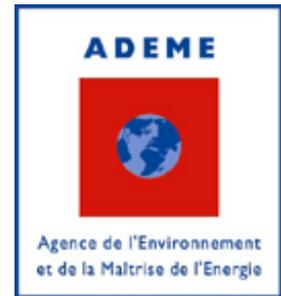




PROGRAMME



LES ARCHIVES PEDOLOGIQUES, UN OUTIL POUR LA GESTION DES ECOSYSTEMES (APOGEE)

NOUVELLES APPROCHES, LIMITES TEMPORELLES ET RESOLUTION ECOSYSTEMIQUE

SOIL ARCHIVES AS A TOOL OF ECOSYSTEM MANAGEMENT

Rapport scientifique final

Dominique Schwartz *coord.*

Université de Strasbourg

LIVE, UMR 7362, 3 rue de l'Argonne, 67083 Strasbourg cedex

dominique.schwartz@live-cnrs.unistra.fr

SOMMAIRE

Participants au programme	5
1. Contexte général	7
2. Objectifs généraux du projet	7
3. Quelques éléments de méthodologie (et éventuelles difficultés rencontrées)	8
4. Résultats obtenus	10
4.1. Approche moléculaire	10
4.1.1. Typification moléculaire d'horizons de sols de surface	10
4.1.2. Typification moléculaire de profils de sols sous différentes couvertures végétales dans le massif vosgien	12
4.1.3. Conclusions partielles	28
4.2. Spectroscopie proche infrarouge	30
4.2.1. Acquisition et prise en main du spectromètre	30
4.2.2. Elargissement du référentiel de surface proche infrarouge	30
4.2.3. Analyse des profils de sol par SPIR	33
4.2.4. Etude des 4 profils de sol (fig. 13).....	34
4.2.5. Spatialisation des résultats : le site de l'Elmerforst	38
4.2.6. L'infrarouge moyen.....	38
5. Réflexions sur les temporalités mises en évidence	39
6. Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation.....	41
7. Partenariats mis en place, projetés, envisagés.....	44
8. Publications dans le cadre du projet	45
Annexes	51

PARTICIPANTS AU PROGRAMME

Laboratoire Image, Ville, Environnement, UMR 7362 CNRS/Université de Strasbourg

D. Schwartz, UdS, Pr. (coordinateur)
D. Ertlen, UdS, MCF
E. Baehrel, UdS, TCE (gestion administrative)
B. Vyslouzilova, doctorante cotutelle UdS/Univ. Prague
L. Froehlicher, UdS stagiaire M1 et M2
J. Bell, stagiaire M1
A. Mocquot, stagiaire M1
J. Wilt, stagiaire M1 et M2

Laboratoire de Biogéochimie Moléculaire, UMR 7177, CNRS/UdS

P. Adam, CNRS, DR,
P. Schaeffer, CNRS, DR
J.M. Trendel, CNRS, IR
E. Motsch, CNRS, IE
C. Bastien, post-doc (1 an)
C. Liaud, stagiaire M2
B. Courel, stagiaire M2

ETH Zürich

S. Bernasconi, Pr. (coord. pour la Suisse)
I. Hajdas, Dr.
M. Girgas, PhD.

Autres participants :

Dr. L. Sefrna, Université Charles (Prague)
M. Trautmann, TCE, Laboratoire des Sols, UMS 730, CNRS Strasbourg

1. CONTEXTE GÉNÉRAL

Parmi les différentes *Fonctions des sols et services rendus à la Société*, la fonction de mémorisation des dynamiques environnementales est sans doute la moins étudiée, et la potentialité des « archives pédologiques » en tant qu'outil d'aide à la gestion des écosystèmes la moins bien connue. Certes, les paléosols et de nombreux constituants du sol sont depuis longtemps utilisés pour les reconstitutions paléoenvironnementales, mais les nouvelles approches conceptuelles, consistant à analyser le sol en tant qu'indicateur du fonctionnement intégré des systèmes écogéographiques, restent marginales malgré le développement généralisé d'outils analytiques de plus en plus performants. Cette thématique est pourtant loin d'être seulement « académique ». La connaissance de leur histoire et des changements qui les ont affectés est indispensable pour mieux connaître le fonctionnement des milieux. C'est donc un outil de gestion, particulièrement précieux lorsqu'il s'agit de milieux fragiles, à fort intérêt patrimonial ou écologique. Les archives pédologiques ont de ce point de vue un potentiel encore mal connu, et donc sous-évalué.

2. OBJECTIFS GÉNÉRAUX DU PROJET

L'objectif général d'APOGEE est de contribuer de façon significative au développement des de l'utilisation des sols en tant qu'**outil d'aide à la gestion écosystémique**, en participant à l'amélioration de la connaissance des potentialités et des conditions d'utilisation des archives pédologiques.

Dans ce cadre, nous nous sommes focalisé sur les matières organiques des sols (MOS). En effet, celles-ci sont des constituants abondants dans les sols, relativement faciles à extraire et analyser. Elles sont majoritairement d'origine végétale, et bon nombre d'entre elles ont une signature spécifique des végétaux dont elles dérivent. Cette signature peut se conserver malgré les transformations qui ont eu lieu lors de l'humification. L'espérance de vie des MOS est variable, selon leur nature biochimique, les conditions édaphiques (pH, activité biologique, composition granulométrique,...) et climatiques. Cependant, bon nombre d'entre elles ont une espérance de vie plurimillénaire dans les sols. L'ensemble de ces caractéristiques fait qu'elles permettent donc d'aborder directement la composition et la dynamique des formations végétales qui se sont succédé au cours du temps sur un sol. Leur étude permet d'aborder de façon très synthétique la dynamique environnementale d'un écosystème donné. En effet :

- les changements de composition végétale d'un écosystème sont un indice fort de changements environnementaux, naturels (variations climatiques) ou anthropiques (modes d'utilisation du milieu) ; il est ainsi possible de remonter aux processus qui sont directement à l'origine de ces changements (par exemple défrichements liés à une expansion démographique, ou colonisations forestières liées à une déprise agricole) ;

- les changements de végétation sont à leur tour susceptibles d'induire des changements de fonctionnement du milieu (phases d'érosion par exemple), avec des conséquences sur son évolution à long terme.

Pour mener à bien cet objectif, nous avons cherché à identifier des compartiments et constituants des MOS particulièrement intéressants en termes de potentiel d'archivage. Dans un premier temps, nous avons étudié leur répartition au sein des profils pédologiques : sont-ils répartis sur toute l'épaisseur du profil ou préférentiellement en profondeur ? De la réponse à cette question peut en effet dépendre l'élaboration de protocoles d'échantillonnage et de production de données plus généralisés, notamment lorsqu'il s'agira de passer à une phase d'application à la gestion des écosystèmes. Nous avons également cherché à identifier les échelles temporelles auxquelles peuvent être utilisés les marqueurs étudiés, échelles qui sont fonction de leur plus ou moins grande stabilité. Nous avons enfin cherché à évaluer le degré de résolution écosystémique des méthodes employées : peut-on simplement distinguer de grandes catégories, telles que prairies et forêts, ou bien arrive-t-on à un niveau supérieur (par exemple, la distinction forêt de feuillus, forêt mixte, forêts de résineux), voire à une résolution bien plus importante (chênaie, charmaie, hêtraie,...).

L'étude s'est fondée sur trois approches méthodologiques innovantes développées dans le point ci-dessous.

3. QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)

Notre étude du potentiel d'archivage écosystémique des matières organiques de sols s'est appuyée sur 3 approches différentes.

A. La spectroscopie proche infrarouge qualitative est une toute nouvelle méthode, mise au point en 2009 (Ertlen *et al.*, 2010), qui consiste à associer la signature spectrale d'un échantillon à la végétation qui a donné naissance aux MOS. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer d'une base de données d'échantillons de référence. Ces échantillons sont pour l'essentiel des horizons de surface de sols, échantillonnés sous des couvertures végétales dont la stabilité a pu être vérifiée pour au moins 100-150 ans (soit environ 3 fois le temps moyen de résidence des MOS \approx 50 ans en milieu tempéré), afin de disposer d'un signal « pur ». S'il a été relativement facile de trouver des échantillons de prairies ou de forêts répondant à ces critères, il a été en revanche impossible de procéder de la même manière pour les sols cultivés, d'où la nécessité, pour ce dernier type d'occupation de sols, d'utiliser une approche indirecte (voir chapitre « résultats »). Les échantillons « inconnus » de profils complets de sols sont ensuite comparés à ce référentiel par des analyses statistiques, de manière à identifier le couvert végétal représenté majoritairement ou exclusivement dans les MOS d'un niveau donné.

B. Les biomarqueurs moléculaires lipidiques sont nombreux dans les matières organiques des sols. Ils représentent généralement moins de 10 % de la masse des MOS et sont très variés en terme de constituants chimiques. Ils sont en général considérés comme faisant partie des matières organiques relativement stables. L'objectif de leur étude est double. D'une part, l'analyse de leur distribution fournit une "empreinte digitale" spécifique des différents apports organiques issus de la couverture végétale. Si de nombreux marqueurs sont peu spécifiques d'une essence végétale donnée, d'autres sont en revanche utilisés en tant que marqueurs chimiotaxonomiques. Par ailleurs, la distribution de certaines classes de composés majeurs (série des hydrocarbures linéaires, n-alcools, n-acides, etc) apparaît comme discriminante et la prédominance systématique d'un homologue donné en fonction de l'essence principale de la couverture végétale, permet, sur la base de ces distributions, de distinguer les sols de végétations telles que les prairies, chênaies ou hêtraies, etc (Trendel et al., 2010). D'un point de vue pratique, le protocole d'étude passe par l'extraction et la purification par chromatographie liquide des constituants lipidiques des sols, puis par leur analyse et identification par des techniques de chromatographie gazeuse (CG) et CG couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Notons que si l'analyse des biomarqueurs lipidiques est largement développée dans le cas des sédiments et paléosols, elle l'est nettement moins dans celui des sols fonctionnels.

C. Les temporalités ont été abordées via une méthode de datation ^{14}C novatrice. La collaboration instituée dans le cadre de ce programme avec l'ETH de Zurich (voir p.43) nous a donné accès à l'un des deux spectromètres de masse par accélération (AMS) existant actuellement au monde capable de dater des quantités de carbone de l'ordre de 10-15 microgrammes. Pour rappel, la méthode « historique » (comptage des désintégrations) mise au point par Libby dans les années 1950 permettait de dater des objets sur la base d'environ 1 à 5 g de carbone. Dans les années 1980, l'apparition des spectromètres de masse AMS a permis de développer des méthodes de datation, par séparation des atomes de ^{14}C présents, sur des quantités de l'ordre de 1 à 10 milligrammes. Le saut technologique représenté par les accélérateurs de dernière génération permet de diviser pratiquement d'un facteur 100 à 1000 les quantités nécessaires pour la datation par AMS classique. Ceci permet désormais de déterminer l'âge moyen (^{14}C) de « molécules individuelles ». L'utilisation de cette technique de pointe était presque inédite à ce jour pour les sols. Il convient de donner ici une précision importante. Par « molécule individuelle », nous désignons non pas une molécule prise en tant qu'individu, mais un type de molécules précis, identifié par sa structure moléculaire après extraction et purification. Les molécules qui composent l'extrait peuvent être hétérochrones. Tout comme pour la MOS totale, la mesure d'âge donne donc un temps moyen de résidence dans le sol et non pas un âge absolu.

Dans le programme initial, il était prévu qu'en plus de l'étude du sol brut, nous procéderions à celle de fractions particulières du sol, pour isoler des fractions particulièrement stables de matières organiques : cutanes, agrégats stables de la taille des limons, matière organique très fortement liée aux argiles. Ces approches n'ont pu être effectuées, car nous avons sous-estimé, sur un programme d'une durée de 2 ans seulement, le temps nécessaire pour rendre opérationnel le matériel nouvellement acquis (spectromètre proche-infrarouge), le temps passé à la mise au point de certains protocoles d'analyses

biogéochimiques sur les sols et les contraintes pédologiques telles que les quantités de carbone disponibles dans les horizons profonds de sol. Ces approches seront développées ultérieurement, soit dans un futur appel d'offre de GESSOL, soit dans un autre cadre (ANR).

En revanche, des opérations non programmées au départ ont été menées à bien, soit à titre de test, soit parce qu'elles se sont avérées indispensables dans une perspective de progression scientifique sur le moyen terme :

- extension indispensable du référentiel de spectroscopie proche-infrarouge aux sols cultivés
- premiers tests de validation de ce nouveau référentiel dans un sol actuellement forestier (sur un des sites prévus dans le programme initial)
- essai d'identification des charbons de bois des sols en spectroscopie moyen-infrarouge (test)
- utilisation de la NIRS sur des chernozems en contexte naturel, archéologique et cultivé (test).

4. RÉSULTATS OBTENUS

4.1 APPROCHE MOLECULAIRE

4.1.1. TYPIFICATION MOLECULAIRE D'HORIZONS DE SOLS DE SURFACE

Les lipides de végétaux ont montré leur potentiel en tant qu'outils chimiotaxonomiques, et l'étude de leurs distributions dans la matière organique sédimentaire récente ou ancienne a notamment permis à ce jour de déterminer, par exemple, la nature des principaux apports végétaux dans des sédiments anciens, les changements de végétations en relation avec les variations climatiques ou environnementales, ou encore la nature de pratiques agricoles passées.

Dans le cadre de travaux préliminaires au programme GESSOL-APOGEE, visant, à terme, à identifier la nature des paléovégétations et leur évolution à une échelle locale (liée aux influences anthropiques, entre autres), nous avons effectué l'étude moléculaire de sols de surface de 13 échantillons localisés dans les Vosges et d'un échantillon de sol de la République Tchèque, sols recouverts d'une végétation stable pendant une période d'au moins 150 ans, afin d'établir un référentiel de sols (Trendel et al., 2010). Les principales caractéristiques de ces horizons de sol superficiel sont reportées dans le tableau 1.

