only occasionally. By contrast, the end of July and the months of August and September gave rise to much lower midday  $\Delta_A$  values (often < 15‰), when soil moisture contents were relatively lower than those observed earlier in the season.

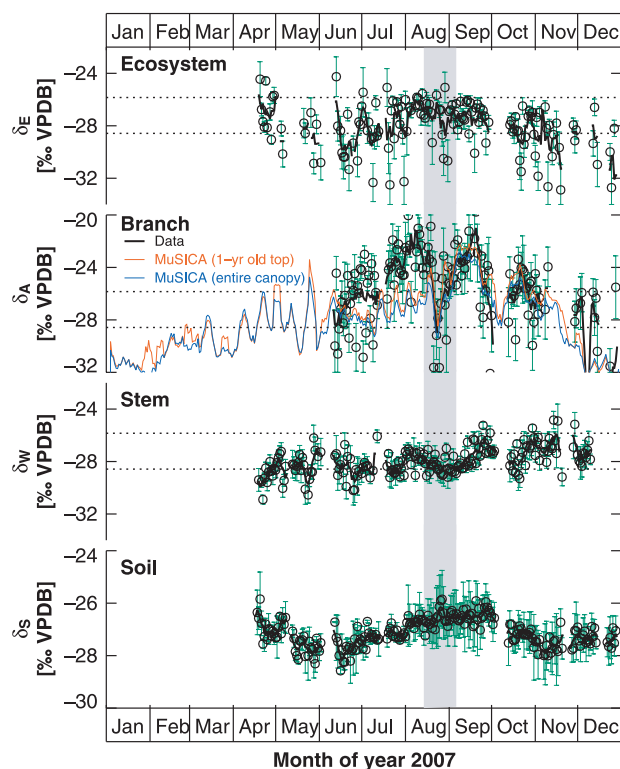
(Figs 2 and 4). Rain events during this study often caused values of  $\Delta_A$  to increase above 20‰ and are often identified as conspicuous orange and red regions, for example, during the rainy periods of August and December.

### Seasonal patterns in the $\delta^{13}\text{C}$ of component CO<sub>2</sub> fluxes

During the summer months (July–September), the  $\delta^{13}\text{C}$  signal of both stem and soil respired CO<sub>2</sub> were generally more depleted than the observed flux-weighted daytime photosynthetic signal  $\delta_A = (\delta_a - \Delta_A)/(1 + \Delta_A)$  (Figs 5 and 6). Outside this period, they both remained in the same range of values as observed  $\delta_A$ . However, model simulations for both 1-yr-old shoots and the entire canopy predicted that  $\delta_A$  during June and July could have been somewhat



**Fig. 4** Diurnal and seasonal variations in branch <sup>13</sup>C discrimination ( $\Delta_A$ ) measured during 2007 in the maritime pine forest studied.



**Fig. 5** Seasonal variations in the flux-weighted daily carbon isotope signals (circles) of ecosystem respiration, branch photosynthesis, stem respiration and soil respiration alongside their 5-d running mean value (thick solid black line) during 2007 in a maritime pine forest. Branch observations are plotted alongside model predictions for 1-yr-old shoots at the top of the canopy (thin red line) and for the entire canopy (thin blue line). Note that branch data are for daytime conditions only, ecosystem signals were determined from night-time profiles between 01:00 h and dawn and soil and stem signals represent daily signals. Dotted lines in the top three panels indicate the range of  $\delta_S$  values observed over the measurement period.

more depleted than the observed values and somewhat closer to those signals observed by the stem and soil chambers. It remains unclear why the branch chamber results are different from those modelled during June and July while both give similar results outside this period. The tree installed with both the branch and stem chamber exhibited similar sap flow rates and responses to environmental fluctuations to those observed for other trees in the same stand, indicating that at least the tree containing the chambers was not particularly unusual from any other nearby. In the following text, we therefore use the modelled and observed photosynthetic signals as potential upper and lower estimates of  $\delta_A$  during this particular period.

Over the entire measurement period, we found that  $\delta_W$  and  $\delta_S$  varied by *c.* 4‰ and 3‰, respectively, and that the soil signal tended to be slightly more enriched than the stem, especially in April and August (Fig. 5). Over the season,  $\delta_S$  exhibited a progressive enrichment between June and September of *c.* 3‰, and then became rapidly

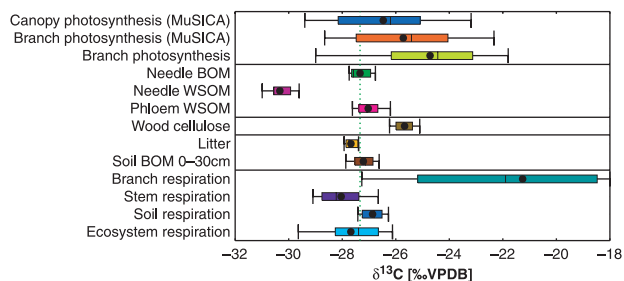
depleted, reaching a minimum in November. This is generally consistent with the low-frequency  $\Delta_A$  and  $\delta_A$  variations measured and predicted for the branch over the same time-frame (Figs 4 and 5). However, the enriched values in  $\delta_S$  before branch chamber observations during April and May do not seem to be linked to the low-frequency variations in  $\delta_A$  predicted by MuSICA (Fig. 5).

We also found that  $\delta_W$ , more than  $\delta_S$ , often displayed shorter-term (synoptic) variations that appeared attenuated but coupled to the variations in  $\delta_A$ . This is most obvious over the period before, during and after the rains in August. Before the rain events, relatively high VPDs coincided with enriched estimates of  $\delta_A$  at *c.* -22‰ VPDB. Thereafter, a gradual decrease in VPD, followed by a period of wet and overcast conditions caused observed and modelled  $\delta_A$  signals to drop dramatically by *c.* 7‰ and 4–5‰, respectively. When warmer and drier conditions returned after the rain events, observed and modelled  $\delta_A$  signals returned to values of *c.* -21‰ VPDB. During these variations of VPD the stem isotopic signal also followed a similar pattern to  $\delta_A$  but with a much smaller amplitude of only 2‰, and a minimum value of *c.* -29‰ VPDB. By contrast,  $\delta_S$  appeared to be decoupled from the short-term canopy dynamics of this synoptic event (Fig. 5). Indeed, during the first days of the rainy period, while all other components of the ecosystem were becoming depleted, the soil flux signal became relatively more enriched, coinciding with the maximum soil  $\text{CO}_2$  efflux rates (Fig. 3). At other times, however, both  $\delta_W$  and  $\delta_S$  seemed to follow synoptic variations in  $\delta_A$ . For example, during the rainy period at the end of September,  $\delta_A$ ,  $\delta_W$  and  $\delta_S$  systematically shifted in the same direction to more depleted values (Fig. 5).

At the ecosystem scale, the  $\delta^{13}\text{C}$  of respired  $\text{CO}_2$  ( $\delta_E$ ) measured during the night was similar in absolute value and range to the soil and stem signals measured between the months of July to October (Fig. 5). The overall seasonal pattern of the ecosystem signal was generally similar to that of the soil, displaying a gradual enrichment over the summer months and becoming more depleted from October onwards. However, the frequency of  $\delta_E$  isotopic shifts was relatively higher than those observed for  $\delta_W$  and  $\delta_S$  and tended to be greater, between 3‰ and 4‰.

#### Comparison of $\delta^{13}\text{C}$ component $\text{CO}_2$ fluxes with plant and ecosystem C pools

The range of  $\delta^{13}\text{C}$  variations for these different  $\text{CO}_2$  flux signals over the 'summer' months (from 21 June to 21 October) were also compared with the C isotope composition of a variety of plant and ecosystem C pools measured for the same period (Fig. 6). The observed summer  $\delta^{13}\text{C}$  signal of branch photosynthesis was, on average, -24.7‰ VPDB, while model estimates for this signal were somewhat more depleted (at -25.7‰ and -26.5‰ VPDB for 1-yr-



**Fig. 6** Synthesis showing the  $\delta^{13}\text{C}$  composition of the various pools and  $\text{CO}_2$  fluxes measured and modelled in the maritime pine site during the 2007 measurement period (from 21 June to 21 October). Circle represents the mean, the box represents the median and 25% upper/lower quartiles and the tails represent the 10% and 90% limits of the data.

old shoots at the top of the canopy and the entire canopy, respectively), because of the model-data disagreement in July and early August already noted in Fig. 4. This mean observed branch value was more enriched than any other flux or C pool in the ecosystem with the exception of the nocturnal branch respiration flux that was, on average, at  $-21.3\text{‰ VPDB}$ . This was not the case for the modelled canopy-integrated photosynthetic signal that was, on average, slightly more depleted than wood cellulose (at  $-25.7\text{‰ VPDB}$ ) and very close to the soil flux signal ( $-26.9\text{‰ VPDB}$ ). Although the observed  $\delta^{13}\text{C}$  of branch photosynthesis was, on average, more enriched than the other components measured during the same period, its variability over the season was large and encompassed the range of  $\delta^{13}\text{C}$  values for all metabolites and C pools, with the exception of the WSOM fraction extracted from needles that was very depleted at  $-30.3\text{‰ VPDB}$ . The  $\delta^{13}\text{C}$  of the stem phloem WSOM fraction was, on average,  $-27.0\text{‰ VPDB}$  and fell between the values for the  $\delta^{13}\text{C}$  of stem  $\text{CO}_2$  flux ( $-28.0\text{‰ VPDB}$ ) and stem cellulose ( $-25.7\text{‰ VPDB}$ ). Also, soil organic matter (SOM) and soil litter  $\delta^{13}\text{C}$  signals were, on average,  $-27.2\text{‰ VPDB}$  and  $-27.7\text{‰ VPDB}$ , respectively – both very similar to the  $\delta^{13}\text{C}$  signals of the soil  $\text{CO}_2$  flux and the stem phloem WSOM fraction. On average, and over the same period, the ecosystem respiration signal  $\delta_E$  was also depleted compared with the photosynthetic signal, at  $-27.7\text{‰ VPDB}$ , and lay between the soil and stem respiratory signals.

### Time lag analysis

To further explore the fate of newly assimilated C transfer within the tree and its eventual return to the atmosphere we calculated the Spearman's correlation coefficients between time-series of VPD, observed  $\delta_A$  or modelled  $\delta_A$  and those from the respired  $\delta^{13}\text{C}$  signals. For that, we used the 5-d running mean time-series shown in Fig. 5 and computed correlation coefficients between VPD, observed  $\delta_A$  or modelled  $\delta_A$  and the other time-series using a 45-d moving

window for different time lags (1–14 d). Over this 45-d window at least 50% of the data were required to calculate a correlation coefficient. Results from this analysis are shown in Fig. 7, where red areas indicate a high degree of positive correlation with observed  $\delta_A$ , modelled  $\delta_A$  or VPD.

This correlation analysis indicated that the stem respiration signal  $\delta_W$  was tightly coupled with VPD and  $\delta_A$  over most of the study period. However the number of days that  $\delta_W$  lagged behind the photo-assimilate or VPD signal varied from *c.* 2–3 d in August to 8–12 d in September, with somewhat different seasonal patterns in lag times depending on the time series used as a reference. Correlation analysis using the observed  $\delta_A$  signal also indicates a 12-d lag in  $\delta_W$  in June and a relatively persistent lag of *c.* 6 d at the end of the observation period, while correlation analysis using the modelled  $\delta_A$  and VPD signals both indicate longer time lags during the budburst period in April followed by much shorter time lags during the growing season from May to July, that increase again at the end of the summer months.

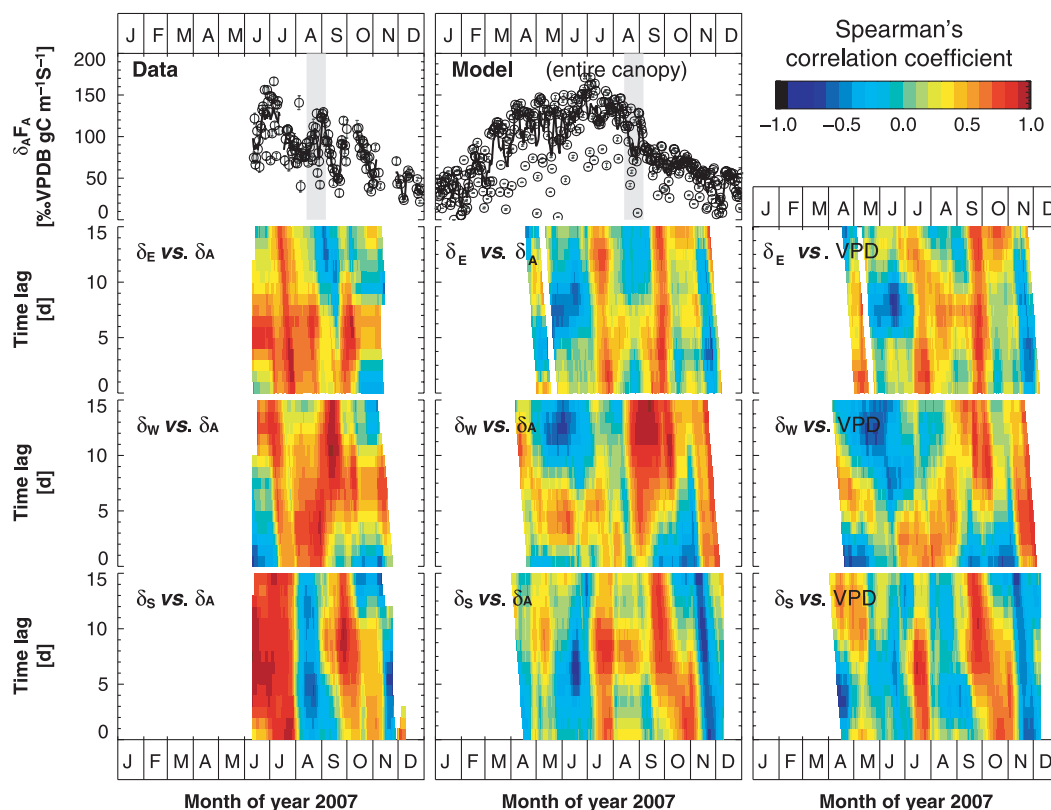
Correlation analysis between  $\delta_A$  (or VPD) and  $\delta_S$  also displayed variable time lags over the observation period, but also indicated periods, associated with cloudy and rainy conditions (e.g. June and August), when the two signals were either weakly or anticorrelated (in June this is not true for the observed  $\delta_A$  signal but this may be result from the lack of data earlier in May required to perform the correlation analysis over the entire 45-d window). During other periods, a lag between observed  $\delta_A$  and  $\delta_S$  of between 6 and 10 d in July and September and down to 3–5 d in October was observed.

At the ecosystem scale the degree of coupling between  $\delta_A$  (or VPD) and  $\delta_E$  exhibited time lags similar to those observed for  $\delta_S$ , except in August when  $\delta_S$  became decoupled to  $\delta_A$  and time lags for  $\delta_E$  became similar to those observed for  $\delta_W$ .

## Discussion

### Fractionation during autotrophic and heterotrophic respiration

Our study showed a strong enrichment (3–4‰ on average) in branch-respired  $\text{CO}_2$  compared with the photosynthetic signals and even stronger when compared with the needle WSOM fraction (Fig. 6). This pattern is consistent with previous observations for autotrophic organs (Tcherkez *et al.*, 2003; Badeck *et al.*, 2005; Bathellier *et al.*, 2008 [Correction added after online publication 20 August 2010: in this citation, the publication year was corrected from 2007 to 2008]; Bowling *et al.*, 2008) and the theory that  $^{13}\text{C}$ -enriched  $\text{CO}_2$  is preferentially released from the C-4 position of glucose by the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex and contributes strongly to the total respiratory flux from leaves in the dark (Rossman *et al.*, 1991;



**Fig. 7** Seasonal variations in the measured daytime branch isoflux scaled to the canopy and modelled daytime whole-canopy isoflux alongside the correlation strength between the daily carbon isotope signal from observed branch photosynthesis, modelled canopy photosynthesis or daily vapour pressure deficit against that of ecosystem, stem and soil respired  $\text{CO}_2$  with varying lag times. N.B. the isoflux is defined as the product of a gross  $\text{CO}_2$  flux ( $F_x$ ) and its isotopic composition ( $\delta_x$ ):  $I_x = F_x \delta_x$ , and branch data are for daytime conditions only.

Tcherkez *et al.*, 2004; Bathellier *et al.*, 2008 [Correction added after online publication 20 August 2010: in this citation, the publication year was corrected from 2007 to 2008]; Wingate, 2008). In addition,  $\delta^{13}\text{C}$  of triose phosphates diverted into starch storage during the day are relatively  $^{13}\text{C}$ -enriched causing a diel variation in  $\delta^{13}\text{C}$  of glucose that contributes to the  $^{13}\text{C}$ -enriched flux signal of  $\text{CO}_2$  respired at night (Gleixner *et al.*, 1993; Gleixner & Schmidt, 1997; Tcherkez *et al.*, 2004; Gessler *et al.*, 2008).

Our results also showed that  $\delta^{13}\text{C}$  of stem-respired  $\text{CO}_2$  was depleted (by 2–4‰ on average) compared with that of  $\delta_A$ , the phloem WSOM fraction and wood cellulose (Figs 5 and 6). This finding is in contrast with most observations of respired  $\text{CO}_2$  from woody stems, where the  $\text{CO}_2$  released by stems in the dark is generally  $^{13}\text{C}$ -enriched relative to the whole tissues and/or putative substrates (Cernusak *et al.*, 2001; Damesin & Lelarge, 2003; Gessler *et al.*, 2007; Kodama *et al.*, 2008). Our observations are, however, consistent with investigations made on other heterotrophic organs such as roots (Badeck *et al.*, 2005; Klumpp *et al.*, 2005; Bathellier *et al.*, 2008) [Correction added after online publication 20 August 2010: in this citation, the publication year was corrected from 2007 to 2008] and stems (Gessler *et al.*, 2009). Our results could indicate that the

refixation of  $\text{CO}_2$  by phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC) (anaplerotic uptake) that fractionates by 5.7‰ in favour of  $^{13}\text{C}$  and leads to an overall depletion of  $\text{CO}_2$  remaining in the stem (Melzer & O'Leary, 1987), is important in maritime pine.

Lignin synthesis could also result in the release of  $^{13}\text{C}$ -depleted  $\text{CO}_2$  from woody stems. The building blocks of lignin are synthesised in plastids by the pentose phosphate pathway (PPP) and can constitute up to 30% of maritime pine wood (Bert & Danjon, 2006). The  $\text{CO}_2$  released during the oxidative stage of this pathway is known to originate from the C-1 position of glucose which is relatively  $^{13}\text{C}$ -depleted. In roots the contribution of the PPP to the total  $\text{CO}_2$  efflux can be substantial (*c.* 25%) (Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1995; Bathellier *et al.*, 2009) [Correction added after online publication 20 August 2010: in this citation, the publication year was corrected from 2008 to 2009]. However, it remains unclear how important the contribution of this pathway is to the total  $\text{CO}_2$  efflux in woody stems and how the contribution varies over the growing season.

Unlike  $\delta_W$ , the average  $\delta^{13}\text{C}$  of soil-respired  $\text{CO}_2$  was comparable to that of total phloem WSOM extracts (Fig. 6). From previous observations on trenched and

untrenched plots in mature maritime pine stands near our site, root respiration represents *c.* 40% of the total soil CO<sub>2</sub> efflux (R Burrett, *et al.*, unpublished). If we assume that the  $\delta^{13}\text{C}$  of root-respired CO<sub>2</sub> has the same composition as stem respiration ( $-28.5\text{‰}$ ), to obtain a total soil CO<sub>2</sub> efflux signal of *c.*  $-26.5\text{‰}$  would require a <sup>13</sup>C-enriched contribution of  $-25.2\text{‰}$  via heterotrophic respiration. This enriched signal is consistent with the observation during the rainy period of a small enrichment in  $\delta_{\text{S}}$  while the autotrophic components were becoming depleted, perhaps indicating an enhanced heterotrophic contribution. If the substrate for heterotrophic respiration is soil BOM, our results indicate a modest fractionation of *c.*  $+2\text{‰}$  during heterotrophic respiration, consistent with results for microbial studies (Andrews *et al.*, 2000).

Our study also found a strong depleted signal in the needle WSOM fraction compared with all other ecosystem C pools or CO<sub>2</sub> fluxes (Fig. 6). This result followed the pattern whereby  $\delta^{13}\text{C}$  of the WSOM fractions in leaf < twig phloem < stem phloem at 1.3 m (Damesin & Lelarge, 2003; Brandes *et al.*, 2006; Gessler *et al.*, 2007; Kodama *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2010). The mechanism for this consistent pattern of <sup>13</sup>C enrichment in sugars downstream of the leaf remains unclear, although a number of interesting hypotheses have been postulated (for a review see Cernusak *et al.*, 2009).

The pattern between  $\delta^{13}\text{C}$  of observed and modelled photosynthetic fluxes, needle BOM and the needle WSOM fraction is, however, unusual. Many studies have found more depleted  $\delta^{13}\text{C}$  in foliage BOM than in the foliage WSOM fraction, and individual sugars (Bowling *et al.*, 2008; Cernusak *et al.*, 2009), but a few studies (including ours) also indicate that this pattern is not always found (Badeck *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009). It could be that the WSOM fraction we extracted contains a large concentration of <sup>13</sup>C-depleted compounds such as amino and organic acids. Previous studies indicate that such acids in foliage WSOM extracts are often negligible (Brandes *et al.*, 2006; Gessler *et al.*, 2009). A large contribution of polyols such as pinitol and myo-inositol might also be at the origin of this pattern. These compounds are known to accumulate in maritime pine needles during drought stress (Nguyen & Lamant, 1988) and are typically 2–3‰ more depleted than glucose and sucrose (Devaux *et al.*, 2009). These polyols tend not to be used in the construction of biomass or dark respiration (Smith & Phillips, 2010), explaining a weaker <sup>13</sup>C depletion in needle BOM and branch respiration (Fig. 6).

#### Fate of newly assimilated C within the ecosystem

Using natural abundance gas-exchange techniques in the field, it can be challenging to detect the turnover time of C at the plant and ecosystem scale. Unlike pulse labelling experiments where only a few hours of labelling are required

to imprint the C pool of large trees (Högberg *et al.*, 2008; Bahn *et al.*, 2009; Plain *et al.*, 2009; Ruehr *et al.*, 2009; Subke *et al.*, 2009), natural abundance experiments require both large C fluxes associated with strong shifts in the isotopic inputs (i.e. large isofluxes) and for those shifts to persist over a number of days. For example, during the rainy period of August there was a very strong depletion in the isotopic signal of the photosynthetic flux accompanied by low rates of CO<sub>2</sub> assimilation that led to a reduction in the isofluxes (Fig. 7, top panels). Thus, this strong isotopic signal carried by a relatively small amount of C is likely to have been diluted in the larger existing C pool of the plant and furthermore by the heterotrophic contributions of the total soil CO<sub>2</sub> flux, compromising the detection of this isotopic shift at the soil scale.