Tableau 1: Description des échantillons de sols de surface utilisés comme référentiel

Echantillons	Végétation	Type de sol	COT	pH	EOT ^c
RCA ^a	prairie (pâture)	cambisol	16.8	4.20	8.6
CFA	prairie (pâture)	cambisol	19.9	4.00	12.1
RCB	prairie (pâture)	cambisol	16.6	4.35	10.6
FAC	prairie	umbrisol	31.3	3.70	14.2
KAC	prairie	umbrisol	20.4	3.91	11.0
KAT	prairie	umbrisol	31.4	3.96	11.5
THA ^a	hêtre	cambisol	21.4	3.62	9.5
WHS	hêtre/sapin	entic podzol	4.5	3.70	3.5
THB	hêtre/sapin	cambisol	13.3	3.96	4.1
DHS ^a	hêtre/sapin	cambisol	20.0	3.54	15.6
SLF ^b	hêtre/sapin	cambisol	6.4	4.36	2.3
RTH	mixte (hêtre/sapin/autres)	leptosol	50.3	3.68	30.8
EFA ^a	chêne	cambisol	4.3	5.01	2.2
BLH	chêne/sapin	cambisol	12.1	4.45	7.8

^aChromatogrammes en phase gazeuse de l'extrait lipidique représentés sur la Fig. 1; ^bEchantillon de la République Tchèque; ^ccarbone organique total; ^dextrait organique total, en mg/g de sol sec.

Après extraction des sols aux solvants organiques, les extraits lipidiques ainsi obtenus ont été analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Des chromatogrammes en phase gazeuse caractéristiques des principales couvertures végétales sont représentés sur la figure 1.

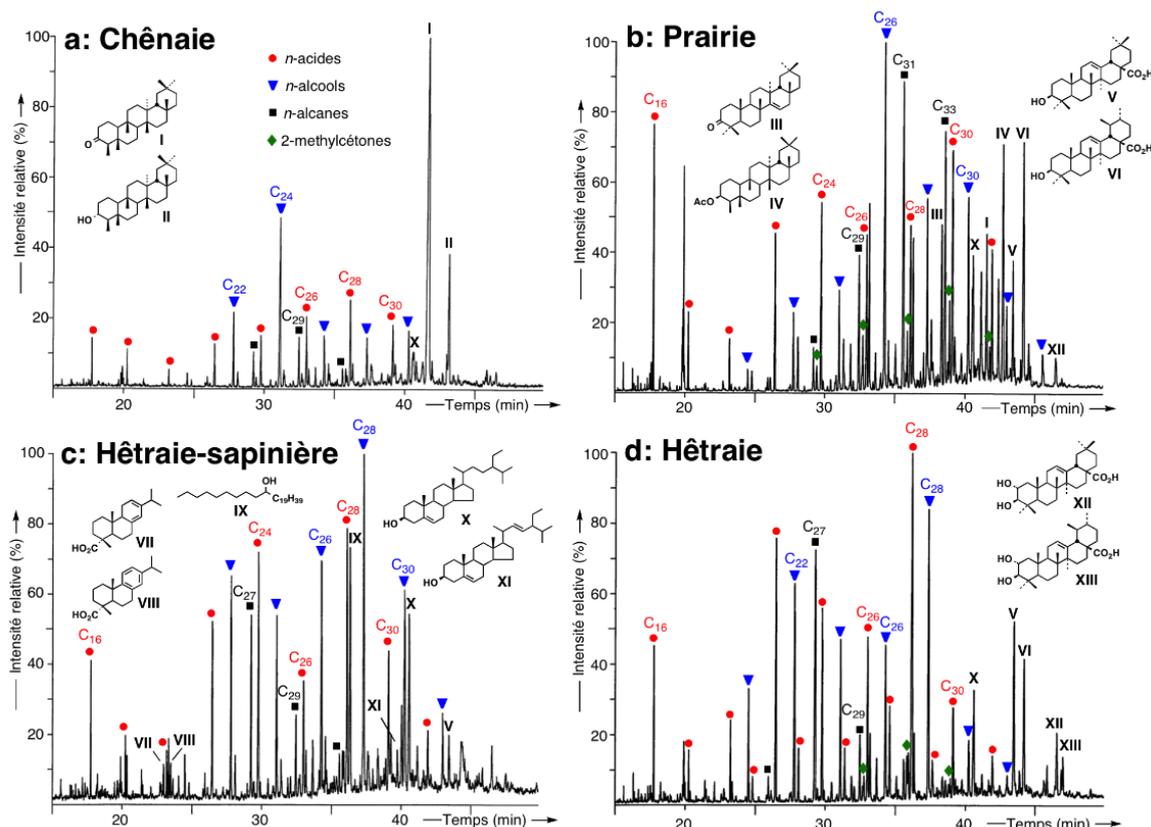


Figure 1: Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits organiques totaux d'horizons de sols superficiels sous différentes couvertures végétales. a: sol sous chênaie; b: sol sous prairie; c: sol sous hêtraie-sapinière; d: sol sous hêtraie pure. Les composés sont analysés sous la forme d'acétates et d'esters méthyliques.

Ainsi, l'analyse des constituants moléculaires a clairement montré qu'une discrimination entre les différentes sources/couvertures végétales est possible sur la base de critères moléculaires. Cette discrimination transparait non seulement suite à la présence de certains marqueurs moléculaires chimiotaxonomiques (i.e., spécifiques d'une source végétale donnée), mais aussi au travers des distributions de certaines familles de composés aliphatiques (composés majeurs des extraits lipidiques, en général), issus des cires cuticulaires présentes chez les végétaux. Ainsi, l'alcool linéaire en C₂₆ domine systématiquement la distribution des *n*-alcools dans le cas de prairies (Fig. 1b), alors que celui en C₂₈ est majeur dans les hêtraies (Fig. 1 d), et celui en C₂₄ dans les chênaies (Fig. 1a). Les différents aspects concernant les profils lipidiques dans les horizons de sols de surface sont discutés en détail dans l'article de Trendel et al. (2010).

4.1.2. TYPIFICATION MOLECULAIRE DE PROFILS DE SOLS SOUS DIFFERENTES COUVERTURES VEGETALES DANS LE MASSIF VOSGIEN

Faisant suite à l'établissement de ce référentiel de sols de surface, notre étude s'est logiquement poursuivie par l'étude moléculaire d'une série de quatre profils de sols dont l'évolution au cours du temps est bien documentée sur une période de plusieurs dizaines à centaines d'années. Un descriptif des principales caractéristiques de ces profils de sol est reporté dans le tableau 2.

Tableau 2: Principales caractéristiques des quatre profils de sol étudiés. *EFE: Elmerforst; FAL: Falimont; VFJ: Weigscheid; SJK: Salajka.*

Echantillons	Altitude (m)	Type de sol	Profondeur (cm)	COT % ^a	pH	Végétation actuelle
EFE 1	600	cambisol	0-4	3,3	5,01	Chênaie-hêtraie
EFE 2	600	cambisol	10-20	1,3	-	—
EFE 3	600	cambisol	25-35	1,0	4,18	—
EFE 4	600	cambisol	45-60	0,3	4,29	—
FAL 1	1270	umbrisol	0-10	23,5	3,59	Prairie
FAL 2	1270	umbrisol	20-30	5,8	3,5	—
FAL 3	1270	umbrisol	40-50	2,2	4,3	—
FAL 4	1270	umbrisol	50-60	0,4	4,2	—
VFJ 1	1020	cambisol	5-15	4,5	-	Hêtraie-sapinière
VFJ 2	1020	cambisol	15-25	2,2	-	—
VFJ 3	1020	cambisol	25-35	1,5	-	—
VFJ 5	1020	cambisol	45-60	1,0	-	—
SJK 1	780	alocrisol	0-10	6,6	4,28	Hêtraie-sapinière
SJK 2	780	alocrisol	25-40	1,2	4,97	—
SJK 3	780	alocrisol	55-70	0,6	5,06	—
SJK 4	780	alocrisol	90-110	0,4	5,06	—

^a: carbone organique total

LE PROFIL DE SOL DE LA FORET DE L'ELMERFORST (EFE1-EFE4)

L'étude des extraits lipidiques d'une série de 4 échantillons (EFE 1 à EFE 4) prélevés au long d'un premier profil de sol (profondeur totale de 60 cm) situé dans la forêt de l'Elmerforst (Alsace) –sol qui semble avoir été sous forêt en permanence depuis le XIII^{ème} siècle et actuellement sous chênaie-hêtraie- montre des profils moléculaires très similaires (Fig. 2a-d).

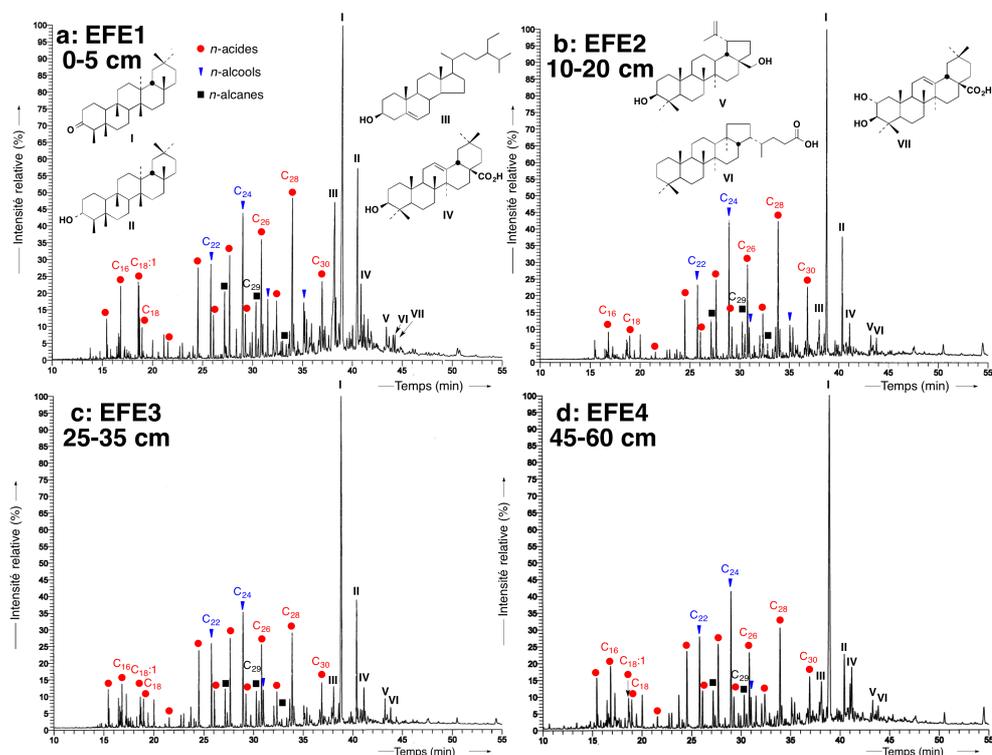


Figure 2: Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits des quatre échantillons du profil de sol de la forêt de l'Elmerforst. a: échantillon EFE 1; b: échantillon EFE 2; c: échantillon EFE 3; d: échantillon EFE 4. Les composés sont analysés sous la forme d'acétates et d'esters méthyliques.

A première vue, cette remarquable similitude entre les échantillons pourrait être cohérente avec l'hypothèse d'une excellente préservation de la m.o. tout au long du profil de sol, celle-ci étant issue d'une couverture végétale n'ayant en effet que peu évolué au cours du temps. Dans cette distribution peut notamment être remarquée la présence du composé majeur I, que nous avons identifié comme étant de la friedeline (Fig. 2). La contribution de ce triterpène dans de telles proportions, notamment dans les horizons profonds, nous a semblé intrigante, et nous avons tenté d'en déterminer la source. Nous avons ainsi ciblé les principales essences végétales vraisemblablement à l'origine de la m.o. des sols, à savoir le chêne et le hêtre, et avons étudié la composition lipidique des différents compartiments de ceux-ci (feuilles, bois, écorce, racines) susceptibles de contribuer à la m.o. de ces sols.

Ainsi, nous avons pu déterminer que le hêtre ne produit pas, quel que soit le compartiment considéré, de friedeline (voir Fig. 3c,d et le rapport de stage de M^{lle} Liaud en annexe 3). En revanche, le chêne, bien que totalement dépourvu de friedeline en ce qui concerne les feuilles (Fig. 3b) et le bois - cf. Fig. 7 dans Schnell et al. (2014) - contient bien ce composé en tant que triterpénoïde majeur au niveau de l'écorce, mais aussi des racines (composé 5 sur la Fig. 3a). Ainsi, il apparaît que d'autres sources que les feuilles de la litière

végétale contribuent de manière prépondérante aux lipides identifiés dans ce profil de sol, notamment dans les horizons profonds. Il pourrait entre autres s'agir des racines (bien que les échantillons de sol aient été tamisés et triés avant extraction des lipides), qui pourraient relarguer des composés (lipides, dont triterpénoïdes, notamment) en profondeur (exsudats racinaires).