Performing correlation analysis between multiple components in an ecosystem and obtaining a strong degree of coupling also requires that the  $\delta^{13}\text{C}$  produced by respiring organs or organisms is primarily regulated by the isotopic variations of  $\delta_{\text{A}}$ . However, if substrates with a  $\delta^{13}\text{C}$  different from  $\delta_{\text{A}}$  are used for metabolism, the coupling would be reduced (Bhupinderpal-Singh *et al.*, 2003). Similarly, if the metabolic pathways involved in producing CO<sub>2</sub> during respiration fractionate differently in response to changes in environmental conditions then this could also confound the correlation. Our results indicate that post-photosynthetic fractionations may occur and that the signals of respiration may differ from  $\delta_{\text{A}}$ . Such caveats have been highlighted by other studies (Kodama *et al.*, 2008; Gessler *et al.*, 2009).

Nonetheless, our correlation analysis (Fig. 7) still revealed strong responses of stem-, soil- and ecosystem-respired  $\delta^{13}\text{C}$  signals to changes in observed and modelled photosynthetic discrimination over the season. We also found strong correlations with VPD alone indicating that VPD may be a reasonable proxy to gauge the 'speed of link' between aboveground and belowground C transport in the absence of  $\Delta_{\text{A}}$  measurements, especially for stem measurements. During the rainy period (highlighted in Figs 5 and 7), the depleted isotopic signal of  $\delta_{\text{A}}$  was transferred to the CO<sub>2</sub> respired by the stem, but no similar depletion was observed from the soil (Fig. 5), resulting in a weak correlation between  $\delta_{\text{S}}$  and observed  $\delta_{\text{A}}$  (or VPD) (Fig. 7). We hypothesize that this reduction in correlation was caused by an increase in the contribution of heterotrophic respiration to the total soil CO<sub>2</sub> flux with a <sup>13</sup>C-enriched signal and a small flux of C (relative to the total soluble C pool) into the tree carrying the depleted signal. In addition, when we extended the time-series available for correlation analysis using modelled  $\delta_{\text{A}}$  and VPD we found another period during June when the coupling with  $\delta_{\text{S}}$  was anti-correlated with these two signals (Fig 7). We speculate that active shoot and wood growth curtailed the supply of freshly assimilated C below ground, forcing roots to sustain their metabolic requirements with reserve carbohydrates.

These explanations could help explain why some previous isotopic studies at lower temporal resolution or for shorter periods have not found evidence of strong coupling between canopy photosynthesis and ecosystem respiration (Bowling *et al.*, 2002; Mortazavi & Chanton, 2002; McDowell *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2008).

Given the distance between our branch, stem and soil chambers (*c.* 4 and 20 m, respectively) our lag time analysis indicates transport velocities of between 0.03 m h<sup>-1</sup> in spring and autumn and 0.14 m h<sup>-1</sup> in summer. Further experiments performed in 2008 using multiple stem chambers at different heights in the canopy further confirm this range of transport velocities (M Devaux *et al.*, unpublished). These transport velocity values are at the lower range of transport velocities calculated for a range of plant functional types and sizes (Mencuccini & Höltta, 2009). A possible explanation could be that the sieve pores of gymnosperms are generally much smaller than those of angiosperms (< 0.8 µm) (Schulz, 1992; Schulz & Thompson, 2001) and are covered on either side by extensive lengths of endoplasmic reticulum (ER) membrane (Neuberger & Evert, 1974; Schulz, 1992). These ER complexes appear to be important obstacles to mass flow and seem to exclude a strictly passive translocation down a concentration gradient in gymnosperms, as often described by the Münch hypothesis (Münch, 1930). Interestingly, using a numerical model of the Münch theory, Mencuccini & Höltta (2009) found it necessary to increase the specific conductivity and turgor pressure differences in tall trees to match the observed velocities derived from their literature review, indicating that slower transfer rates are theoretically anticipated.

We also found that the transport velocities between  $\Delta_A$  (or VPD) and the respired CO<sub>2</sub> signals appeared to vary over the season. Again we speculate that the allocation of C within the plant may alter in response to the C sink strength of growing organs over the season. Changes in source-to-sink relations that occur over the year (Kozlowski, 1992) are known to strongly influence mass flow of sugars in the phloem (Peuke *et al.*, 2006). An alternative explanation could be that drought stress can reduce the downstream transport of sugars in trees. Ruehr *et al.* (2009) recently demonstrated that drought stress reduced transport rates from 0.5–1.0 m h<sup>-1</sup> (Keitel *et al.*, 2003) to 0.01 m h<sup>-1</sup> in beech saplings [Correction added after online publication 20 August 2010: in the preceding sentence, 0.1 m h<sup>-1</sup> was corrected to 0.01 m h<sup>-1</sup>]. These findings indicate that the degree of coupling between  $\Delta_A$  and the respired CO<sub>2</sub> signal might not only be related to species, phenology and tree height but may also vary with environmental conditions.

## Conclusions

This study demonstrates that the isotopic composition of CO<sub>2</sub> released by various components of the ecosystem may

not reflect exactly the isotopic composition of the CO<sub>2</sub> fixed during photosynthesis. Should more experiments confirm our findings, it will be necessary to explore the impact of such results on  $\delta^{13}\text{C}$  of atmospheric CO<sub>2</sub> and biomass C pools alongside their temporal variations using isotope-enabled vegetation models. To achieve this, it might be necessary to describe explicitly the isotopic mixing of recent photosynthates into a large plant C pool that provides the substrate for autotrophic respiration and biomass production. For example, some models based on such principles are used to interpret the intra-annual isotopic variations deposited in tree ring cellulose at high resolution (Ogée *et al.*, 2009). This approach seems promising and could be applied to the modelling of plant respiratory signals and exploration of the effects of various post-photosynthetic processes hypothesized in our study, especially the observed differences between the  $\delta^{13}\text{C}$  of stem respired CO<sub>2</sub>, phloem sugars and cellulose. However, because these processes seem to vary among species, there will be a need to conduct similarly detailed studies in other ecosystems to gauge and explain differences in isotopic patterns and their potential implications on the mass C balance of the plant and the atmosphere. With more studies such as the one presented here, future isotope-enabled soil-vegetation-atmosphere transfer models will be better able to develop and parameterize transfer functions that can account for these phenomenon and be used to interpret and predict the isotopic impact of biosphere gas exchange on  $\delta^{13}\text{C}$  of atmospheric CO<sub>2</sub>.

## Acknowledgements

This work was supported with salary for LW through a EU-FP6 grant (CarboEurope-IP) awarded to JG, an ANR grant (MIST) awarded to JO and a Marie Curie Intra-European Career Development Fellowship awarded to LW. Research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 237582. Additional funding support for the experiment were provided by the Région Aquitaine through a grant awarded to Céline Meredieu, the ORE FORET through a grant awarded to DL and the INRA department EFPA through a grant awarded to JO. We thank Michel Sartore, Cathy Lambrot and Andy Cross for their laboratory and field assistance. We also thank Andy Cross for providing data on the litter and soil C isotope composition, Michel Stievenard, Monique Pierre and Anais Feron for analysing the wood cellulose C isotope composition and Jean Marc Bonnefond, Didier Garigou and Sandra Debesa for providing meteorological and eddy covariance flux data. Furthermore, we would like to thank Martina Schmidt (LSCE), Willi Brand, Armin Jordan and Michel Rothe (Max Planck Institute for Biogeochemistry), along with the IMECC structure for

their support and assistance with our calibration needs. Lastly we would like to thank Dave Bowling and Jaleh Ghashghaie for helpful discussions.

## References

- Andrews JA, Matamala R, Westover KM, Schlesinger WH. 2000. Temperature effects on the diversity of soil heterotrophs and the  $\delta^{13}\text{C}$  of soil-respired  $\text{CO}_2$ . *Soil Biology and Biochemistry* 32: 699–706.
- Aranibar JN, Berry JA, Riley WJ, Pataki DE, Law BE, Ehleringer JR. 2006. Combining meteorology, eddy fluxes, isotope measurements, and modeling to understand environmental controls of carbon isotope discrimination at the canopy scale. *Global Change Biology* 12: 710–730.
- Badeck F, Fontaine J-L, Dumas F, Ghashghaie J. 2009. Consistent patterns in leaf lamina and leaf vein carbon isotope composition across ten herbs and tree species. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 2455–2460.
- Badeck F-W, Tcherkez G, Nogués S, Piel C, Ghashghaie J. 2005. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs – a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 1381–1391.
- Bahn M, Schmitt M, Siegwolf RTW, Richter A, Brüggemann N. 2009. Does photosynthesis affect grassland soil-respired  $\text{CO}_2$  and its carbon isotope composition on a diurnal timescale. *New Phytologist* 182: 451–460.
- Bakwin PS, Tans PP, White JWC, Andres RJ. 1998. Determination of the isotopic ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) discrimination by terrestrial biology from a global network of observations. *Global Biogeochemical Cycles* 12: 555–562.
- Baldocchi DD, Bowling DR. 2003. Modelling the discrimination of  $^{13}\text{C}$  above and within a temperate broad-leaved forest canopy on hourly to seasonal time scales. *Plant, Cell & Environment* 26: 231–244.
- Barbour MM, Hunt JE, Dungan RJ, Turnbull MH, Brailsford GW, Farquhar GD, Whitehead D. 2005. Variation in the degree of coupling between  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap and ecosystem respiration in two mature *Nothofagus* forests. *New Phytologist* 166: 497–512.
- Bathellier C, Badeck F, Couzi P, Harscoet S, Mauve C, Ghashghaie J. 2008. [Correction added after online publication 20 August 2010: in this reference, the publication year was corrected from 2007 to 2008] Divergence in  $\delta^{13}\text{C}$  of dark respired  $\text{CO}_2$  and bulk organic matter occurs during the transition between heterotrophy and autotrophy in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *New Phytologist* 177: 406–418.
- Bathellier C, Tcherkez G, Bligny R, Gout E, Cornic G, Ghashghaie J. 2009. [Correction added after online publication 20 August 2010: in this reference, the publication year was corrected from 2008 to 2009. Additionally, the page range was corrected from 387 to 387–399] Metabolic origin of the  $\delta^{13}\text{C}$  of respired  $\text{CO}_2$  in roots of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* 181: 387–399.
- Battle M, Bender M, Tans PP, White JWC, Ellis JT, Conway T, Francey RJ. 2000. Global carbon sinks and their variability inferred from atmospheric  $\text{O}_2$  and  $\delta^{13}\text{C}$ . *Science* 287: 2467–2470.
- Berbigier P, Bonnefond J-M, Mellmann P. 2001.  $\text{CO}_2$  and water vapour fluxes for 2 years above Euroflux forest site. *Agricultural and Forest Meteorology* 108: 183–197.
- Bert D, Danjon F. 2006. Carbon concentration variations in the roots, stem and crown of mature *Pinus pinaster* (Ait.). *Forest Ecology and Management* 222: 279–295.
- Bhupinderpal-Singh, Nordgren A, Ottosson Löfvenius M, Höglberg MN, Mellander PE, Höglberg P. 2003. Tree root and soil heterotrophic respiration as revealed by girdling of boreal Scots pine forest: extending observations beyond the first year. *Plant, Cell & Environment* 26: 1287–1296.
- Bowling DR, McDowell NG, Bond BJ, Law BE, Ehleringer JR. 2002.  $^{13}\text{C}$  content of ecosystem respiration is linked to precipitation and vapor pressure deficit. *Oecologia* 131: 113–124.
- Bowling DR, Pataki DE, Richardson JT. 2008. Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and  $\text{CO}_2$  fluxes. *New Phytologist* 178: 24–40.
- Brandes E, Kodama N, Whittaker K, Weston C, Rennenberg H, Keitel C, Adams MA, Gessler A. 2006. Short-term variation in the isotopic composition of organic matter allocated from the leaves to the stem of *Pinus sylvestris*: effects of photosynthetic and post-photosynthetic carbon isotope fractionation. *Global Change Biology* 12: 1922–1939.
- Cernusak LA, Marshall JD, Comstock JP, Balster NJ. 2001. Carbon isotope discrimination in photosynthetic bark. *Oecologia* 128: 24–35.
- Cernusak LA, Pate JS, Farquhar GD. 2002. Diurnal variation in the stable isotope composition of water and dry matter in fruiting *Lupinus angustifolius* under field conditions. *Plant, Cell & Environment* 25: 893–907.
- Cernusak LA, Tcherkez G, Keitel C, Cornwell WK, Santiago LS, Knohl A, Barbour MM, Williams DG, Reich PB, Ellsworth DS *et al.* 2009. Why are non-photosynthetic tissues generally  $^{13}\text{C}$ -enriched compared with leaves in  $\text{C}_3$  plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology* 36: 199–213.
- Ciais P, Tans PP, Trolrier M, White JWC, Francey RJ. 1995. A large northern hemisphere terrestrial  $\text{CO}_2$  sink indicated by the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of atmospheric  $\text{CO}_2$ . *Science* 269: 1098–1102.
- Damesin C, Lelarge C. 2003. Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant, Cell & Environment* 26: 207–219.
- Delzon S, Sartore M, Granier A, Loustau D. 2004. Radial profiles of sap flow with increasing tree size in maritime pine. *Tree Physiology* 24: 1285–1293.
- Devaux M, Ghashghaie J, Bert D, Lambrot C, Gessler A, Bathellier C, Ogee J, Loustau D. 2009. Carbon stable isotope ratio of phloem sugars in mature pine trees throughout the growing season: comparison of two extraction methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 2511–2518.
- Dieuaide-Noubhani M, Raffard G, Canioni P, Pradet A, Raymond P. 1995. Quantification of compartmented metabolic fluxes in maize root tips using isotope distribution from  $^{13}\text{C}$ - or  $^{14}\text{C}$ -labelled glucose. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 13147–13159.
- Eklblad A, Boström B, Holm A, Comstedt D. 2005. Forest soil respiration rate and  $\delta^{13}\text{C}$  is regulated by recent above ground weather conditions. *Oecologia* 143: 136–142.
- Eklblad A, Höglberg P. 2001. Natural abundance of  $^{13}\text{C}$  in  $\text{CO}_2$  respired from forest soils reveals speed of link between tree photosynthesis and root respiration. *Oecologia* 127: 305–308.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503–537.
- Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9: 121–137.
- Francey RJ, Tans PP, Allison CE, Enting IG, White JWC, Trolrier M. 1995. Changes in oceanic and terrestrial carbon uptake since 1982. *Nature* 373: 326–330.
- Gessler A, Keitel C, Kodama N, Weston C, Winters AJ, Keith H, Grice K, Leuning R, Farquhar GD. 2007.  $\delta^{13}\text{C}$  of organic matter transported from the leaves to the roots in *Eucalyptus delegatensis*: short-term variations and relation to respired  $\text{CO}_2$ . *Functional Plant Biology* 34: 692–706.
- Gessler A, Tcherkez G, Karyanto O, Keitel C, Ferrio JP, Ghashghaie J, Kreuzwieser J, Farquhar GD. 2009. On the metabolic origin of the carbon isotope composition of  $\text{CO}_2$  evolved from darkened light-acclimated leaves in *Ricinus communis*. *New Phytologist* 181: 374–386.

- Gessler A, Tcherkez G, Peuke AD, Ghashghaie J, Farquhar GD. 2008. Experimental evidence for diel variations of the carbon isotope composition in leaf, stem and phloem sap organic matter in *Ricinus communis*. *Plant, Cell & Environment* 31: 941–953.
- Gleixner G, Danier H-J, Werner RA, Schmidt H-L. 1993. Correlations between the  $^{13}\text{C}$  content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing Basidiomycetes. *Plant Physiology* 102: 1287–1290.
- Gleixner G, Schmidt H-L. 1997. Carbon isotope effects on the fructose-1,6-bisphosphate aldolase reaction, origin for non-statistical  $^{13}\text{C}$  distributions in carbohydrates. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 5382–5387.
- Granier A, Loustau D. 1994. Measuring and modelling the transpiration of a maritime pine canopy from sap-flow data. *Agricultural and Forest Meteorology* 71: 61–81.
- Griffis TJ, Sargent SD, Baker JM, Lee X, Tanner BD, Greene J, Swiatek E, Billmark KA. 2008. Direct measurement of biosphere–atmosphere isotopic  $\text{CO}_2$  exchange using the eddy covariance technique. *Journal of Geophysical Research* 113. doi: 10.1029/2007JD009297.
- Högberg P, Högberg MN, Göttlicher SG, Betson NR, Keel SG, Metcalfe DB, Campbell C, Schindlbacher A, Hurry V, Lundmark T *et al.* 2008. High temporal resolution tracing of photosynthate carbon from the tree canopy to forest soil microorganisms. *New Phytologist* 177: 220–228.
- Hu J, Moore DJP, Monson RK. 2010. Weather and climate controls over the seasonal carbon isotoped dynamics of sugars from subalpine forest trees. *Plant, Cell & Environment* 33: 35–47.
- Kaplan JO, Prentice IC, Buchmann N. 2002. The stable carbon isotope composition of the terrestrial biosphere: modeling at scales from the leaf to the globe. *Global Biogeochemical Cycles* 16: 1060.
- Keeling CD. 1961. The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide in rural and marine air. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 24: 277–298.
- Keitel C, Adams MA, Holst T, Matzarakis A, Mayer H, Rennenberg H, Gessler A. 2003. Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-time measure for stomatal conductance of European beech (*Fagus sylvatica*). *Plant, Cell & Environment* 26: 1157–1168.
- Klumpp K, Schäufele R, Lötscher M, Lattanzi FA, Feneis W, Schnyder H. 2005. C-isotope composition of  $\text{CO}_2$  respired by shoots and roots: fractionation during dark respiration? *Plant, Cell & Environment* 28: 241–250.
- Knohl A, Werner RA, Brand W, Buchmann N. 2005. Short-term variations in  $\delta^{13}\text{C}$  of ecosystem respiration reveals link between assimilation and respiration in a deciduous forest. *Oecologia* 142: 70–82.
- Kodama N, Barnard RL, Salmon Y, Weston C, Ferrio JP, Holst J, Werner RA, Saurer M, Rennenberg H, Buchmann N *et al.* 2008. Temporal dynamics of the carbon isotope composition in a *Pinus sylvestris* stand: from newly assimilated organic carbon to respired carbon dioxide. *Oecologia*. doi: 10.1007/s00442-008-1030-1.
- Kozłowski TT. 1992. Carbohydrates sources and sinks in woody plants. *The Botanical Review* 58: 107–222.
- Lai CT, Ehleringer JR, Schauer AJ, Tans PP, Hollinger DY, Paw UKT, Munger JW, Wofsy SC. 2005. Canopy-scale  $\delta^{13}\text{C}$  of photosynthetic and respiratory  $\text{CO}_2$  fluxes: observations in forest biomes across the United States. *Global Change Biology* 11: 633–643.
- Lloyd J, Farquhar GD. 1994.  $^{13}\text{C}$  discrimination during  $\text{CO}_2$  assimilation by the terrestrial biosphere. *Oecologia* 99: 201–215.
- Marron N, Plain C, Longdoz B, Epron D. 2009. Seasonal and daily time course of the  $^{13}\text{C}$  composition in soil  $\text{CO}_2$  efflux recorded with a tunable diode laser spectrophotometer (TDLS). *Plant and Soil* 318: 137–151.
- Maseyk K, Wingate L, Seibt U, Ghashghaie J, Bathellier C, Almeida P, Lobo de Vale R, Pereira JS, Yakir D, Mencuccini M. 2009. Biotic and abiotic factors affecting the  $\delta^{13}\text{C}$  of soil respired  $\text{CO}_2$  in a Mediterranean oak woodland. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 45: 343–359.
- McDowell NG, Bowling DR, Bond BJ, Irvine J, Law BE, Anthoni P, Ehleringer JR. 2004. Response of the carbon isotopic content of ecosystem, leaf, and soil respiration to meteorological and physiological driving factors in a *Pinus ponderosa* ecosystem. *Global Biogeochemical Cycles* 18: GB1013, doi:10.1029/2003GB002049.
- McNevin DB, Badger MR, Kane HJ, Farquhar GD. 2006. Measurement of (carbon) kinetic isotope effect by Rayleigh fractionation using membrane inlet mass spectrometry for  $\text{CO}_2$ -consuming reactions. *Functional Plant Biology* 33: 1115–1128.
- Melzer E, O'Leary MH. 1987. Anapleurotic  $\text{CO}_2$  fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in  $\text{C}_3$  plants. *Plant Physiology* 84: 58–60.
- Mencuccini M, Hölttä T. 2009. The significance of phloem transport for the speed with which canopy photosynthesis and belowground respiration are linked. *New Phytologist* 185: 189–203.
- Miller J, Tans PP. 2003. Calculating isotopic fractionation from atmospheric measurements at various scales. *Tellus* 55: 207–214.
- Mortazavi B, Chanton JP. 2002. Carbon isotopic discrimination and control of nighttime canopy  $\delta^{18}\text{O}-\text{CO}_2$  in a pine forest in the southeastern United States. *Global Biogeochemical Cycles* 16: 1008. 10.1029/2000GB001390.
- Mortazavi B, Chanton JP, Prater JL, Oishi AC, Oren R, Katul G. 2005. Temporal variability in  $^{13}\text{C}$  of respired  $\text{CO}_2$  in a pine and a hardwood forest subject to similar climatic conditions. *Oecologia* 142: 57–69.
- Münch E. 1930. *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Jena, Germany: Gustav Fischer.
- Neuberger DS, Evert RF. 1974. Structure and development of the sieve-element protoplast in the hypocotyl of *Pinus resinosa*. *American Journal of Botany* 61: 360–374.
- Nguyen A, Lamant A. 1988. Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedlings of Maritime pine. *Phytochemistry* 27: 3423–3427.
- Ogée J, Barbour MM, Wingate L, Bert D, Bosc A, Stievenard M, Lambrot C, Pierre M, Bariac T, Loustau D *et al.* 2009. A single-substrate model to interpret intra-annual stable isotope signals in tree ring cellulose. *Plant, Cell & Environment* 32: 1071–1090. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01989.x.
- Ogée J, Brunet Y, Loustau D, Berbigier P, Delzon S. 2003a. MuSICA, a  $\text{CO}_2$ , water and energy multilayer, multileaf pine forest model: evaluation from hourly to yearly time scales and sensitivity analysis. *Global Change Biology* 9: 697–717.
- Ogée J, Peylin P, Ciais P, Bariac T, Brunet Y, Berbigier P, Roche C, Richard P, Bardoux G, Bonnefond J-M. 2003b. Partitioning net ecosystem exchange into net assimilation and respiration using  $^{13}\text{CO}_2$  measurements: a cost-effective sampling strategy. *Global Biogeochemical Cycles* 17: GB1070, doi: 10.1029/2002GB001995.
- Ogée J, Peylin P, Cuntz M, Bariac T, Brunet Y, Ciais P. 2004. Partitioning net ecosystem carbon exchange into net assimilation and respiration with canopy-scale isotopic measurements: an error propagation analysis with  $^{13}\text{CO}_2$  and  $\text{CO}^{18}\text{O}$  data. *Global Biogeochemical Cycles* 18: GB2019, doi: 10.1029/2003GB002166.
- Peuke AD, Windt C, Van As H. 2006. Effects of cold-girdling on flows in the transport phloem in *Ricinus communis*: is mass flow inhibited? *Plant, Cell & Environment* 29: 15–25.
- Plain C, Gerant D, Maillard P, Dannoura M, Dong Y, Zeller B, Priault P, Parent F, Epron D. 2009. Tracing of recently assimilated carbon in respiration at high temporal resolution in the field with a tuneable diode laser absorption spectrometer after *in situ*  $^{13}\text{CO}_2$  pulse labelling of 20-year-old beech trees. *Tree Physiology* 29: 1433–1445.