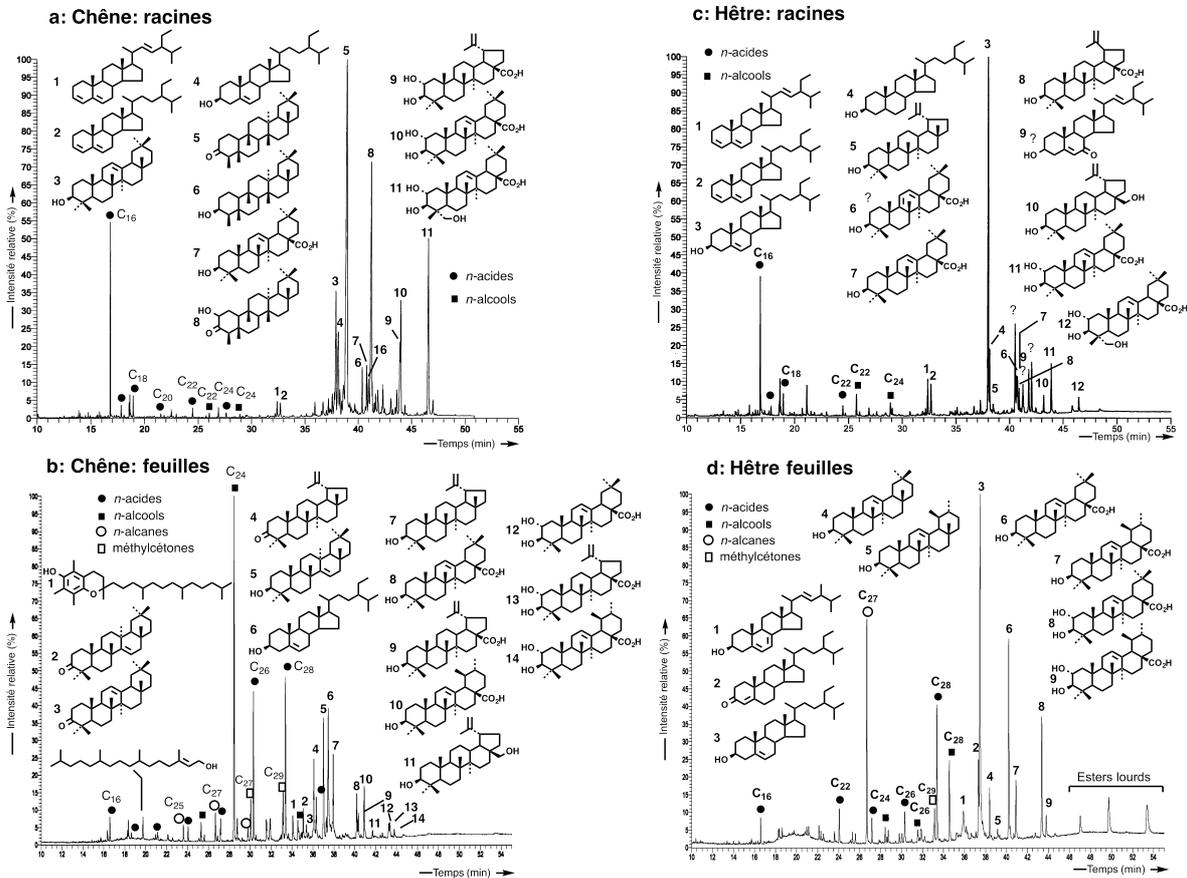


Figure 3 : Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques d'un échantillon de : a) Racine de chêne (*Quercus petraea*); b) feuilles de chêne (*Q. petraea*); c) racines de hêtre (*Fagus sylvatica*); d) feuilles de hêtre (*F. sylvatica*). Les composés sont analysés sous la forme d'acétates et d'esters méthyliques.

Pour tenter de trancher entre la possibilité de lipides originels stables et bien préservés en profondeur dans ce profil de sol, et celle de lipides ayant pour l'essentiel une origine récente (apports racinaires, m.o. de surface entraînée par bioturbation et lessivage, ...), nous avons fait appel à une technique permettant de déterminer l'âge moyen/temps moyen de résidence -TMR- (datation au ¹⁴C) de molécules individuelles par spectrométrie de masse par accélération à l'aide d'un équipement de type AMS "MICADAS" équipé d'un réacteur spécial "petit volume" (ETH-Zürich; Synal et al., 2007; Ruff et al., 2007; Mollenhauer and Rethemeyer, 2009). Il convient toutefois de noter ici que l'isolement de composés individuels à partir de mélanges complexes tels que ceux représentés dans le cas des fractions lipidiques de sols, où co-existent des centaines de composés, représente un "challenge" analytique, et est très chronophage (voir les deux rapports des stagiaire de master 2 fournis en annexe). Ainsi, après extraction d'une quantité importante de sol, sachant que l'extrait lipidique récupéré ne représente généralement qu'entre 1 et 5 % du carbone organique total (COT) d'un sol (Tableau 3), il s'agit de mettre en oeuvre plusieurs étapes de purification

chromatographiques de l'extrait lipidique ainsi obtenu, étapes qui comprennent de la chromatographie liquide sur colonne de silice, de la chromatographie sur couche mince, puis de la chromatographie liquide haute performance sur phase inverse. A titre d'exemple, l'extraction de 1,5 kilogrammes de l'échantillon (sec) EFE 4 (COT: 0,3 %) a conduit à l'obtention d'environ 200 milligrammes d'extrait lipidique, soit un rendement d'extraction d'environ 43 mg/g de COT (Tableau 3). A notre connaissance, si la datation de composés individuels à partir de matière organique de sols a déjà été reportée par quelques rares auteurs (e.g., Mendez-Millan et al., 2014), il s'agit dans l'ensemble d'horizons de surface, dans lesquels la teneur en matière organique est la plus élevée. Par ailleurs, en ce qui concerne des échantillons de sols profonds, le TMR de fractions chromatographiques comme celles des n-alcane a été étudié par quelques auteurs (e.g., Lichtfouse et al., 1995; Huang et al., 1996). En revanche, à notre connaissance, il n'existe que très peu d'exemples - un seul? - (Rethemeyer et al., 2005) pour lesquels le TMR de composés individuels (acides gras issus de phospholipides bactériens, en l'occurrence) a été déterminé dans des horizons de sols profonds, et ce en relation avec des problématiques d'utilisation de sources de carbone fossile par les microorganismes des sols. Notre étude représente à cet égard une première dans le domaine des sciences du sol.

Tableau 3: Quantités d'échantillons de sol (sec) et rendements en extraits lipidiques dans les différents échantillons des quatre profils de sols étudiés. *EFE: Elmerforst; FAL: Falimont; VFJ: Weigscheid; SJK: Salajka.*

	COT ^b %	Masse initiale sol sec (g)	EOT ^c (mg)	EOT ^c (mg/g sol sec)	EOT ^c (mg/g C)
EFE1 0-4 cm	3,3	1300	1000	0,77	23,33
EFE2 10-20 cm	1,3	2000	880	0,44	33,85
EFE3 25-35 cm	1,0	1800	600	0,33	33,00
EFE4 45-60 cm	0,3	1500	200	0,13	43,33
FAL1 0-10 cm	23,5	344	3000	8,72	37,11
FAL2 20-30 cm	5,8	1000	883	0,88	15,17
FAL3 40-50 cm	2,2	1800	276	0,15	6,82
FAL4 50-60 cm	0,4	2190	53	0,02	5,00
VJF1 05-15 cm	4,5	640	820	1,28	28,44
VJF2 15-25 cm	2,2	870	557	0,64	29,09
VJF3 25-35 cm	1,5	690	120	0,17	11,33
VJF5 45-60 cm	1,0	800	30	0,04	4,00
SJK1 0-10 cm	6,6	274	650	2,37	35,91
SJK1 0-10 cm^a	6,6	40	140	3,50	53,03
SJK2 25-40 cm^a	1,2	37	7	0,19	15,83
SJK3 55-70 cm	0,6	700	26	0,04	6,67
SJK3 55-70 cm^a	0,6	36	6	0,17	28,33
SJK4 90-110 cm^a	0,4	40	4	0,10	25,00

^a Extractions effectuées à partir d'échantillons de sol broyé et tamisé; ^b Carbone organique total; ^c Extrait organique total.

Après les fractionnements chromatographiques liés à la purification des différents composés ciblés, il nous a ainsi été possible d'obtenir environ 1 mg du composé majeur (la friedeline) avec une pureté > 95% à partir de l'échantillon de surface (EFE1) et de l'échantillon le plus profond (EFE4). Quant aux autres composés ciblés pour datation (voir ci-après), ceux-ci étant moins abondants dans le mélange lipidique, ils ont pu être isolés avec une pureté > 95 % dans des quantités généralement inférieures à 500 µg. Le détail des étapes de purification et d'isolement de lipides individuels à partir des échantillons de l'Elmerforst peut être retrouvé en annexe, dans le rapport de stage de master M2 de M^{lle} Céline Liaud.

Le choix concernant les composés individuels à dater s'est porté sur la friedeline I (composé majeur des extraits lipidiques des sols et inféodé à la présence de chêne) et le *n*-heptacosane - *n*-alcane en C₂₇, qui est un hydrocarbure majeur dans les feuilles de hêtre et, dans une moindre mesure, de chêne, et qui possède en principe une grande stabilité chimique. Ainsi, la datation par AMS (Tableau 4) de la friedeline isolée à partir de l'échantillon de surface (EFE1) et de l'échantillon le plus profond (EFE4) fournit sans ambiguïté et dans les deux cas des valeurs modernes (post-bombe, > 1950). De même, les datations obtenues pour l'heptacosane isolé des 4 échantillons du profil de sol présentent des signatures résolument modernes. Ces résultats préliminaires indiquent que la signature lipidique observée dans ce sol caractérise essentiellement la contribution d'une matière organique récente, celle-ci étant à la fois constituée d'apports (exsudats) d'origine racinaire et/ou écorce de chêne (friedeline) et foliaire (*n*-C₂₇ alcane). Ces résultats ont par ailleurs été complétés par la datation (¹⁴C) du *n*-alcool en C₂₄, constituant lipidique majeur des feuilles de chêne (Fig. 3b). Ce composé a été isolé du sol de surface (EFE1) et du sol EFE3, et fournit, lui-aussi, des âges modernes dans les deux cas. Enfin, un dernier composé, le diploptène, provenant soit d'une source végétale (fougères), soit d'une source bactérienne, indique à nouveau que ce composé possède un âge moderne, que ce soit en surface ou en profondeur.

Ces résultats, basés sur la datation de composés individuels, sont par ailleurs en accord avec les valeurs de datation de l'extrait lipidique total des échantillons EFE1 et EFE4 (Tableau 4), qui sont également d'âge moderne. En revanche, ces valeurs modernes sont en opposition avec celles obtenues concernant la datation de la m.o. totale qui indiquent un âge croissant progressivement avec la profondeur, pour atteindre une valeur de 200 ans BP à 25-35 cm et 2005 ans BP dans l'échantillon le plus profond (Tableau 4).

Tableau 4: Teneur en carbone organique, temps moyen de résidence F¹⁴C et âge ¹⁴C (BP) de fractions organiques et de biomarqueurs isolés d'échantillons provenant du profil de sol de l'Elmerforst (EFE).

		C _{org} (%)	MOT ^a	Sol - EOT	EOT ^b	<i>n</i> -alcanes	<i>n</i> -C ₂₇ alcane	<i>n</i> -C ₂₄ alcool	Friedeline	Diploptène	
E L M E R F O R S T	EFE 1 0-4 cm	3.3	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %) ¹⁴ C age BP ^d (±yrs)	— -510 (30)	1.078 (0.4) -602 (32)	1.090 (0.5) -690 (33)	0.95 (1.1) 447 (89)	1.09 (0.95) -660 (76)	1.122 (0.4) -925 (32)	1.15 (1.03) -1127 (83)	1.07 (1.55) -534 (124)
	EFE 2 10-20 cm	1.3	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %) ¹⁴ C age BP ^d (±yrs)	— -305 (25)	1.024 (0.5) -192 (41)	1.062 (0.4) -480 (34)	n.d. n.d.	1.15 (0.95) -1108 (77)	n.d.	n.d.	
	EFE 3 25-35 cm	1.0	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %) ¹⁴ C age BP ^d (±yrs)	— 200 (30)	1.018 (0.4) -143 (33)	1.034 (0.4) -269 (35)	n.d.	1.13 (1.15) -963 (92)	1.10 (0.6) -762 (44)	n.d.	n.d.
	EFE 4 45-60 cm	0.3	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %) ¹⁴ C age BP ^d (±yrs)	— 2005 (50)	0.944 (0.4) 466 (33)	1.03 (0.4) -237 (33)	1.00 (1.06) 20 (85)	1.09 (1.17) -717 (94)	n.d.	1.06 (1.03) -472 (83)	1.07 (2.08) -514 (167)

^a Matière organique totale; ^b Extrait organique total; ^c Fraction Moderne: F¹⁴C=exp(-C¹⁴age/8033); si F¹⁴C>1, l'échantillon indique la présence de ¹⁴C issu d'essais nucléaires atmosphériques (post 1950 AD); ^d Une valeur négative traduit la présence de carbone organique récent (i.e., post 1950 AD); n.d.: non déterminé.

Ainsi donc, dans le cas de ce premier profil de sol, les résultats concernant l'analyse, à différentes échelles, de la matière organique des sols et de ses compartiments tendent à montrer que la m.o. du sol est hétérogène et est constituée à la fois d'un "pool" de m.o. ancienne et réfractaire en profondeur. Celle-ci est de nature non lipidique et n'a pas été caractérisée lors de nos travaux. Quant aux extraits lipidiques, ils correspondent à un "pool" labile, avec des temps moyens de résidence modernes quelle que soit la profondeur considérée. Les extraits lipidiques comprennent notamment la fraction des *n*-alcanes, qui est généralement considérée comme relativement stable (cf. les travaux de Huang et al., 1996, par exemple), mais qui, dans le cas présent, présente un caractère labile étant donné les TMR récents mesurés même en profondeur (Tableau 4).

LE PROFIL DE SOL DE LA PRAIRIE DU FALIMONT

L'étude moléculaire détaillée des signatures de quatre échantillons (FAL 1-FAL 4) prélevés à partir d'un profil de sol (ranker cryptopodzolique) de la prairie du Falimont (massif du Hohneck, Hautes Vosges) a ensuite été entreprise. Il s'agit d'un profil de sol d'une profondeur de 60 cm et dont la couverture végétale actuelle correspond à de la prairie. Dans la mesure où il a été montré récemment par des études anthracologiques qu'un défrichement a eu lieu à l'Age du Bronze, et que la prairie est installée depuis (Goepf, 2007), un des objectifs de cette étude a été d'effectuer l'analyse des signatures lipidiques aux différentes profondeurs, afin notamment de déterminer si celles-ci permettent de détecter ce changement de végétation au cours du temps, et, idéalement, dans le cas où la présence d'une couverture forestière peut être détectée en profondeur, quelle était la nature de cette ancienne forêt.

Les chromatogrammes en phase gazeuse présentant la distribution des lipides des quatre échantillons de sol du profil du Falimont sont représentés sur la figure 4a-d.