- Porté A, Bosc A, Champion I, Loustau D. 2000. Estimating the foliage area of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) branches and crowns with application to modelling the foliage area distribution in the crown. *Annals of Forest Science* 57: 73–86.
- Porté A, Loustau D. 1998. Variability of the photosynthetic characteristics of mature needles within the crown of a 25-year old *Pinus pinaster*. *Tree physiology* 18: 223–232.
- Ramonet M, Ciais P, Nepomniachii I, Sidorov K, Neubert REM, Langendorfer U, Picard D, Kazan V, Biraud S, Gusti M *et al.* 2002. Three years of aircraft-based trace gas measurements over the Fyodorovskoye southern taiga forest, 300 km north-west of Moscow. *Tellus* 54B: 713–734.
- Randerson JT, Collatz GJ, Fessenden JE, Munoz AD, Still CJ, Berry JA, Fung I, Suits N, Denning AS. 2002. A possible global covariance between terrestrial gross primary production and  $^{13}\text{C}$  discrimination: consequences for the atmospheric  $^{13}\text{C}$  budget and its response to ENSO. *Global Biogeochemical Cycles* 16. doi:10.1029/2001GB001845.
- Rossmann A, Butzenlechner M, Schmidt H-L. 1991. Evidence for a nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose. *Plant Physiology* 96: 609–614.
- Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL. 2009. Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil  $\text{CO}_2$  efflux. *New Phytologist* 184: 950–961.
- Schaeffer SM, Anderson DE, Burns SP, Monson RK, Sun J, Bowling DR. 2008. Canopy structure and atmospheric flows in relation to the  $\delta^{13}\text{C}$  of respired  $\text{CO}_2$  in a subalpine coniferous forest. *Agricultural and Forest Meteorology* 148: 592–605.
- Schulz A. 1992. Living sieve cells of conifers as visualized by confocal, laser-scanning fluorescence microscopy. *Protoplasma* 166: 153–164.
- Schulz A, Thompson GA. 2001. Phloem structure and function. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi: 10.1002/9780470015902.a9780470001290.pub9780470015902.
- Smith AE, Phillips DV. 2010. Influence of sequential prolonged periods of dark and light on pinitol concentration in clover and soybean tissue. *Physiologia Plantarum* 54: 31–33.
- Steinmann K, Siegwolf RTW, Saurer M, Körner C. 2004. Carbon fluxes to the soil in a mature temperate forest assessed by  $^{13}\text{C}$  isotope tracing. *Oecologia* 141: 489–501.
- Subke J-A, Vallack HW, Magnusson T, Keel SG, Metcalfe DB, Höglberg P, Ineson P. 2009. Short-term dynamics of abiotic and biotic soil  $^{13}\text{CO}_2$  effluxes after *in situ*  $^{13}\text{CO}_2$  pulse labelling of a boreal pine forest. *New Phytologist* 183: 349–357.
- Sun W, Resco V, Williams DG. 2009. Diurnal and seasonal variation in the carbon isotope composition of leaf dark-respired  $\text{CO}_2$  in velvet mesquite (*Prosopis velutina*). *Plant, Cell & Environment* 32: 1390–1400.
- Tcherkez G, Farquhar GD, Badeck F-W, Ghashghaie J. 2004. Theoretical considerations about carbon isotope distribution in glucose of  $\text{C}_3$  plants. *Functional Plant Biology* 31: 857–877.
- Tcherkez G, Nogués S, Bleton J, Cornic G, Badeck F, Ghashghaie J. 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired  $\text{CO}_2$  in French bean. *Plant Physiology* 131: 237–244.
- Wingate L. 2008. Weighty issues in respiratory metabolism: intriguing carbon isotope signals from roots and leaves. *New Phytologist* 177: 285–287.
- Wingate L, Ogee J, Burlett R, Bosc A. 2010. Strong seasonal disequilibrium measured between the oxygen isotope signals of leaf and soil  $\text{CO}_2$  exchange. *Global Change Biology*. doi: 10.1111/j.1365-2486.2010.02186.x.
- Wingate L, Seibt U, Maseyk K, Ogee J, Almeida P, Yakir D, Pereira JS, Mencuccini M. 2008. Oxygen stable isotope signals of net soil  $\text{CO}_2$  efflux record changes in soil evaporation and indicate the presence of carbonic anhydrase in Mediterranean soils. *Global Change Biology* 14: 2178–2193.
- Wingate L, Seibt U, Moncrieff J, Lloyd J, Berry J. 2007. Variations in  $^{13}\text{C}$  discrimination during  $\text{CO}_2$  exchange in *Picea sitchensis* branches in the field. *Plant, Cell & Environment* 30: 600–616. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01647.x.
- Zobitz JM, Keener JP, Schnyder H, Bowling DR. 2006. Sensitivity analysis and quantification of uncertainty for isotopic mixing relationships in carbon cycle research. *Agricultural and Forest Meteorology* 136: 56–75.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Fig. S1** Typical sampling sequence used in this study.

**Fig. S2** Normalised 1-Hz time-series of isotopologue concentrations and ratios.

**Fig. S3** Checking for memory effects.

**Fig. S4** Normalized distributions of standard errors on calibration measurements.

**Methods S1** Extended methods section.

**Table S1** Characteristics of reference  $\text{CO}_2$ , calibration tanks and vacuum times

**Table S2** Mean standard errors for the site average scan for different data types

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

*Posters*



R. BURLETT<sup>(1)</sup>, A. BOSCH<sup>(1)</sup>, L. WINGATE<sup>(2)</sup>, J. OGEE<sup>(1)</sup>, M. DEVAUX<sup>(1)</sup> et D. LOUSTAU<sup>(1)</sup>

(1) EPHYSE, INRA, Centre de Bordeaux, Pierroton, France (2) School of GeoSciences, University of Edinburgh, Edimbourg, Royaume-Uni

## I. Contexte et objectif

Les principaux isotopologues stables du  $\text{CO}_2$  ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ,  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ) sont des traceurs atmosphériques complémentaires qui intègrent, dans l'espace et dans le temps, les processus biologiques et physiques impliqués dans les cycles biogéochimiques. La méthodologie isotopique, qui consiste à effectuer des bilans de masse pour chacun de ces traceurs, a déjà largement contribué à l'amélioration des connaissances sur le fonctionnement des écosystèmes. Traditionnellement, les teneurs isotopiques du  $\text{CO}_2$  atmosphérique sont effectuées par prélèvements d'échantillons d'air dans des flacons hermétiques, ce qui limite la résolution temporelle des signaux isotopiques étudiés et rend difficile et laborieuse l'étude de processus rapides lors de variations brutales de l'environnement (alternance jour/nuit, ombre/soleil, turbulence,...). Depuis quelques années, des techniques pour mesurer ces teneurs isotopiques de manière continue et automatisée se sont développées et ouvrent de nouvelles perspectives en biogéochimie isotopique. **L'objectif de cette étude est de proposer un dispositif expérimental inédit et innovant, s'appuyant sur ces nouvelles techniques, et visant à suivre en continu et sur toute une saison de croissance les signatures isotopiques ( $^{13}\text{C}$  et  $^{18}\text{O}$ ) des diverses sources et puits de  $\text{CO}_2$  d'un écosystème forestier, de la photosynthèse à la respiration autotrophe (tronc, branches...) et hétérotrophe (sol). A terme, un tel dispositif permettra de vérifier certaines hypothèses de modélisation des processus sous-jacents en vue d'améliorer notre compréhension des échanges de carbone dans le continuum sol-plante-atmosphère.**

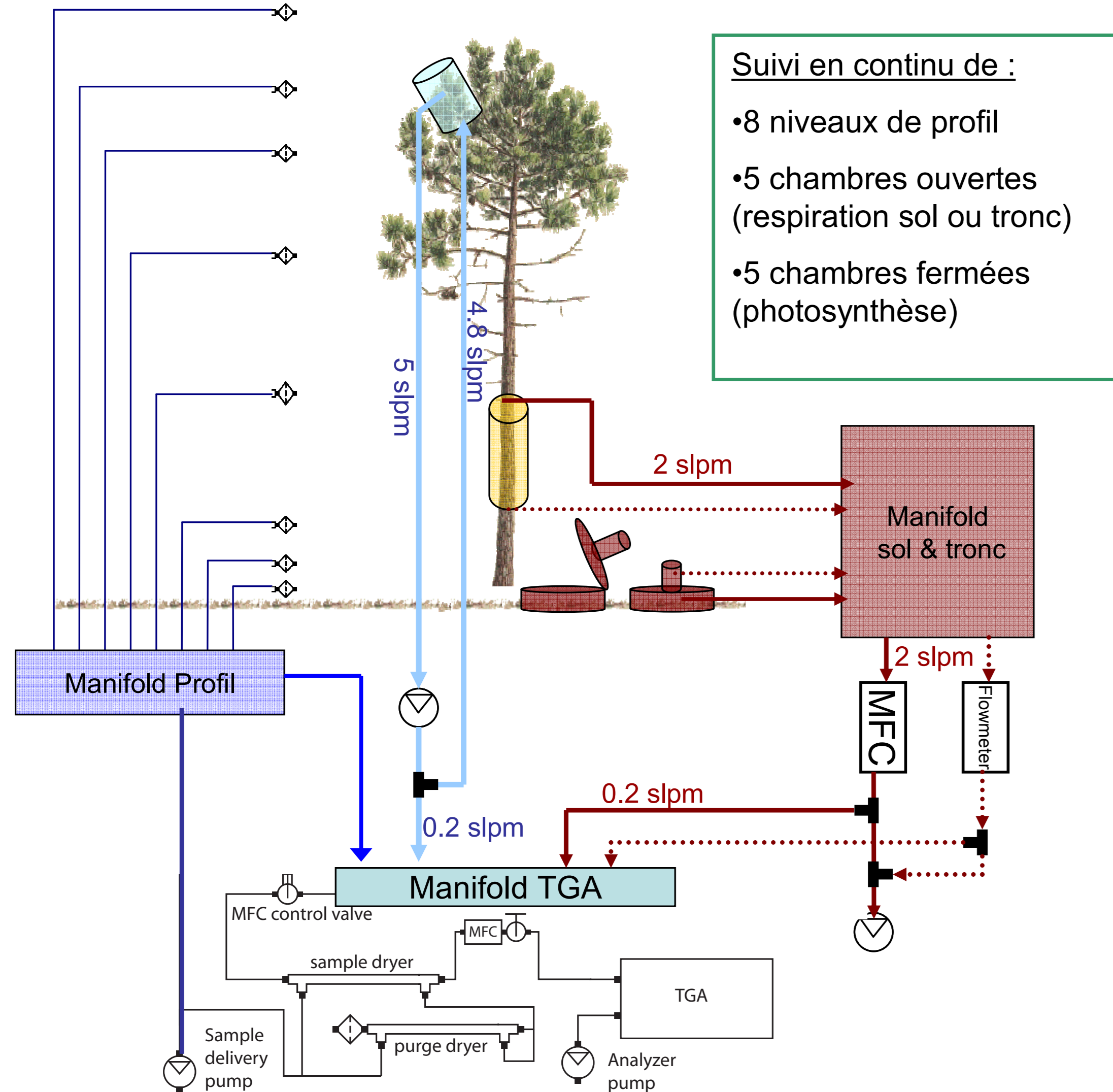


Fig 1: Schéma de principe du dispositif de mesure (gaz étalon non représentés)