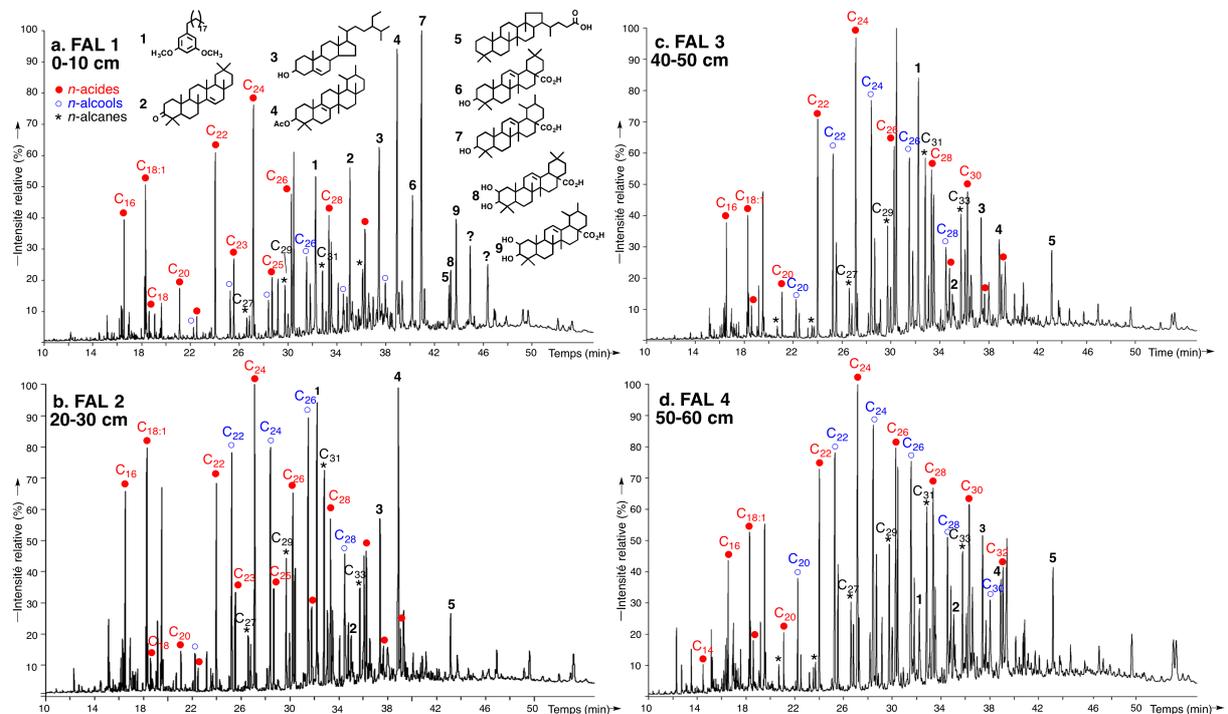


Figure 4: Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits des quatre échantillons du profil de sol de la prairie du Falimont. a: échantillon FAL1; b: échantillon FAL2; c: échantillon FAL3; d: échantillon FAL4. Les composés sont analysés sous la forme d'acétates et d'esters méthyliques.

- Distribution des composés linéaires

En ce qui concerne les différentes familles de composés linéaires (*n*-alcane, *n*-acide, *n*-alcools et 2-méthylcétones), celles-ci montrent, pour les composés à longues chaînes (> C₂₁) d'origines végétales des changements de distribution (pour une famille donnée) au long du profil de sol (Tableau 5). Ainsi par exemple, dans le cas des *n*-alcools, l'homologue en C₂₆ prédomine largement la distribution des *n*-alcools dans les deux échantillons de sol les plus proches de la surface (Fig. 4 a,b et Tableau 5), cette prédominance ayant été attribuée

à une contribution liée à une couverture végétale de type prairie dans le référentiel de sols de surface établi par Trendel et al. (2010). En revanche, dans les deux échantillons les plus profonds, notamment dans l'échantillon FAL 4, cette distribution est différente, et est dominée par l'homologue en C₂₄, et, dans une moindre mesure, par celle des termes en C₂₂ et C₂₆ (Fig. 4c,d et Tableau 5), ce qui pourrait traduire la contribution, en partie tout au moins, d'une source végétale non herbacée, attribuable à des conifères (e.g., Diefendorf et al., 2011). De même, si la distribution des *n*-alcanes dans les trois premiers échantillons, dominée par l'homologue en C₃₁ (Tableau 5), semble caractéristique de prairies (Trendel et al., 2010), on observe une contribution relative croissante de l'homologue en C₃₃ dans l'échantillon le plus profond, ce composé pouvant être lié à une source de type conifères (Diefendorf et al., 2011).

Tableau 5: Prédominance des différents homologues au sein des familles de composés linéaires dans les échantillons du profil de sol du Falimont (Hautes Vosges)

	<i>n</i> -alcanes	<i>n</i> -acides	<i>n</i> -alcools	2-méthylcétones
FAL1	C ₃₁ >C ₂₉ >C ₂₇	C ₂₄ >C ₂₂ >C ₂₆	C ₂₆ >>C ₂₂ ≈C ₂₄	C ₃₁ >C ₂₉ =C ₃₃ =C ₂₇
FAL2	C ₃₁ >C ₂₉ >C ₃₃	C ₂₄ >C ₂₂ >C ₂₆	C ₂₆ >C ₂₂ ≈C ₂₄	C ₃₁ >C ₂₉ ≈C ₃₃ ≈C ₂₇
FAL3	C ₃₁ >C ₃₃ ≈C ₂₉	C ₂₄ >C ₂₂ >C ₂₆	C ₂₄ >C ₂₂ ≈C ₂₆	C ₃₁ >C ₂₉ >C ₂₇ ≈C ₃₃
FAL4	C ₃₁ ≈C ₂₉ ≈C ₃₃ >C ₂₇	C ₂₄ >C ₂₂ >C ₂₆	C ₂₄ >C ₂₂ ≈C ₂₆ >C ₂₈	C ₂₇ =C ₂₉ =C ₃₁

Ainsi donc, et à l'inverse du profil de sol de l'Elmerforst décrit précédemment, une évolution (certes légère) de la signature des *n*-alkyles lipides à longues chaînes transparait tout au long du profil de sol du Falimont, ce qui pourrait être interprété comme l'enregistrement d'un changement de couverture végétale, qui passerait d'un milieu où ont été présents des conifères (en profondeur) vers le système prairial actuel.

- Distribution des composés polycycliques

Les composés polycycliques, triterpéniques pour l'essentiel, présentent globalement le même cortège moléculaire tout au long du profil de sol (Fig. 4), avec toutefois d'importantes différences en ce qui concerne leur abondance relative. Ainsi, dans le cas de l'acétate naturel de bauerenyle (composé 4, Fig. 4a-d), qui est un marqueur spécifique d'Astéracées (Lavrieux et al., 2011), et dont la présence peut être rattachée à des couvertures végétales de type prairies (Lavrieux et al., 2012), on observe que celui-ci fait partie des triterpènes majeurs dans le cas des deux sols de surface, en accord avec l'actuelle couverture végétale (prairie). En revanche, l'abondance relative de ce dernier est nettement moins marquée en profondeur, ce qui pourrait être lié soit à sa dégradation en profondeur, soit au fait que l'influence prairiale est moins marquée dans les sols profonds. Ce composé a été isolé à partir de l'échantillon du sol de surface (FAL1) et du sol plus profond FAL3 afin de le dater pour déterminer son temps moyen de résidence en profondeur, mais seule la valeur pour l'échantillon de surface (âge moderne) a pu être mesurée. En effet, une erreur de manipulation lors de la mesure de ¹⁴C de ce composé isolé à partir de l'échantillon FAL3 a malheureusement entraîné la perte des données.

D'autres triterpènes majeurs, comme les composés **6-9** (Fig. 4), sont essentiellement présents dans l'horizon de surface, et proviennent majoritairement de l'apport de végétaux de type Ericacées (callunes, notamment; Szakiel et al., 2013). En effet, nous avons pu

vérifier que l'analyse moléculaire de calunes (tiges, feuilles et racines) conduisait à l'obtention d'un extrait lipidique presque exclusivement constitué de ces mêmes triterpènes (composés **1,3,7** et **8** sur la Fig. 5).

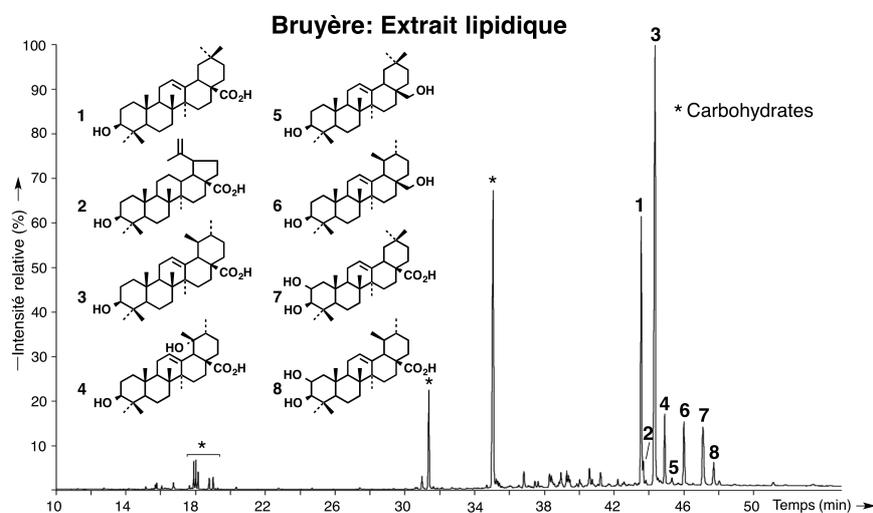


Figure 5: Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique total d'un échantillon (mélange de tiges, feuilles, fleurs et racines) de callune (*Calluna vulgaris*). Les composés sont analysés sous la forme d'acétates et d'esters méthyliques.

Par ailleurs, nous observons tout au long du profil de sol le sitostérol **3** (Fig. 4), qui est un phytostérol non spécifique présent dans la plupart des végétaux, et qui ne possède de ce fait pas de valeur chimiotaxonomique.

- Cas du 5-*n*-nonadecane,1,3-diméthoxybenzène (ou alkylrésorcinol; composé **1**, Fig. 4a)

Nous avons mis en évidence, lors de l'analyse des quatre échantillons de sol du Falimont, un composé inconnu faisant partie des constituants lipidiques majeurs. D'après son mode de fragmentation en spectrométrie de masse (présence d'un fragment de base à m/z 152), ce composé semble correspondre au terme très nettement majeur (> 90%) d'une série de composés homologues comptant 6 homologues. Afin de poursuivre plus en avant l'identification de cette famille, l'isolement du composé **1** (Fig. 4) a été entrepris. Outre les aspects liés à l'identification de ce composé de structure inconnue, l'isolement de celui-ci devait aussi permettre d'en déterminer l'âge à différentes profondeurs dans le profil de sol. Le composé **1** a ainsi été isolé par une succession d'étapes chromatographiques (CL, CCM, HPLC) à partir de l'échantillon de surface FAL 1, conduisant à l'obtention d'environ 2 mg du produit attendu (pureté > 99%). Ce composé a ensuite été analysé par des études de spectroscopie ^1H RMN, ce qui a permis d'établir sa structure comme étant celle du 5-*n*-nonadecane-1,3-diméthoxybenzène **1** (composé **1**, Fig. 4a, et appelé alkylrésorcinol dans le Tableau 6). Si les 5-*n*-alkylrésorcinols et leurs homologues monométhoxylés ont été identifiés au préalable dans certaines plantes, comme les Poacées (Ross et al., 2003; Scognamiglio et al., 2012), les Cypéracées (Avsejs et al., 2002) et les Astéracées (Melliou et al., 2003), les composés possédant une structure générique de type 5-*n*-alkyl-1,3-diméthoxybenzènes identifiés dans nos échantillons demeurent, à notre connaissance, non décrits dans la littérature, et leur origine spécifique (végétale, très certainement) est inconnue à ce jour. Nos travaux se sont poursuivis par l'isolement de ce même composé à partir de l'échantillon FAL 3 (40-50 cm), en vue de sa datation pour déterminer son temps

moyen de résidence (voir ci-après), l'échantillon le plus profond (FAL 4) ne permettant pas d'en isoler des quantités suffisantes (voir Tableau 3 pour les rendements d'extraction). Ainsi, nous avons pu obtenir environ 1 mg de ce composé, dont l'âge a ensuite pu être déterminé (voir ci-après et Tableau 6).

- Détermination des temps moyens de résidence de la m.o. dans le profil de sol du Falimont

Comme nous l'avons vu précédemment, dans le cas du profil de sol de la forêt de l'Elmerforst - profil qui a été analysé en premier chronologiquement- les extraits organiques obtenus à partir des horizons analysés présentent tous une signature moderne, quelle que soit la profondeur considérée. Par conséquent, étant donné l'accès limité à l'instrumentation de pointe que représente le spectromètre MICADAS, ainsi que le coût des analyses de ^{14}C , la stratégie d'analyse mise en œuvre dans la suite de cette étude a consisté à réaliser des mesures de TMR au niveau des profils de sols d'abord sur les horizons de surface et sur les horizons les plus profonds afin de s'assurer que l'on observe bien une évolution des TMR avec la profondeur avant de réaliser ces mesures sur les horizons intermédiaires. Ainsi, dans le cas des échantillons du Falimont, les mesures de TMR ont initialement été obtenues sur le sol extrait, le sol non extrait et l'extrait organique pour l'horizon de surface FAL 1 (0-10 cm) et l'horizon FAL 4 (50-60 cm) (Tableau 6). Les mesures de TMR sur les autres horizons (FAL 2 et 3), qui étaient en cours lors de la rédaction de la première version de ce rapport, n'ont été obtenues que plus tardivement et n'avaient pu être présentées dans la première version du rapport final de GESSOL-APOGEE. Dans la présente version, ces données, obtenues au courant du mois de janvier 2014 et concernant à la fois les échantillons FAL 2 et FAL 3, mais aussi ceux des prélèvements de profondeurs intermédiaires des profils de sol du Wegscheid (VJF) et de Salajka (SJK), sont désormais intégrées.

Tableau 6: Teneur en carbone organique, temps moyen de résidence $F^{14}\text{C}$ et âge ^{14}C (BP) de fractions organiques et de biomarqueurs isolés d'échantillons provenant du profil de sol du Falimont (FAL).

	C_{org} (%)		SOM ^a	Soil - EOT	EOT ^b	Soil H ^c extrait	Extrait orga. H ^c	n-alcane	Alkyl résorcinol	i-GDGTs	br-GDGTs
F A L I M O N T	FAL 1 0-10 cm	$F^{14}\text{C}^d (\pm 1\sigma, \%)$	1.127 (0.4)	1.123 (0.4)	1.115 (0.5)	n.d.	n.d.	1.066 (0.8)	1.128 (0.7)	n.p.	0.98 (2.5)
		^{14}C age BP ^d (±yrs)	-961 (26)	-929 (30)	-874 (34)			-516 (63)	-965 (47)		165 (205)
	FAL 2 20-30 cm	$F^{14}\text{C}^d (\pm 1\sigma, \%)$	0.883 (0.3)	0.873 (0.3)	0.847 (0.3)	0.823 (0.3)	0.915 (0.4)	0.756 (0.3)	n.d.	n.d.	n.d.
		^{14}C age BP ^d (±yrs)	996 (31)	1089 (31)	1338 (32)	1562 (32)	717 (33)	2242 (36)			
	FAL 3 40-50 cm	$F^{14}\text{C}^d (\pm 1\sigma, \%)$	0.739 (0.3)	0.744 (0.3)	0.675 (0.3)	n.d.	n.d.	0.659 (0.4)	1.114 (0.4)	0.827 (1.2)	0.825 (1.5)
		^{14}C age BP ^d (±yrs)	2426 (33)	2377 (33)	3159 (35)			3352 (44)	-866 (31)	1527 (115)	1543 (147)
	FAL 4 50-60 cm	$F^{14}\text{C}^d (\pm 1\sigma, \%)$	0.589 (0.3)	0.588 (0.3)	0.514 (0.3)	0.582 (0.3)	n.d.	0.500 (0.3)	n.d.	n.d.	n.d.
		^{14}C age BP ^d (±yrs)	4272 (36)	4256 (35)	5353 (52)	4347 (37)		5564 (52)			

^a Matière organique totale; ^b Extrait organique total; ^c Fraction Moderne: $F^{14}\text{C} = \exp(-C^{14}\text{age}/8033)$; si $F^{14}\text{C} > 1$, l'échantillon indique la présence de ^{14}C issu d'essais nucléaires atmosphériques (post 1950 AD); ^d Une valeur négative traduit la présence de carbone organique récent (i.e., post 1950 AD); n.p.: non présent; n.d.: non déterminé.

Dans le cas de l'horizon de surface FAL 1 (0-10 cm), les différents compartiments de la matière organique (sol extrait, sol non extrait et extrait organique) correspondent à du matériel moderne, comme cela peut être logiquement attendu. En revanche, la situation rencontrée dans le cas des horizons plus profonds est totalement différente de celle observée dans le cas des échantillons de l'Elmerforst. En effet, les mesures de TMR de la m.o. totale, tout comme celles de ses différents compartiments, montrent un accroissement progressif de l'âge avec la profondeur, ceci aussi bien pour les extraits lipidiques que pour la m.o. non extractible, ou encore la fraction des n-alcane (Tableau 6 et Fig. 6).

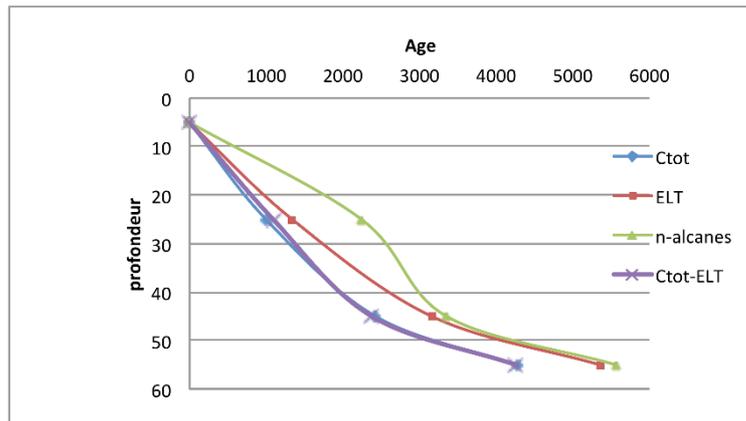


Figure 6: Age ^{14}C de la matière organique totale (bleu; Ctot), de l'extrait lipidique (rouge; ELT), de la matière organique résiduelle après extraction de l'extrait lipidique (violet; Ctot-ELT) et de la fraction des *n*-alcanes (vert; *n*-alcanes) en fonction de la profondeur dans le profil de sol de la prairie du Falimont.

Il est d'ailleurs à noter que la composante lipidique, dans le cas de ce profil de sol, présente un âge systématiquement plus ancien que la m.o. totale et la m.o. non extractible, tout comme la sous-fraction des *n*-alcanes qui fait partie de cette composante lipidique et présente les âges les plus anciens (jusqu'à 5564 ans BP vs. 4272 pour la m.o. totale; Tableau 6 et Fig. 6). Ainsi donc, contrairement à ce qui semblait ressortir de l'interprétation des TMR dans le cas du profil de sol de l'Elmerforst, il apparaît que les lipides, dont les *n*-alcanes, présentent un caractère réfractaire dans le cas du sol du Falimont, et présentent de ce fait un potentiel indéniable en tant qu'archives de la m.o. des sols.

Les différences d'âge observées entre extraits lipidiques et m.o. des sols extraits ou des sols totaux montrent ainsi que la matière organique dans ce profil de sol est constituée d'un mélange de matériel récent et ancien. Néanmoins, on peut conclure de la signature ancienne des extraits lipidiques que les profils moléculaires trouvés en profondeur doivent tirer leur origine, au moins partiellement, de la végétation ayant recouvert ce sol dans le passé. A cet égard, on peut remarquer également que les TMR des fractions des *n*-alcanes, principalement issus de cires cuticulaires végétales d'origine non racinaire (Fig. 3), montrent une évolution très nette avec la profondeur (Tableau 6 et Fig. 6). Si l'on ne peut exclure un transfert partiel des constituants de cires cuticulaires comme les *n*-alcanes de l'horizon de surface vers les horizons plus profonds par des processus tels que le lessivage ou la bioturbation, ces transferts n'ont pas été suffisants pour masquer la signature moléculaire ancienne dans les horizons profonds. Ainsi donc, les différentes mesures de TMR réalisées jusque-là confortent l'hypothèse proposée plus haut selon laquelle l'évolution des profils moléculaires obtenus pour les différents horizons du profil du sol du Falimont, et notamment de la signature des *n*-alkyles lipides à longues chaînes, pourrait être interprétée en termes de changement de couverture végétale (conifères en profondeur vs. système prairial).

- Cas de la matière organique hydrolysable (HCl/H₂O)

Par ailleurs, nous avons procédé à l'hydrolyse (HCl/H₂O) de la m.o. non extractible dans le cas de deux échantillons (FAL 2 et FAL 4), traitement qui a conduit à la formation d'un extrait constitué de d'une matière organique hydrolysée soluble dans les solvants organiques (extrait constitué notamment de carbohydrates et de quelques acides gras).

Nous avons ensuite procédé à la datation de la m.o. résiduelle après hydrolyse ("sol H⁺ extrait", Tableau 6) et de la m.o. libérée par ce traitement ("extrait orga H⁺", Tableau 6). Les résultats indiquent, dans le cas de la m.o. résiduelle, que celle-ci présente dans le cas de l'échantillon FAL 2 un âge plus ancien que celui de la m.o. totale et m.o. extraite (1562 ans BP vs. 996 et 1089 ans BP, respectivement), suggérant qu'une composante plus récente a été libérée par hydrolyse. Cette possibilité est en effet vérifiée par la mesure de l'âge de la m.o. libérée par hydrolyse, qui présente un âge relativement plus récent (717 ans BP). De même, dans le cas de l'échantillon FAL 4, la m.o. résiduelle après hydrolyse présente un âge légèrement plus ancien que celui de la m.o. non hydrolysée (4347 ans BP vs. 4272 et 4256 ans BP). Malheureusement, suite à une erreur de manipulation lors des mesures de datation, nous n'avons pas pu obtenir d'âge pour la m.o. libérée par hydrolyse pour confirmer/infirmer que cette composante possède un âge plus récent que la m.o. résiduelle. Cet aspect concernant le traitement chimique et la caractérisation de la m.o. des sols obtenue par dégradation chimique n'a malheureusement pas pu être exploré plus en avant dans le cadre du programme GESSOL, mais fera sans aucun doute l'objet d'études ultérieures.

Les mesures de datation par le ¹⁴C réalisées dans le cas 5-*n*-nonadécane,1,3-diméthoxybenzène **1** (Fig. 4a) montrent en revanche que ce composé est moderne dans l'horizon de surface ainsi que dans l'horizon FAL 3 (40-50 cm) ("Alkylrésorcinol", Tableau 6). Dans la mesure où les constituants de cires cuticulaires comme les *n*-alcanes sont anciens en profondeur, notamment dans l'horizon FAL 3 (3352 ans BP), il semble que les processus de bioturbation et de lessivage ne conduisent pas de manière importante au transfert de composés lipidiques d'origine foliaire de la surface vers les horizons les plus profonds dans ce sol. Ainsi, si l'on considère que le transfert de composés lipidiques depuis la surface est limité dans ce profil de sol, la présence du composé **1** (Fig. 4a), moderne dans les horizons profonds, pourrait s'expliquer par une origine racinaire. Une autre hypothèse serait que le composé **1** (Fig. 4a) soit issu de la végétation actuelle sur le sol du Falimont et que la plante dont il est issu ne faisait pas partie de la végétation ancienne sur le site du Falimont. Le 5-*n*-nonadécane,1,3-diméthoxybenzène détecté dans l'horizon FAL 3 correspondrait alors à une contribution provenant de la surface par lessivage et bioturbation et dont la signature moderne n'a pas été diluée par une contribution ancienne, contrairement à la situation observée dans le cas des *n*-alcanes. Une dernière hypothèse serait que ce composé soit moins bien préservé que les *n*-alcanes réputés relativement inertes par rapport aux processus d'altération. Dans une telle situation, la contribution ancienne de ce composé dans les horizons profonds aurait été presque totalement dégradée et seule une contribution provenant de la surface et dont la durée de persistance dans le sol est très limitée pourrait être mise en évidence.

- Cas des tétraéthers de diglycérol (travaux effectués dans le cadre du stage de master 2 de M^{lle} Blandine Courel)

Les tétraéthers de diglycérol isoprénoïdes et ramifiés (*i*-GDGTs **I-V'** et *br*-GDGTs **VI-VIII**, Fig. 7) sont des composés d'origine biologique présents dans la plupart des environnements naturels, qu'ils soient marins, lacustres ou terrestres (sols), provenant d'archées où ils jouent le rôle de renforçateurs membranaires (*i*-GDGTs) et de bactéries acidophiles (*br*-GDGTs). Dans certains sols, les *i*-GDGTs et *br*-GDGTs coexistent avec toutefois une prédominance marquée des *br*-GDGTs alors que l'inverse est observé dans les

environnements aquatiques (milieux marins et lacustres; Schouten et al., 2013). Les distributions des GDGTs en milieu aquatique font, depuis quelques années, l'objet de nombreuses publications et ont montré un fort potentiel dans le cadre d'étude environnementales notamment grâce à la création d'indices permettant de déterminer des paramètres environnementaux tels que le paléopH, la paléotempérature de l'eau ou de l'air, ou encore la proportion de matière organique terrestre vs. matière organique aquatique (Schouten et al., 2013). En revanche, les distributions des GDGTs contenus dans les sols (notamment dans les sols profonds) sont à ce jour encore extrêmement peu documentées.

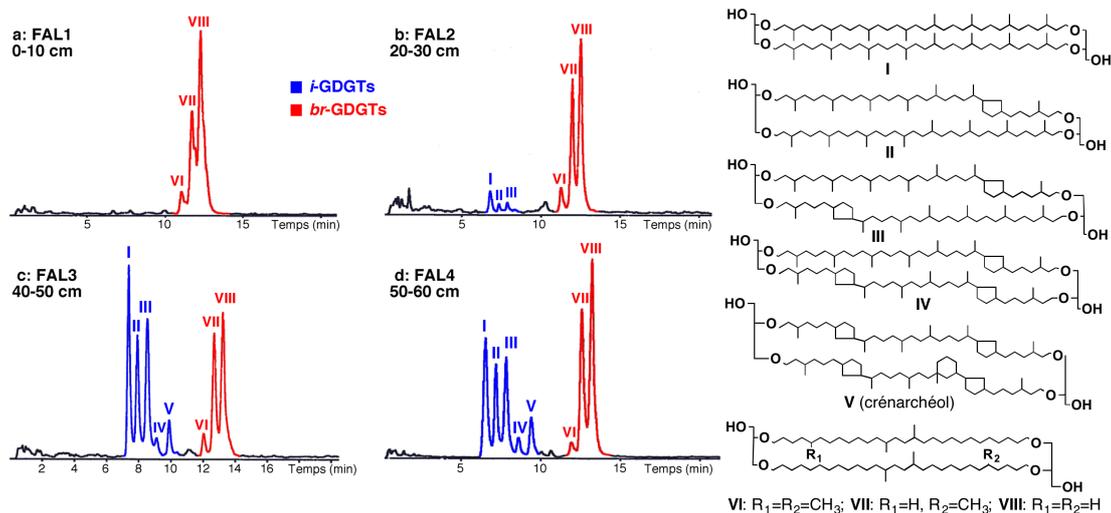


Figure 7: Distribution (HPLC-MS) des *i*-GDGTs et *br*-GDGTs dans le profil de sol du Falimont (Vosges); a: échantillon FAL1; b: échantillon FAL2; c: échantillon FAL3; d: échantillon FAL4.

Les résultats présentés ici dans le cas du profil de sol du Falimont avaient pour objectif l'analyse par LC-MS de la distribution des GDGTs en fonction de la profondeur et la détermination de l'origine de ces GDGTs par l'association de mesures de datation au radiocarbone et de composition isotopique. Ces mesures ont nécessité au préalable des étapes de purification et de séparation des composés au moyen d'un protocole analytique optimisé et mis en place dans le cadre de ce stage de master et combinant différentes techniques chromatographique: CL, HPLC-MS en phase directe et inverse, CCM. Malgré l'isolement de seulement quelques microgrammes de GDGTs, les techniques actuelles de datation (AMS) nous ont permis de déterminer l'âge de nos composés individuels. Ce protocole pourra par la suite être plus généralement appliqué à l'analyse des GDGTs dans tous les types d'environnements. Le détail des résultats obtenus au cours de ce stage de master 2 peuvent être trouvés dans le rapport de master 2 de M^{lle} Blandine Courel ainsi que dans la copie de l'affiche présentée lors du congrès international IMOG 26 (annexes 2 et 3).