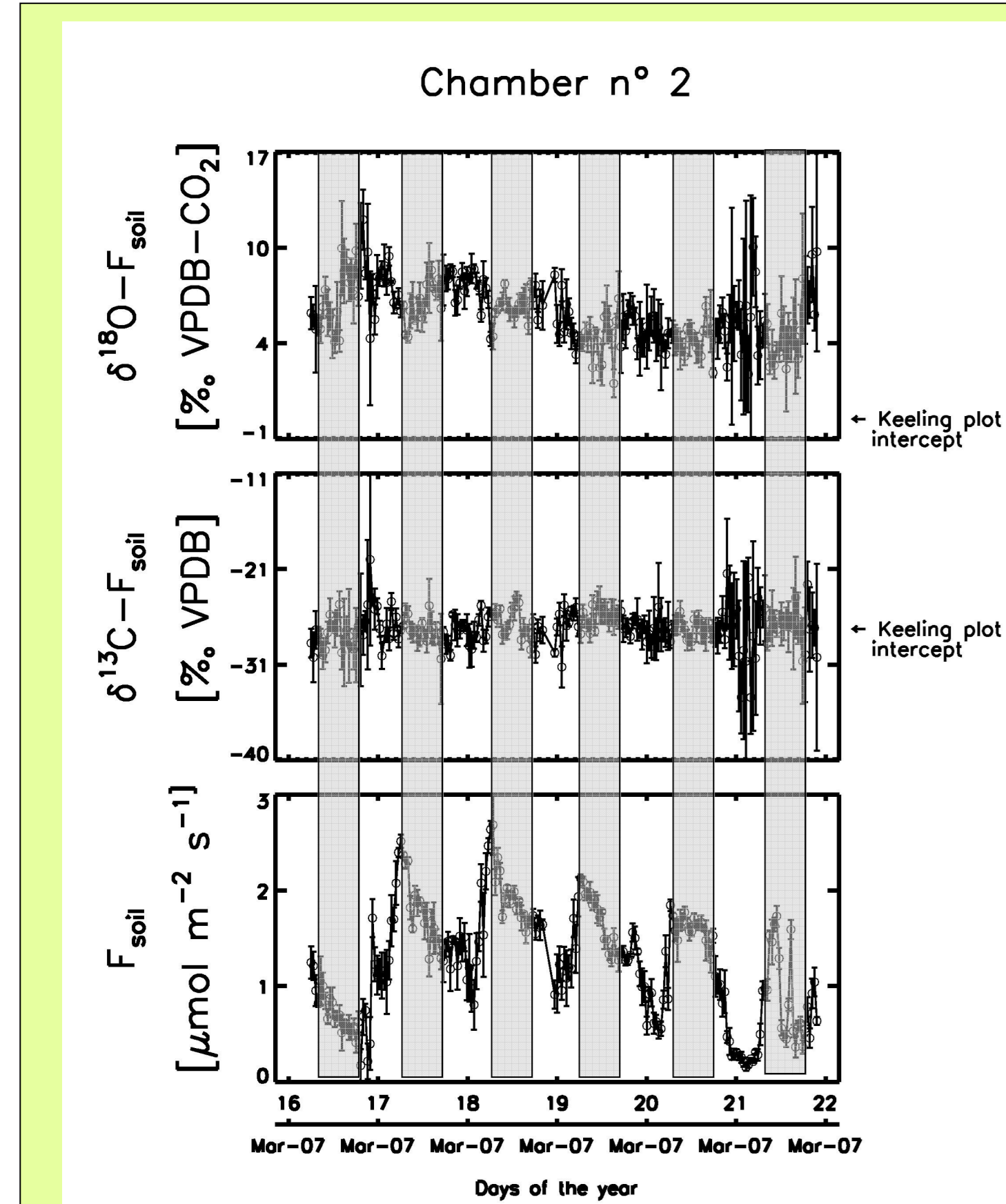


Fig 3: flux de  $\text{CO}_2$  du sol et ses signatures isotopiques (chambre 2).

## III. Résultats (préliminaires)

Des résultats préliminaires de cette expérimentation sont illustrés ci-contre. Le dispositif actuel permet de suivre temporellement la signature isotopique de la respiration du sol (Fig. 3) ainsi que les profils de  $\text{CO}_2$  atmosphérique à différents niveaux (Fig. 4). Le suivi de la discrimination isotopique lors de la photosynthèse débutera début Avril 2007.

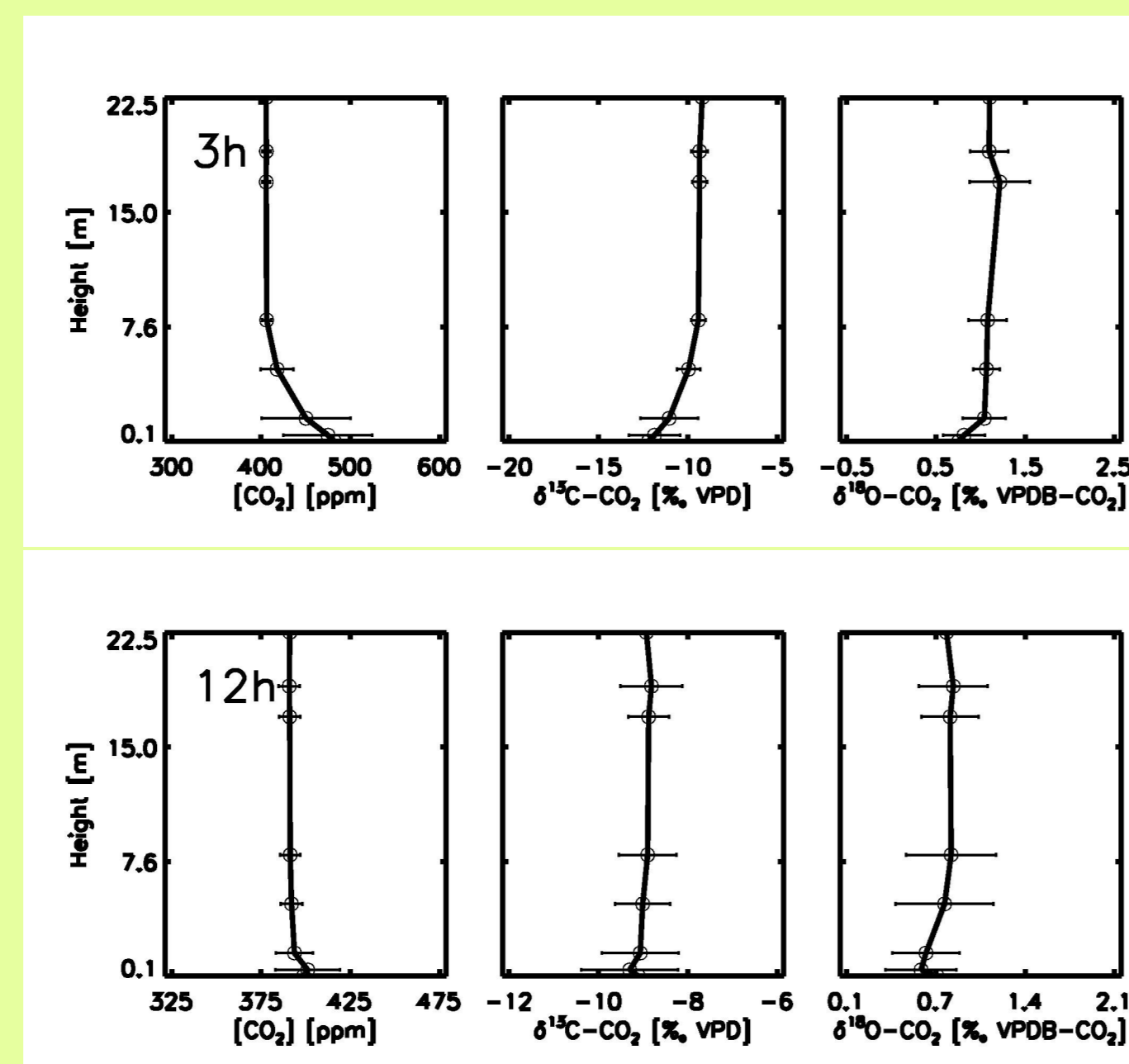


Fig 4: Profil de concentration en  $\text{CO}_2$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{18}\text{O}$  à 3h00 et 12h00

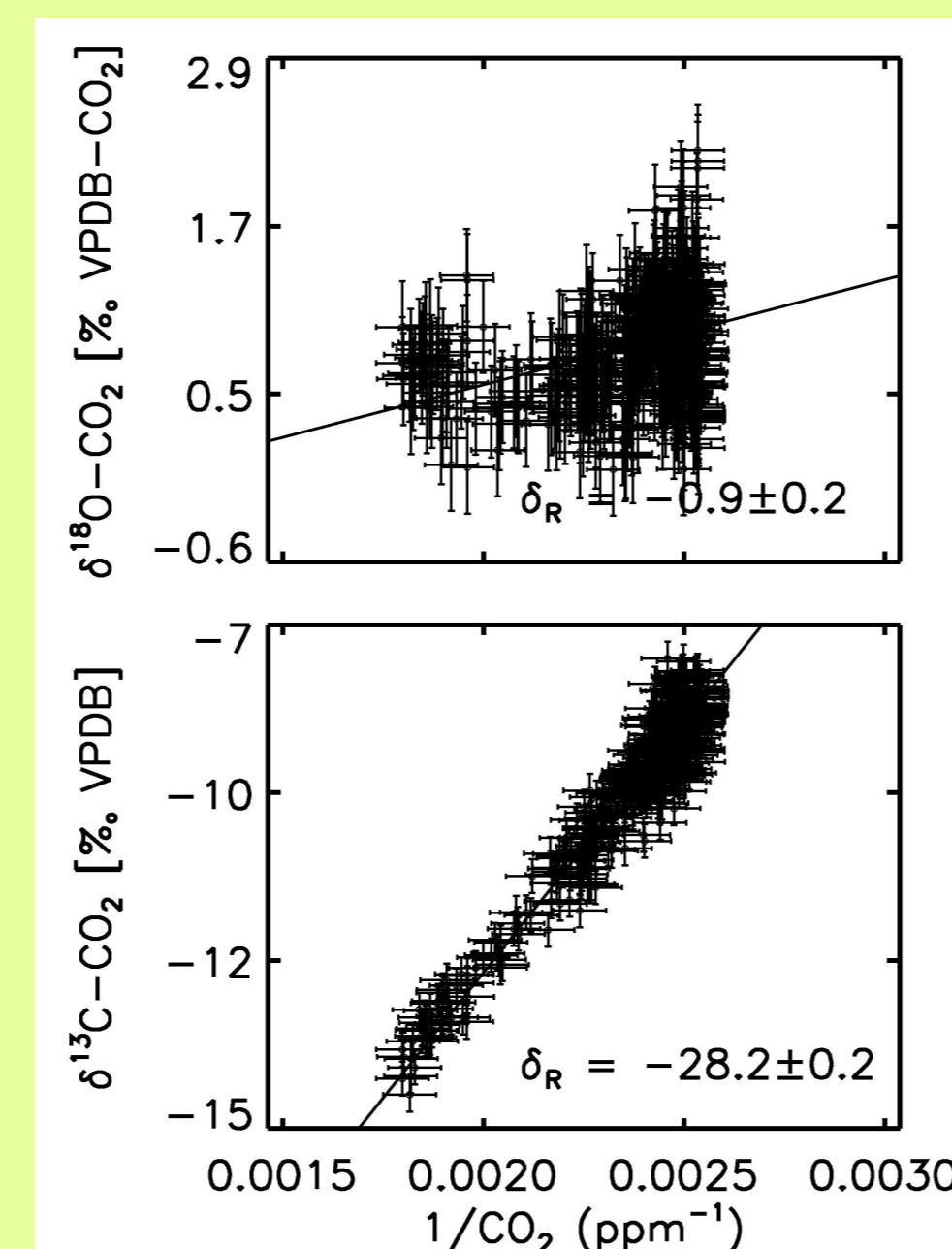


Fig 5: Keeling plot pour  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{18}\text{O}$  (données de nuit)

## IV. Conclusions (préliminaires)

Les premiers résultats semblent montrer que le dispositif proposé est capable de caractériser précisément la dynamique temporelle des signatures isotopiques de la respiration du sol (Fig. 3), ainsi que de la composition isotopique du  $\text{CO}_2$  atmosphérique (Fig. 4). La signature isotopique de la photosynthèse foliaire devrait pouvoir être caractérisée avec une précision comparable.

## II. Matériel et Méthodes

Le dispositif a été installé en Février 2007 pour une année entière (saison de croissance 2007-2008) sur le site CARBOEUROPE du Bray, une plantation de pin maritime (*Pinus Pinaster* Ait.) située dans les Landes de Gascogne. La mesure continue et automatisée de la composition isotopique est assurée par un spectromètre à diode laser modulable (TDL), muni d'un ensemble d'éléments de multiplexage permettant de sélectionner parmi trois types de systèmes de mesure:

- \* des chambres fermées pour la mesure de la photosynthèse foliaire (2 à 4 chambres),
- \* des chambres ouvertes pour les mesures de respiration (5 chambres) et
- \* des accumulations dans l'atmosphère par un profil de 8 hauteurs.

Une phase de test de ce dispositif a permis de vérifier que les matériaux utilisés sont inertes pour les mesures isotopiques et de déterminer que la précision de cet instrument est inférieure à 0.15ppm, 0.15‰ et 0.25‰ pour la concentration en  $\text{CO}_2$  totale, en  $\delta^{13}\text{C}$  et en  $\delta^{18}\text{O}$  respectivement.

## Mesures Complémentaires:

- \* Teneurs isotopiques de l'eau de pluie (mesures mensuelles - réseau GNIP)
- \* Teneurs isotopiques de l'eau des feuilles, branches, sol, et de l'air (mesures mensuelles - réseau MIBA)
- \* Teneurs isotopiques des sucres solubles et amidon (mesures mensuelles)
- \* Mesures micro-météorologiques complètes sur la parcelle (site multi-instrumenté du projet CarboEUROPE-IP)



Fig 2: Photos du dispositif (a) Système d'échantillonnage (b) Branch Bag (c) Chambre de respiration du sol (d) échafaudage pour profil (e) spectromètre à diode laser modulable (Campbell Sci, TGA100A) (f) gaz étalon

Contraintes techniques	Méthodologie mise en œuvre
Mesure en continu et à haute fréquence de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{18}\text{O}$	- Utilisation d'une diode laser modulable (mesure alternée des 3 isotopomères à 10 Hz).
Refroidissement du laser à environ 90K	- Refroidissement avec de l'azote liquide (autonomie 5 à 6 jours).
Stabilité et linéarité des détecteurs et de la source TDL.	- Etalonnage automatisé répété toutes les 8 minutes en 3 (ou 4) points, avec des gaz caractérisés en $[\text{CO}_2]$ , $\delta^{13}\text{C}$ et en $\delta^{18}\text{O}$ , et raccordés aux standards internationaux avec une précision de 0.1 ppm, 0.01‰ et 0.04‰ respectivement. - Courbe d'étalonnage polynomial (degré 2). - Régulation fine de l'émission du laser à l'aide de la mesure continue d'un gaz contenant 25% de $\text{CO}_2$ .
Recouvrement potentiel des raies d'absorption du $\text{CO}_2$ et de $\text{H}_2\text{O}$	- L'air analysé et les gaz étalons doivent être séchés.
Séchage de l'air sans produit chimique (pour éviter le fractionnement isotopique)	- Utilisation de tubes à membranes semi-perméable type Nafion Permapure « counter-flow » dont le gaz sécheur, issu d'un premier Nafion, est obtenu à partir de l'air ambiant, soumis à un vide poussé et un fort débit (d'où une très faible concentration volumique en vapeur d'eau).
Condensation dans les tuyaux	- Circulation en dépression assez forte (vide partiel, obtenu par une pompe à vide primaire). - Chauffage du filtre placé en tête des voies du profil.
Fuites entrantes liées au circuit sous vide	- Utilisation de raccord type double-bague. - Test manuel périodique des vannes et raccords avec du $\text{CO}_2$ pur.
Temps de réponse lors du basculement d'une voie de mesure à une autre.	- Vanne de contrôle de débit du MFC déportée en amont du sécheur Nafion. - Aspiration des voies sous vide (100 mbar avant le MFC et 25 mbar après).

Nous remercions la région Aquitaine et le département EFPA de l'INRA pour le financement de l'achat de la TGA100A, ainsi que S. Sargent, J. Greene, B. Tanner (Campbell Sci) et F. Lagane et M. Irvine (EPHYSE) pour leur aide dans l'installation de ce dispositif.

# SEASONAL DYNAMICS OF THE CARBON ISOTOPE COMPOSITION OF PHLOEM SAP AND CO<sub>2</sub> FLUXES IN A MATURE PINE FOREST

Marion DEVAUX, Didier Bert, Jaleh Ghashghaie, Jérôme Ogée, Lisa Wingate, Alexandre Bosc, Catherine Lambrot, Régis Burelet, Camille Bathellier and Denis Loustau

Contact : INRA, UR1263 Ephyse, F-33140 Villenave d'Ornon, France, marion.devaux@pierroton.inra.fr, +335571122848

## 1. BACKGROUND

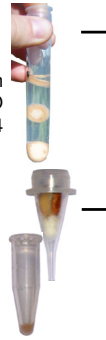
To improve our understanding of carbon isotope discrimination during photosynthesis, respiration and cellulose deposition in adult pine trees, we monitored the concentration and carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of sugars in phloem sap, the fluxes of CO<sub>2</sub> and  $\delta^{13}\text{C}$  from branches and stems and the  $\delta^{13}\text{C}$  of cellulose deposited in the current-year tree ring over the growing season. **Here, we present results on phloem sap sugars and some preliminary stem respired CO<sub>2</sub> and cellulose results.**

## 2. MATERIAL AND METHODS

Field work : Two methods of extraction :

« **exudation** »  
(Rennenberg et al., 1996)  
3 pieces of phloem in 6mL of distilled H<sub>2</sub>O (Gessler et al., 2004) during 4 hours.

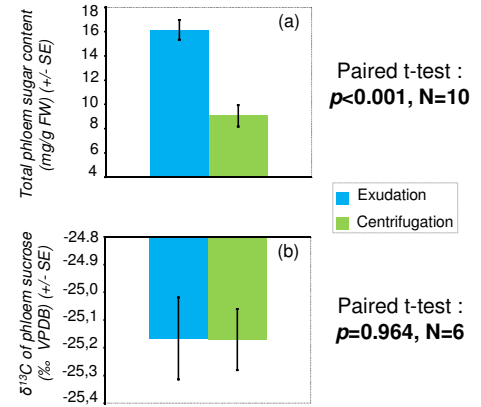
« **centrifugation** »  
3 pieces of phloem centrifuged during 10 min at 14500 rpm.



Two types of analysis:

**Total sugar content** in extracts by their reaction with anthrone using a spectrophotometer. (Fig. 1a)  
(Bachelier et al., 1966)

**Concentration and  $\delta^{13}\text{C}$**  of the main phloem sugars (sucrose, glucose, fructose) and pinitol, a cyclitol using HPLC (PL HiPlex Ca column) and IRMS. (Fig. 1b)



**Exudation resulted in the extraction of twice as many metabolites than centrifugation but the  $\delta^{13}\text{C}$  is preserved.** Potential advantages of the centrifugation method include:

- rapid analysis
- direct extraction of the phloem sap without need for solvent
- sufficient material for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis.

Fig 1 : Comparison of sugar extraction method for (a) total sugar content and (b)  $\delta^{13}\text{C}$  of sucrose

## 3. TEMPORAL DYNAMICS OF TOTAL SUGAR CONTENT

The mean total sugar content of phloem was measured **daily** on 5 dominant pines using the exudation method. (Fig. 2)

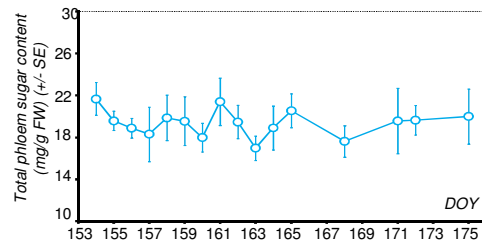


Fig. 2: Daily variation of phloem total sugar content.

The mean total sugar content of phloem was measured **monthly** on 5 to 10 dominant pines using the two extraction methods. (Fig. 3)

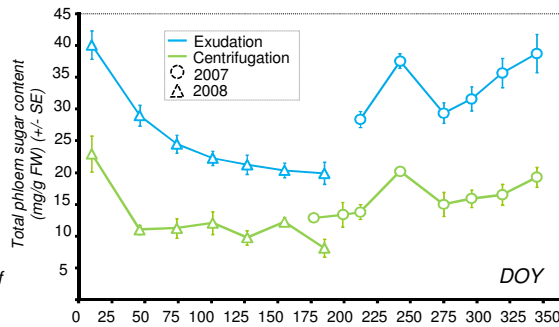


Fig. 3: Seasonal variation of phloem total sugar content.