Pour résumer les principaux résultats, alors que le sol de surface contient exclusivement des *br*-GDGTs (Fig. 7a), une augmentation progressive de l'abondance relative des *i*-GDGTs avec la profondeur est observée (Fig. 7b-d), cette augmentation pouvant être due à la présence de molécules "fossiles", témoins d'une population passée d'archées. Suite à l'isolement des *br*-GDGTs d'une part, et des *i*-GDGTs d'autre part, à partir des échantillons de sol FAL 1 et FAL 3, des mesures de datation au ¹⁴C indiquent que les *i*-GDGTs et *br*-GDGTs coexistent en profondeur et ont le même âge (environ 1500 ans BP; Tableau 6) mais sont nettement plus jeunes que les *n*-alcanes du même échantillon (5500 ans BP; Tableau 6). Ces résultats suggèrent un possible mélange de GDGTs anciens et

d'autres plus récents ou bien l'utilisation de matière organique ancienne et plus récente comme source de carbone par ces microorganismes (archées chimioautotrophes et bactéries hétérotrophes). Les *br*-GDGTs présents en surface sont quant à eux bien plus récents (200 ans BP) et pourraient correspondre également à un mélange de GDGTs actuels, récents et d'autres légèrement plus anciens. Par ailleurs, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ mesurées après dégradation chimique des GDGTs (voir le rapport de M^{lle} B. Courel en annexe 3) sont en accord avec les résultats obtenus par Weijers et al. (2010) dans le cas d'autres sols, et permettent ainsi d'étendre les données concernant les GDGTs dans les sols.

LE PROFIL DE SOL DE LA FORET DE WEGSCHEID (ALSACE)

Les chromatogrammes en phase gazeuse de la fraction lipidique des échantillons du profil du sol de la forêt du Wegscheid sont représentés sur la Fig. 8a-d.

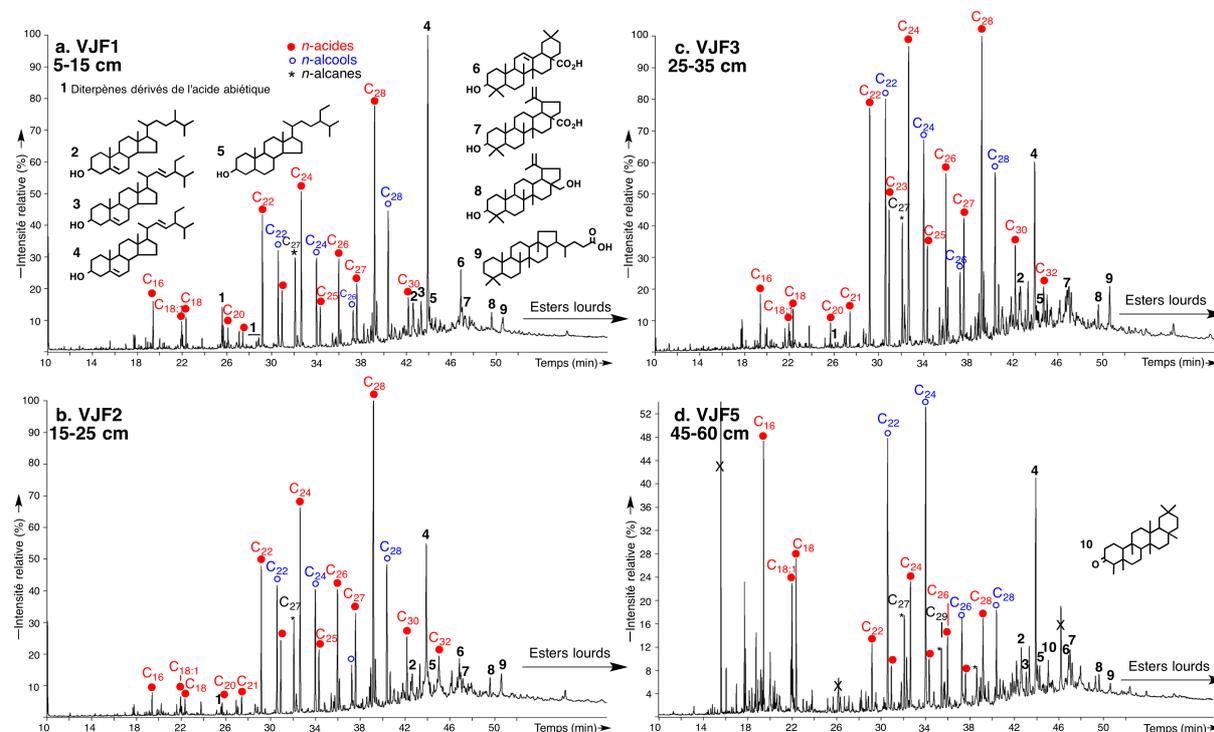


Figure 8: Chromatogrammes en phase gazeuse de l'extrait lipidique des échantillons du profil de sol de la forêt du Wegscheid. a: Echantillon VJF1 (5-15 cm); b: VJF2 (15-25 cm); c: VJF3 (25-35 cm); d: VJF5 (45-60 cm). Les composés sont analysés sous la forme d'acétates et d'esters méthyliques.

Dans l'ensemble, les profils lipidiques des échantillons VJF1 à VJF3 sont sensiblement identiques, et sont dominés par des acides gras à longues chaînes dans la gamme C_{22} - C_{30} (Fig. 8a-c). Parmi ceux-ci figure l'homologue en C_{28} , dont la présence peut être rattachée à une contribution végétale pouvant correspondre à du hêtre (cf. Fig. 1d). Cette même contribution de hêtre se traduit également par la présence du *n*-alcool en C_{28} et du *n*-alcane en C_{27} , qui est bien représenté dans ces trois échantillons et qui sont relativement abondants dans les feuilles de hêtre (Fig. 3d). On observe également, en quantités notable, les *n*-acides et *n*-alcools en C_{22} et C_{24} , qui pourraient souligner une contribution de type conifères (Diefendorf et al., 2011).

Dans l'échantillon le plus profond (VJF5), si l'on s'en réfère aux composés linéaires, il semblerait que la contribution de hêtres soit bien moins marquée (Fig. 8d), alors que celle de conifères demeure, ce qui pourrait souligner une évolution de la couverture végétale (passage de sapinière à forêt mixte de type hêtraie-sapinière?).

En ce qui concerne les composés polycycliques, ceux-ci présentent, d'un point de vue qualitatif, pratiquement le même cortège de triterpènes de végétaux et de stéroïdes. Le composé prédominant est le sitostérol (composé **4**, Fig. 7a-d) qui est un marqueur non chimiotaxonomique. Quant aux triterpènes **6-8**, ceux-ci sont biosynthétisés par une multitude de précurseurs biologiques (angiospermes), et ne peuvent pas de ce fait être utilisés pour en déterminer une éventuelle source spécifique.

En conclusion en ce qui concerne l'étude des distributions lipidiques dans le profil de sol de la forêt du Wegscheid, une légère évolution des distributions est notée entre l'échantillon de sol profond (VJF5) et les autres échantillons, pouvant suggérer le passage d'une forêt de type sapinière vers une forêt mixte de type hêtraie-sapinière. Par contre, nous n'avons pas décelé de biomarqueurs traduisant la présence passée d'une couverture végétale de type prairie (par exemple, abondance des *n*-alcools en C₂₆, présence d'acétates naturels de triterpènes, ...; Trendel et al., 2010).

Concernant la détermination des temps moyens de résidence de fractions organiques et/ou de marqueurs individuels, nous n'avons effectué qu'un nombre limité de mesures. Ainsi, les mesures obtenues concernent l'échantillon de sol superficiel (VJF1, 5-15 cm), pour lequel les trois datations effectuées sur le carbone organique total, l'extrait lipidique, et la matière organique non extractible aux solvants organiques indiquent un âge moderne (Tableau 7). Il en est de même pour l'échantillon de sol situé immédiatement sous celui-ci (VJF 2), où un âge moderne caractérise l'extrait organique et le m.o. du sol après extraction des lipides (Tableau 7). En revanche, les valeurs obtenues pour ces mêmes fractions organiques dans le cas de l'échantillon le plus profond (VJF5, 45-60 cm) correspondent à une matière organique globalement assez ancienne (environ 800 ans BP), comprenant une composante non lipidique (i.e., non extractible) également d'environ 800 ans BP, et une composante lipidique plus jeune, d'environ 500 ans BP, qui elle-même pourrait être composée d'un mélange de lipides anciens et de lipides plus récents entraînés en profondeur par bioturbation et/ou lessivage. Il s'avère donc, dans le cas de ce profil de sol, que la composante lipidique en profondeur est légèrement plus récente que la m.o. totale, ce qui est l'inverse de ce que nous avons observé précédemment dans le cas du profil de sol du Falimont.

Tableau 7: Teneur en carbone organique et temps moyen de résidence $F^{14}C$ et âge ^{14}C BP de fractions organiques d'échantillons du profil de sol du Wegscheid (VFJ).

		C _{org} (%)		MOT ^a	Soil - EOT	EOT ^b
W E G S C H E I D	VJF 1 5-15 cm	4.5	$F^{14}C^c$ ($\pm 1\sigma$, %)	1.079 (0.5)	1.112 (1.1)	1.086 (0.6)
			^{14}C age BP ^d (\pm yrs)	-614 (34)	-852 (78)	-665 (41)
	VJF 2 15-25 cm	2.2	$F^{14}C^c$ ($\pm 1\sigma$, %)	n.d.	1.056 (0.4)	1.079 (0.4)
			^{14}C age BP ^d (\pm yrs)		-437 (30)	-614 (30)
	VJF 5 45-60 cm	1.0	$F^{14}C^c$ ($\pm 1\sigma$, %)	0.907 (0.6)	0.902 (0.5)	0.936 (0.6)
			^{14}C age BP ^d (\pm yrs)	781 (52)	832 (42)	532 (50)

^a Matière organique totale; ^b Extrait organique total; ^c Fraction Moderne: $F^{14}C = \exp(-C^{14} \text{age}/8033)$; si $F^{14}C > 1$, l'échantillon indique la présence de ^{14}C issu d'essais nucléaires atmosphériques (post 1950 AD); ^d Une valeur négative traduit la présence de carbone organique récent (i.e., post 1950 AD); n.d.: non déterminé.

Concernant la datation de lipides individuels ou de fractions chromatographiques issues de l'extrait lipidique, les rendements obtenus en extraits lipidiques, très faibles dans les horizons profonds, ont exclu la possibilité d'accéder au TMR de composés individuels, ou même à celui de fractions comme les hydrocarbures saturés, très peu abondants dans la matière organique de ce profil de sol.

LE PROFIL DE SOL DE LA FORET DE SALAJKA (SJK1 ET SJK3)

Quatre échantillons ont été prélevés le long du profil de sol (profondeur totale de 110 cm) provenant de la forêt de Salajka (République Tchèque). Cette forêt, une hêtraie-sapinière, est supposée correspondre à une forêt très ancienne. Les quantités d'extraits lipidiques obtenues à partir des échantillons de sol disponibles se sont montrées très faibles (Tableau 3), excluant par là même toute possibilité d'isolement de fractions chromatographiques et, *a fortiori*, de composés individuels. Il aurait fallu, pour ces échantillons (profonds, notamment), disposer davantage de matériel de départ pour obtenir des extraits organiques plus conséquents. Les extraits lipidiques de deux échantillons, SJK 1 (0-10 cm) et SJK 3 (55-70 cm), ont toutefois pu être analysées en détail. Les chromatogrammes en phase gazeuse sont représentés dans la figure 9.

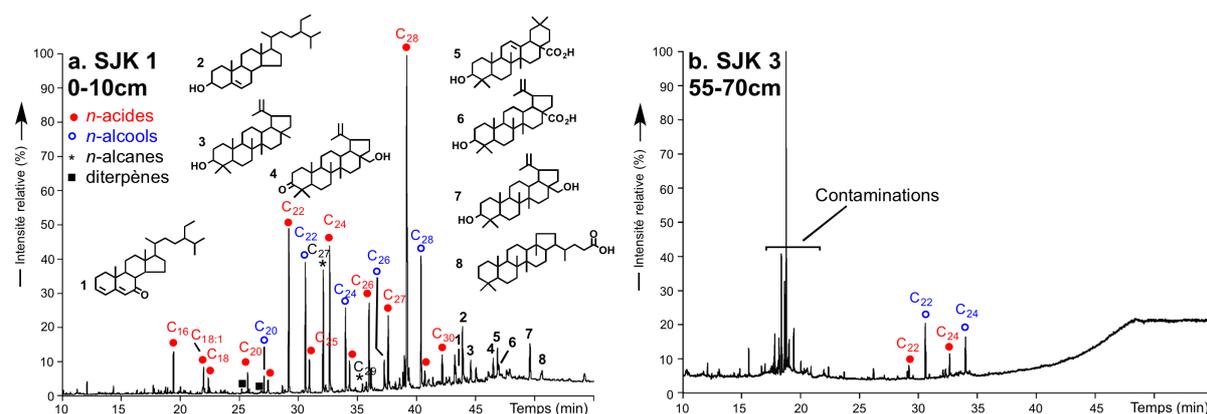


Figure 9: Chromatogrammes en phase gazeuse de l'extrait lipidique des échantillons du profil de sol de la forêt de Salajka (République Tchèque). a: Echantillon SKJ1 (0-10 cm); b: SKJ3 (55-70 cm). Les composés sont analysés sous la forme d'acétates et d'esters méthyliques.