Using the two methods of sugar extraction, we observed that the relative variation in total phloem sugar content was similar over the growing season (decrease in spring, peak in august, increase in winter). Differences between the two methods were again preserved. Day-to-day variations were more scattered and did not show any clear pattern. Interrogation of this data against environmental drivers and rates of photosynthesis will follow shortly.

## 4. CARBON ISOTOPE COMPOSITION

The carbon isotope composition of the main phloem metabolites: sucrose, glucose, pinitol and fructose found in exudated samples collected from day 177 to 296 in 2007 are shown below. (Fig. 4)

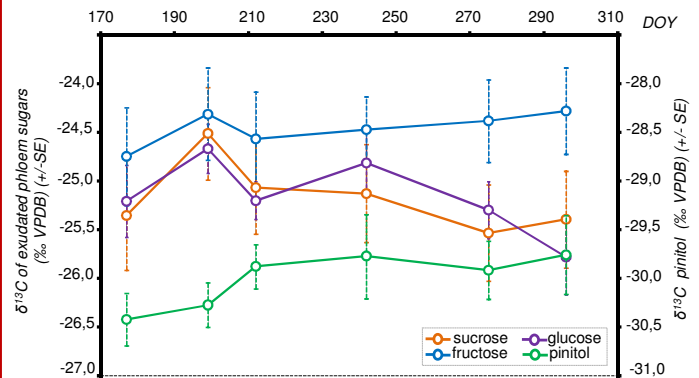


Fig. 4: Temporal dynamics of the  $\delta^{13}\text{C}$  of main phloem metabolites for exudation.

At the beginning of the growing season, the carbon isotope composition of the sugars did not vary significantly. However towards the end of the study period, glucose and sucrose became increasingly depleted. Interestingly, pinitol, a metabolite that usually indicates drought stress, was present in quite large amounts and was typically 6‰ more depleted than the other sugars. Its composition also changed over the growing season, becoming more enriched towards the end.

## 5. PERSPECTIVES

Using the above methods, we will now attempt to link metabolite dynamics with field observations of photosynthetic discrimination and the  $\delta^{13}\text{C}$  of stem respired CO<sub>2</sub> (Fig. 5) measured with a tunable diode laser (TDL). This multi-disciplinary approach will then be used to improve our understanding of high resolution carbon isotope signals in tree-ring cellulose (Fig. 6).

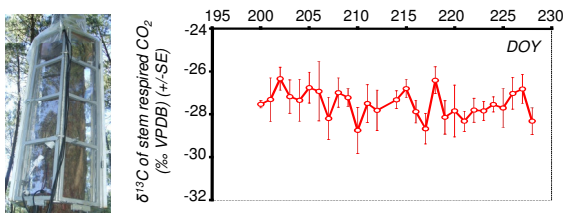


Fig. 5 : Temporal dynamics of the  $\delta^{13}\text{C}$  of stem respired CO<sub>2</sub> measured at breast height in 2008 using a tunable diode laser.

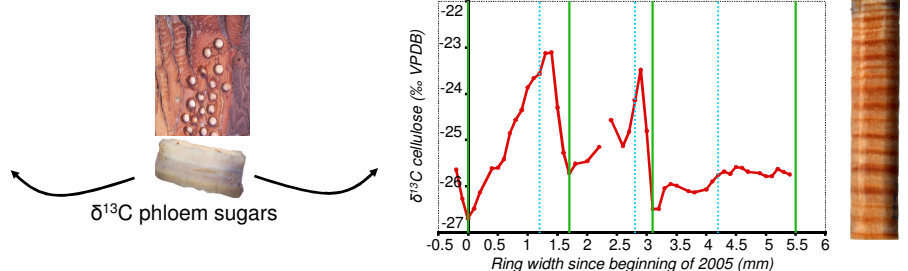


Fig. 6: Carbon isotope variation of cellulose in tree ring.

# Integrated monitoring of Carbon Allocation in Trees and Soil



CATS project in Bordeaux  
EPHYSE-FBET

Masako Dannoura<sup>1,2</sup>, Alexandre Bosc<sup>2</sup>, Pierre Trichet<sup>2</sup>, Christophe Chipeaux<sup>2</sup>, Michel Sartore<sup>2</sup>, Mark Bakker<sup>3,4</sup>, Marion Devaux<sup>2</sup>, Delphine Brazzallo<sup>2</sup>, Daniel Epron<sup>5,6</sup>, and Denis Loustau<sup>2</sup>

1 Kyoto University, Laboratory of Forest Hydrology, Division of Environmental Science and Technology, Graduate School of Agriculture, Kyoto 606-8502, Japan  
2 INRA, UR1263 EPHYSE (Ecologie Fonctionnelle et Physique de l'Environnement, Centre de Pierroton, F-33612 Cestas, France)  
3 Université de Bordeaux, UMR 1220 TCEM, F-33883, France  
4 INRA, UMR 1220 TCEM, F-33883, France  
5 Nancy Université, Université Henri Poincaré, UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Faculté des Sciences, F-54500 Vandoeuvre les Nancy, France  
6 INRA, UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Centre de Nancy, F-54280 Champenoux, France

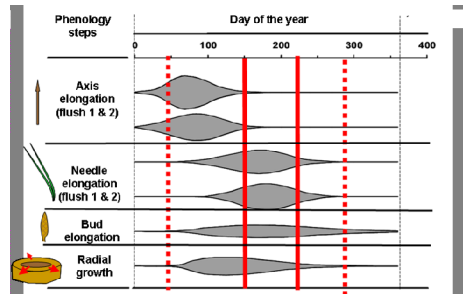
## Aim of this study

to trace the carbon in plant organs, microbial biomass and respiratory fluxes both above and below ground using *in situ* pulse labeling and chase with <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> or temporal fluctuation of natural abundance;

- > to better describe the fractionation during respiration, especially in roots and soil microbes where it has been less described than in leaves or stems, and during diffusion of CO<sub>2</sub>;
- > to determine the timescale of radial distribution of <sup>13</sup>C within a ring and to assess the mobilization of previous year stored carbon for the wood formation.

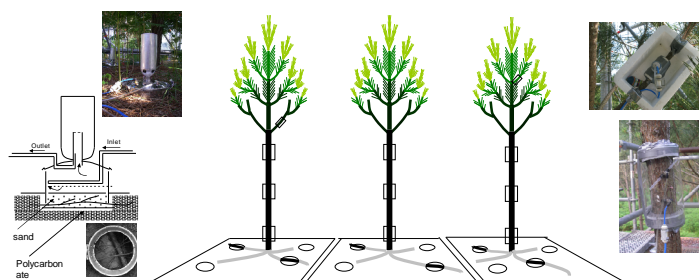
## Design of study

Twelve trees were selected for 4 labelling dates (early summer, late summer, autumn and winter)

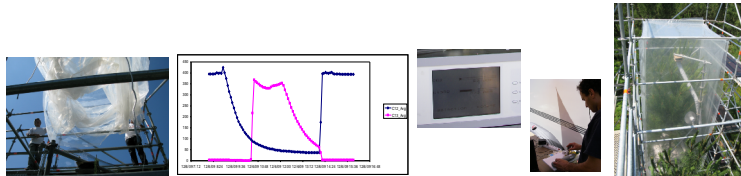


## Site information

domaine de l'hermitage, INRA Pierroton  
10 year old plantation of *Pinus Pinaster*  
Undergrowth; Fern and *Molinia caerulea*  
Lande humide (near water table)  
Podzol soil  
Precipitation; 1000mm/yr  
Annual mean temperature; 12.5



## 1) Technic of labeling



A first pulse labelling with almost pure <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (99%) was conducted in 12<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> June 2009 using a 40 m<sup>3</sup> polyamide chamber which covered the whole tree crown. Air temperature and moisture were monitored and controlled with a cooling device during labelling.

2 trees are labelled and 1 tree is kept as control. A 0.5-0.6m deep trench is dug around each tree, lined with a polyethylene film and filled back. This delineates a 2m x 3m area where all roots and only roots of the labelled trees are present.



Sampling from Needles, Phloem, root, soil are taken 1, 2, 3, 6, 9, 15 and 30 days after labelling. Isotope composition of samples and respired CO<sub>2</sub> from root and soil will be measured with an Isotope Ratio Mass Spectrometer

## 2) TDLS

The TGA100 Trace Gas Analyzer measures trace gas concentration in an air sample using tunable diode laser absorption spectroscopy (TDLAS). This technique provides high sensitivity, speed, and selectivity.

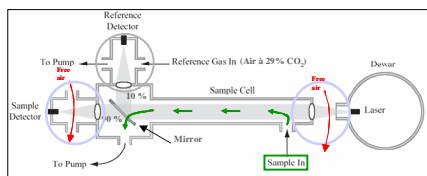
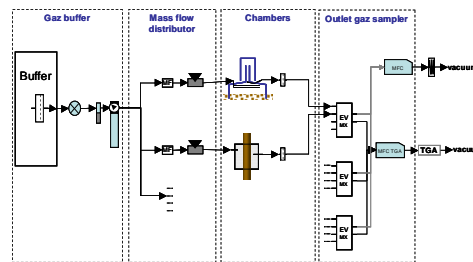
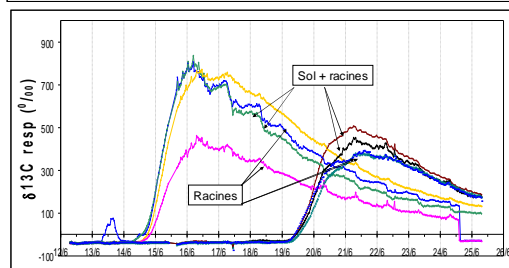
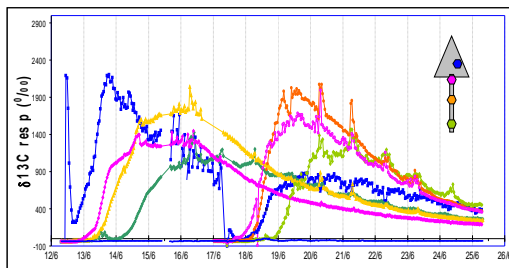


Figure 1 Schematic Diagram of TGA100 Optical System and fluxes

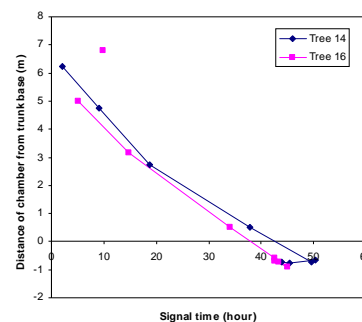
- It can measure three isotopes of CO<sub>2</sub> (<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> and <sup>13</sup>C<sup>18</sup>O<sub>2</sub>) at a 10 Hz rate in line with the accuracy of 0.1 ‰.
- The calibration of this analyzer is inline with 5 calibrated tanks (300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm and 1500 ppm). After all the samples, one calibrated tank is measured. The rate of sample is 1 sample by 60 second.



## Preliminary Results and discussion



The speed of elaborated sap is similar between the 2 trees. 0.15m/hour  
After a rapid increase, the respiration <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> signature decrease slowly showing  
A similar kinetic than in Beech.  
The speed of sap is depends on the fonction of branch position  
The trunc signal is a composition of the signals of all branch.  
+daily signal  
+temperature  
+sap flow contamination effect  
+photosynthesis  
+artificial



The signal arrive 2 days after labeling  
The response of complex of soil and root, and root only chamber shown similar pattern.  
The intensity of the labeling peak of two tree is difference. It is seems depend on the size of tree.  
The daily isotopic signal variation is opposite between soil and root chamber.