Le profil lipidique obtenu dans le cas de l'échantillon de surface (SJK 1) présente des distributions de *n*-acides et *n*-alcools dominées par les termes en C₂₈ caractéristiques d'une contribution provenant du hêtre (Trendel et al., 2010). Il en est de même de la prédominance du *n*-heptacosane (*n*-C₂₇) qui est un hydrocarbure majeur dans les feuilles de hêtre. La proportion significative des *n*-acides et *n*-alcools en C₂₂ et C₂₄ pourrait être liée à une contribution provenant de conifères (Diefendorf et al., 2011). Cependant, les composés diterpéniques normalement associés aux conifères n'apparaissent, quant à eux, qu'à l'état de trace. Les triterpènes de végétaux 3-7 (Fig. 9) sont peu spécifiques et n'ont pas pu être reliés à une source végétale précise. L'acide hopanique 8 est quant à lui issu de lipides membranaires bactériens.

L'extrait lipidique de l'échantillon SJK 3 (55-70 cm) présente une contribution importante de contaminations que l'on peut expliquer par la très faible quantité d'extrait lipidique obtenue à partir de cet échantillon de sol (Tableau 3). La source de ces

contaminations peut être trouvée, notamment, parmi les constituants de matières plastiques (dérivés d'origine pétrolière) qui ont servi de contenant pour les échantillons de sol. La prédominance des *n*-acides et *n*-alcools en C₂₈, caractéristique du hêtre et observée dans l'échantillon de surface, a totalement disparu au profit des termes en C₂₂ et C₂₄ que l'on pourrait associer aux conifères (Diefendorf et al., 2011). Par ailleurs, de l'acide déhydroabiétique (diterpène spécifique des conifères) a été détecté (certes à l'état de traces) dans ce même échantillon.

Etant donné les très faibles quantités d'extraits lipidiques obtenus dans le cas des sols profonds (26 mg d'extrait lipidique récupérés à partir de 700 g de sol sec dans le cas de l'échantillon SJK3!; Tableau 3), l'isolement de composés individuels afin de déterminer leur temps moyen de résidence n'a pu être envisagé. Toutefois, à ce stade, des mesures d'âge ont pu être déterminées sur des fractions organiques (carbone organique total, matière organique non extractible et extrait lipidique; Tableau 8) pour les quatre échantillons de sol, et montrent qu'il n'y a pas de différences réellement significatives en terme d'âge entre m.o. totale et m.o. extraite, et qu'une augmentation progressive de l'âge est observée avec la profondeur, pour atteindre un âge autour de 3100 ans BP vers 1 mètre de profondeur. En ce qui concerne l'extrait lipidique, on observe pour l'échantillon de profondeur intermédiaire SJK 3 un âge plus récent que la m.o. totale (532 ans BP vs. 781 ans BP; Tableau 8), ce qui pourrait traduire une contribution d'âge moderne apportée par lessivage ou bioturbation. Il convient de noter que l'âge mesuré est ici certainement surévalué étant donné la présence de contaminants d'origine pétrolière (plastifiants, avec une composante organique dépourvue de ¹⁴C) dans l'extrait lipidique (cf. Fig. 9b). En revanche, en profondeur, nous observons que l'extrait lipidique est relativement plus ancien que la m.o. totale (3305 ans BP vs. 3112 ans BP; Tableau 8), mais il est également possible ici que l'âge déterminé soit surestimé suite à la présence de contaminations d'origine pétrolière. Il ressort toutefois de ces datations que dans l'ensemble, et comme dans le cas des profils de sol du Falimont et du Wegscheid, la m.o. dans son ensemble, tout comme les extraits lipidiques, présentent un gradient d'âge avec la profondeur, ce qui semble valider l'utilisation des biomarqueurs lipidiques en tant qu'outils d'archivage de la m.o. et indicateurs potentiel pour retracer la nature d'une végétation passée, et d'un changement de végétation au long d'un profil de sol.

Tableau 8: Teneur en carbone organique et temps moyen de résidence $F^{14}C$ et âge ^{14}C (BP) de fractions organiques d'échantillons du profil de sol de Salajka (SJK).

		C _{org} (%)		MOT ^a	Soil - EOT	EOT ^b
S A L J K A	SJK 1	6.6	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %)	1.046 (0.5)	1.071 (0.4)	1.071 (0.5)
	0-10 cm		¹⁴ C age BP ^d (± yrs)	-362 (35)	-552 (31)	-552 (37)
	SJK 2	1.2	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %)	1.071 (0.4)	1.056 (0.4)	1.079 (0.4)
	25-40 cm		¹⁴ C age BP ^d (± yrs)	-552 (31)	-437 (30)	-614 (30)
	SJK 3	0.6	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %)	0.907 (0.6)	0.902 (0.5)	0.936 (0.6)
	55-70 cm		¹⁴ C age BP ^d (± yrs)	781 (52)	832 (42)	532 (50)
	SJK 4	0.4	F ¹⁴ C ^c (±1σ, %)	0.679 (0.3)	0.675 (0.4)	0.663 (0.3)
	90-110 cm		¹⁴ C age BP ^d (± yrs)	3112 (41)	3157 (42)	3305 (37)

^a Matière organique totale; ^b Extrait organique total; ^c Fraction Moderne: $F^{14}C = \exp(-C^{14} \text{age}/8033)$; si $F^{14}C > 1$, l'échantillon indique la présence de ¹⁴C issu d'essais nucléaires atmosphériques (post 1950 AD); ^d Une valeur négative traduit la présence de carbone organique récent (i.e., post 1950 AD).

4.1.3. CONCLUSIONS PARTIELLES

Suite à une étude préliminaire au programme GESSOL-APOGEE, qui nous a permis de montrer que les signatures lipidiques de sols de surface pouvaient être liées à la nature du couvert végétal et d'établir, ainsi, un référentiel moléculaire de sols de surface (Trendel et al., 2010), nous avons réalisé, dans le cadre du présent programme, l'étude moléculaire d'une série de quatre profils de sols dont l'évolution au cours du temps est bien documentée afin de vérifier si les signatures moléculaires sont préservées en profondeur et peuvent être utilisées pour reconstituer l'histoire du couvert végétal. Nous avons mis en œuvre, notamment, la datation ^{14}C directe de différents compartiments de la matière organique des sols, à une échelle allant de la matière organique totale jusqu'à celle de molécules individuelles à différentes profondeurs à partir de ces quatre profils de sols. Une étude aussi détaillée de la m.o. des sols en profondeur, qui inclut la détermination des temps moyens de résidence de différents compartiments de la m.o. représente, à notre connaissance, une première dans le domaine des sciences du sol. Les résultats obtenus apparaissent toutefois relativement contrastés selon les caractéristiques des sols étudiés.

Dans le cas du profil de sol de l'Elmerforst (forêt), les résultats obtenus par l'analyse moléculaire des extraits lipidiques et par datation au ^{14}C de différents compartiments de la matière organique (sol total, sol extrait, extrait lipidique), de fractions chromatographiques (*n*-alcanes) et de composés individuels (lipides) isolés à partir des extraits organiques indiquent que les extraits lipidiques globaux, tout comme les compartiments de ceux-ci, détectés en profondeur, sont identiques à ceux du sol de surface. Ils ne sont pas issus d'un couvert végétal ancien mais correspondent à une contribution de matière organique récente, constituée d'apports d'origine racinaire (et/ou écorce?) et foliaire transférés en profondeur par lessivage, bioturbation ou encore exsudation racinaire. La matière organique totale des horizons profonds est, quant à elle, légèrement plus ancienne, ce qui tend à montrer que la m.o. dans les horizons profonds de ce sol est hétérogène et constituée à la fois d'un "pool" de m.o. ancienne et réfractaire de nature non lipidique et d'un "pool" labile, comprenant notamment l'extrait lipidique.

L'étude du profil de sol de prairie du Falimont (prairie, actuellement) a montré, au contraire, une évolution des profils moléculaires avec la profondeur. La datation au ^{14}C de différents compartiments de la matière organique, de fractions chromatographiques et de composés individuels montre un gradient d'âge marqué avec la profondeur qui permet de conclure que la matière organique dans les horizons profonds de ce sol est constituée d'un mélange de matériel récent et ancien. Les résultats obtenus nous ont conduit à proposer que les signatures moléculaires trouvées en profondeur, anciennes en bonne partie, doivent pouvoir s'interpréter en termes d'évolution du couvert végétal au cours du temps (ici, conifères en profondeur vs. système prairial). A ce titre, les résultats obtenus présentent des similitudes avec ceux obtenus par Huang et al. (1996) qui avait mis en évidence sur un profil de sol une évolution des TMR de fractions de *n*-alcanes issues de cires cuticulaires végétales avec la profondeur en parallèle avec l'évolution des TMR de la m.o. totale.

Les datations réalisées sur les profils de sol du Wegscheid, et de la forêt de Salajka viennent confirmer la tendance observée dans le cas du sol du Falimont, même si ces échantillons n'étaient pas suffisamment riches en extraits lipidiques pour réaliser des mesures de TMR sur des composés individuels. Il ressort dans le cas de ces deux profils

que la m.o. dans son ensemble, tout comme les extraits lipidiques, présentent un également un gradient d'âge avec la profondeur, même si ces gradients sont moins marqués que dans le cas du sol du Falimont. L'ensemble de ces résultats semblent donc valider l'utilisation des biomarqueurs lipidiques en tant qu'outils d'archivage de la m.o. permettant de caractériser la nature du couvert végétal passé et d'étudier les changements de végétation au cours du temps.

Il apparaît donc clairement à partir des profils de sol étudiés que les paramètres contrôlant la préservation des lipides et plus généralement la dynamique de la matière organique dans les sols sont très complexes et dépendent de nombreux facteurs dont le rôle et l'importance sont difficiles à évaluer pour l'instant. Les situations peuvent donc être très contrastées en fonction des caractéristiques des sols. Ainsi, dans le cas du profil de sol de l'Elmerforst, il n'a pas été possible de trouver des biomarqueurs fiables et exploitables dans les horizons de sol profonds, puisque la présence de biomarqueurs avec un âge ^{14}C moderne en profondeur indique un transport vertical (et/ou apports par exsudats racinaires) important de ces composants. En revanche, dans d'autres cas, illustrés par les trois autres profils de sol (Falimont, Wegscheid, Salajka), la signature lipidique dans les horizons profonds, suffisamment stable et relativement peu diluée par des apports de la surface, semble potentiellement utilisable pour reconstituer l'histoire du couvert végétal. Les résultats obtenus sont également intéressants en terme de dynamique des matières organiques parce qu'ils indiquent, notamment, que dans certains cas, même des composants qui sont en général considérés comme résistants aux processus d'altération peuvent avoir un TMR relativement court. Ces travaux ont également montré la grande variabilité en termes de préservation des différents compartiments de la matière organique selon le contexte et les caractéristiques des sols.

En ce qui concerne le déroulement du projet, il faut noter que l'isolement de composés individuels à partir des mélanges complexes que constituent les extraits lipidiques de sols pour les mesures de TMR (datation ^{14}C par AMS "MICADAS") a représenté un travail très important et très coûteux en temps puisqu'il s'est agi de mettre en oeuvre sur les extraits lipidiques des séquences d'étapes de purification par différentes techniques chromatographiques. D'autre part, compte tenu des quantités parfois très faibles d'extrait organique (Tableau 3), il a été nécessaire dans certains cas de partir de quantités très importantes de sol. Ainsi, dans le cas des échantillons du Wegscheid et de Salajka, les quantités très faibles d'extraits lipidiques obtenues n'ont pas permis l'isolement de composés individuels pour des mesures de datation. Le fait que ce volet de l'étude ait été extrêmement chronophage explique également pourquoi, malgré l'implication de personnels non financés dans le cadre de ce projet (C. Liaud et B. Courel, stagiaires de master 2, chacune avec un stage de laboratoire de 6 mois; voir rapports en Annexe), nous n'ayons pas eu le temps d'aborder l'étude des biomarqueurs lipidiques sur des fractions granulométriques d'agrégats, un volet initialement prévu dans le programme APOGEE.

4.2. SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE

4.2.1. ACQUISITION ET PRISE EN MAIN DU SPECTROMETRE

Le premier semestre du programme a été consacré à l'acquisition d'un nouveau spectromètre IR hébergé au sein du Laboratoire des Sols (UMS 730, CNRS). Auparavant, les travaux en spectroscopie IR étaient effectués dans un autre laboratoire (Eco & Sol, Montpellier). Cette acquisition nous donne une plus grande autonomie et nous a permis, au-delà du programme GESSOL, de poursuivre notre démarche de développement méthodologique de la SPIR qualitative appliquée au sol.

Du point de vue pratique, quatre prestataires ont participé à l'appel d'offre. Trois prestataires offraient des appareils adéquats. Des visites sur site avec essais du matériel ont permis de préciser le choix. La gamme spectrale (proche infrarouge ou proche et moyen infrarouge) ainsi que le caractère évolutif des appareils vers un équipement de microscopie infrarouge ont constitué des critères de choix. Finalement, la société PerkinElmer regroupait le plus grand nombre de critères pour le budget dont nous disposions. Notre choix s'est porté sur un Spectrum 400 de la gamme Frontier. Il dispose de deux sources, de deux séparatrices et de deux capteurs qui lui permettent l'acquisition de spectre dans le proche infrarouge et dans l'infrarouge moyen.

Le second semestre a plutôt été consacré à la prise en main de l'appareil avec la réalisation de test et l'acquisition de spectres d'échantillons que nous avons en stock (cf. point 3)

Au cours de l'automne 2012, nous avons rencontré un certain nombre de problèmes techniques sur l'appareil, qui ont nécessité plusieurs interventions de la société Perkin. Ceci a ralenti la progression du projet pour la partie spectroscopie. Au cours de l'année 2013, l'utilisation du spectromètre par des étudiants et des chercheurs s'est intensifiée pour atteindre un rythme de croisière plus conforme à nos attentes. Une bonne partie des objectifs de APOGEE ont pu être atteints tandis que des projets novateurs ont pu être démarrés (Froelicher 2013 ; Bell 2013 ; Vyslouzylová *et al.* 2013). La dynamique de recherche que nous espérons créer grâce à ce nouvel équipement est bien réelle même si elle a démarré un peu plus tard que prévu.

4.2.2. ELARGISSEMENT DU REFERENTIEL DE SURFACE PROCHE INFRAROUGE

Un référentiel « de surface » associant spectre proche infrarouge de la matière organique des cinq premiers centimètres de sol et type de végétation existait au démarrage du projet (Ertlen, 2009 ; Ertlen *et al.*, 2010). La librairie spectrale qui couvrait 50 sites avait été acquise sur un autre spectromètre. En l'état actuel de la technologie proche infrarouge, il n'est pas possible d'héberger et de comparer au sein d'une même librairie des spectres provenant de spectromètres différents, même à gamme spectrale équivalente. Pour cette raison, nous avons réalisé une nouvelle acquisition des spectres sur le spectrum 400 (PerkinElmer).

SITES SUPPLEMENTAIRES

Aux 50 sites initiaux du référentiel de surface, nous avons ajouté 34 sites dont 24 dans le cadre d'une thèse (Vyslouzylová, en cours), 4 dans le cadre d'un stage de master (Froehlicher, 2012) et 6 dans le cadre de divers projets (Ertlen). Nous disposons maintenant d'une librairie spectrale homogène de 84 sites couvrant une large gamme de végétations représentatives des écosystèmes tempérés (Fig. 10). La distinction entre les sites sous forêts et les sites sous prairies est effective quelle que soit l'origine des échantillons. Malgré l'élargissement du référentiel et l'augmentation de l'hétérogénéité de celui-ci, les séparations sont toujours efficaces. Nous pouvons cependant noter que la distance entre les deux pôles (distance de Mahalanobis lorsqu'il s'agit d'une analyse discriminante) diminue légèrement lorsque l'hétérogénéité augmente. Dans le cadre d'autres programmes, nous avons démarré le référencement d'écosystèmes arides et méditerranéens qui pourront si cela s'avère pertinent être comparés au référentiel existant.

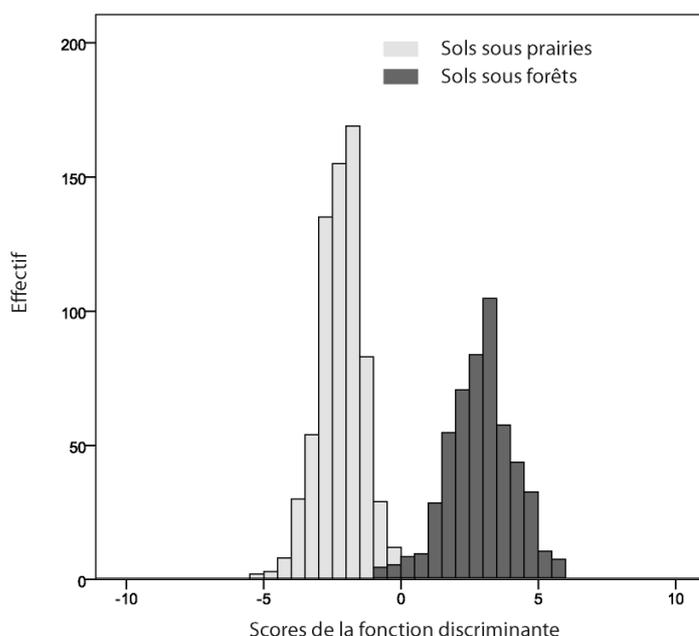


Figure 10 : scores de la fonction canonique discriminante entre sols sous prairies et sols sous forêts pour le référentiel de surface (84 sites en Europe tempérée, 1363 échantillons)

ELARGISSEMENT DU REFERENTIEL AUX MILIEUX CULTIVES

La faiblesse de notre méthode résidait dans l'absence de milieux cultivés dans le référentiel. Cette lacune était principalement due à une problématique initialement centrée sur la dynamique de l'écotone forêt/prairie et à la difficulté de trouver des horizons de sols cultivés de référence correspondant à nos critères de sélection (stabilité du système sur 150 ans). En effet, la stabilité des systèmes de culture ne peut être estimée à cette échelle temporelle notamment, et le raisonnement par actualisme délicat avec la généralisation de la

monoculture. En résumé, les systèmes de culture actuels ne peuvent être comparés (et servir de référence) aux systèmes anciens. Le travail de master de L. Froehlicher (2013) a permis de combler cette lacune en intégrant dans le référentiel des échantillons de colluvions agricoles historiques considéré comme référence. L'hypothèse qui prévaut est que la MOS des colluvions agricoles a une signature spectrale de cultures même si le sol n'est plus en place. En raison des assolements largement pratiqués autrefois, nous faisons l'hypothèse qu'aucune plante particulière ne prédomine, et que la MOS a donc un signal « culture » moyenné. Pour conforter l'hypothèse, la base des colluvions (peut-être marquée par une signature « forêt » ou « prairie » du sol avant sa mise en culture) et leur sommet (peut-être contaminé par bioturbation par des M.O.S. récentes) ont été écartés des échantillons devant servir de référence. Les analyses discriminantes ont permis de distinguer cette catégorie des deux autres catégories (Fig. 11). Une validation a été effectuée ultérieurement sur quelques échantillons indépendants, dont on savait qu'ils provenaient de niveaux/sites qui avaient été cultivés dans le passé. Ces échantillons se sont toujours rangés dans la catégorie « colluvions agricoles » (sous-entendu : sols cultivés), ouvrant les perspectives très intéressantes pour l'avenir.

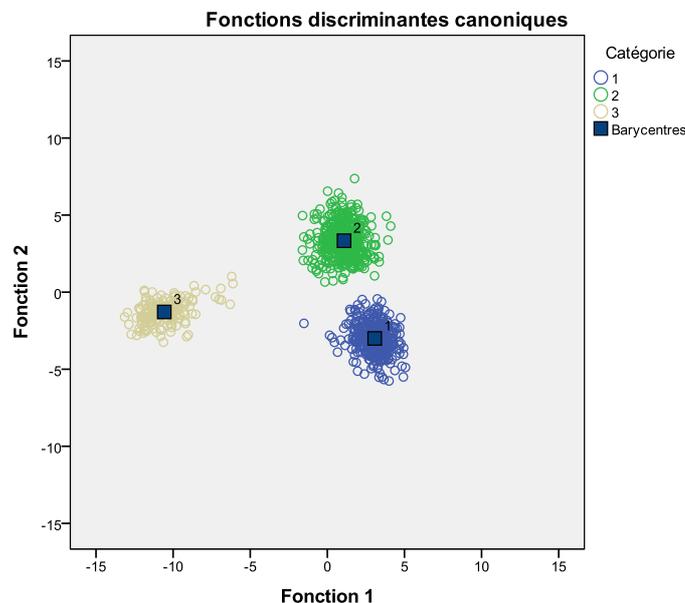


Figure 11 : Scores des deux fonctions canoniques discriminantes. 1 sol sous prairie, 2 sol sous forêt, 3 colluvions agricoles

Ce nouveau référentiel est en effet fondamental. De facto, le référentiel bi-partite forêt – prairie ne peut s'appliquer que dans des milieux dans lesquels le couvert végétal a toujours oscillé entre ces deux pôles. En effet, dans le cas où la MOS de certains horizons du sol aurait une signature de sol cultivé, le traitement statistique effectué sur la base d'un référentiel bi-partite aboutirait automatiquement à ranger ces échantillons dans la classe, « forêt » ou « prairie », dont ils seraient les moins éloignés. Le référentiel tripartite élimine donc un risque de biais tout en donnant une précision supplémentaire sur les couverts végétaux.

4.2.3. ANALYSE DES PROFILS DE SOL PAR SPIR

ASPECTS METHODOLOGIQUES

A la différence de l'approche par biomarqueurs, la spectroscopie proche infrarouge fournit une image de la matière organique totale. C'est pourquoi certains résultats peuvent apparaître comme contradictoires par rapports à ceux énoncés dans la partie biomarqueurs. Ceci ne remet pas nécessairement en cause la fiabilité de tel ou tel résultat mais invite à s'interroger sur des dynamiques différenciées en fonctions des différents compartiments chimiques ou physiques du sol.

ASPECTS CHRONOLOGIQUES

Pour approcher une datation des changements de végétation observés sur certains profils nous sommes basé sur un modèle simple de décroissance de l'âge des matières organique (Jenkinson 1966, modifié par Schwartz *et al.*, 1996) :

$$Q_{zr} = Q_{z0} \cdot e^{-t / TMRz}$$

avec Q = matière organique total supposée constante = $Q_f + Q_p$

Q_f la matière organique d'origine forestière

Q_p la matière organique d'origine prairiale

Q_r la matière organique résiduelle (Q_f ou Q_p selon le scénario)

z la profondeur

t la date du changement de végétation

(d'après Schwartz *et al.* 1996)

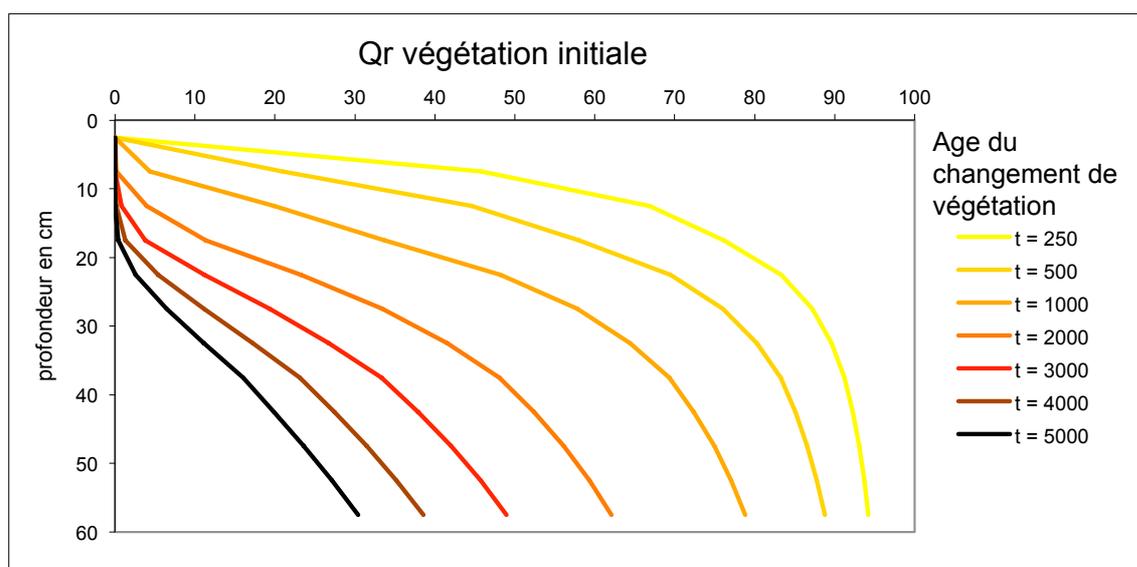


Figure 12 : Profils théoriques de matières organiques provenant d'un couvert végétal disparu en fonction de la date du dernier changement d'occupation du sol.

Ce modèle nous permet d'obtenir les courbes théoriques de la matière organique provenant d'un type de couvert en fonction de la date du dernier changement d'occupation du sol (fig. 12). Son domaine d'application est, pour l'instant, restreint à des scénarios simples de changement de végétation unique d'un écosystème A à un écosystème B. Ceci n'est pour autant pas incompatible avec l'étude de scénarios plus complexes. Le modèle prendra en compte uniquement les changements de végétation majeurs ou les principales tendances. Ainsi, des changements concernant uniquement quelques années (coupe à blanc) ou quelques décennies (défrichement puis abandon rapide) ne seront pas pris en compte (sauf, s'ils sont récents, dans les horizons de surface). De toute façon ils seraient difficilement détectables, puisque la contribution de l'écosystème provisoire est minime plusieurs siècles plus tard. Il en est de même pour les écosystèmes pionniers qui ont pu s'installer temporairement entre la végétation A et B.

4.2.4. ETUDE DES 4 PROFILS DE SOL (FIG. 13 ET 14)

LE PROFIL DE L'ELMERFORST

Situé dans une forêt attestée historiquement depuis près de 800 ans, ce site a toutefois été potentiellement perturbé par la présence d'un village médiéval disparu. Le signal clairement forestier en surface change rapidement pour tendre vers un signal prairial en profondeur. La modélisation de ce changement de végétation fondée sur les mesures du temps moyen de résidence de la matière organique totale permet d'estimer le dernier changement d'une prairie vers une forêt à environ 1000 ans.

La comparaison de ces résultats avec les biomarqueurs et leurs datations soulève plusieurs interrogations. Les profils lipidiques sont parfaitement constants entre la surface et la profondeur. Il convient donc de s'interroger sur la nature des changements observés par spectroscopie proche infrarouge. Existe-t-il d'autres fractions organiques, non lipidiques, qui sont affectées par d'autres processus et qui évoluent plus avec la profondeur ? L'évolution du signal proche infrarouge est-il trop inféodé à la quantité de matière organique ? Les datations de fractions spécifiques de la matière organique invitent à remettre en question fortement le modèle d'âge proposé pour modéliser la date du dernier changement de végétation. Ainsi, même si nous restons confiant sur la capacité de la SPIR à détecter une occupation du sol ancienne, la question de sa datation reste en suspens.

LE PROFIL DU FALLIMONT

Le profil du Fallimont situé sur les Hautes Chaumes vosgiennes (1300 m) a déjà fait l'objet de plusieurs études paléo-pédologiques. La plus marquante est l'étude anthracologique qui a révélé la présence de charbon de bois datés de l'Age du Bronze (Goepf, 2007). Ainsi, la « primarité » des chaumes proposée par Carbiener (1964) est remise en question. On doit à cet auteur, en effet, la théorie que les pelouses situées au-

dessus de 1300 m d'altitude sont « primaires », c'est-à-dire qu'il s'agirait de milieux ouverts entièrement naturels, hérités de la dernière époque glaciaire, et qu'elles ne résulteraient donc pas de défrichements. Le profil obtenu en spectroscopie proche infrarouge présente un signal prairial en surface jusque vers 50 cm puis tend légèrement vers un signal forestier. Ceci semble indiquer que malgré le caractère très ancien du changement de végétation et près de 3000 ans d'occupation par la prairie le signal forestier est encore perceptible en profondeur (Fig. 12). Entre 10 et 50 cm le signal est stable et très légèrement influencé par la forêt. Cette influence inattendue pourrait s'expliquer par la présence de nombreux ligneux bas (myrtille et callune) qui produisent un signal proche du signal forestier.

Ce profil est plus en accord avec les autres résultats du programme. Premièrement, la matière organique atteint des âges élevés en profondeur, y compris pour les fractions spécifiques. Deuxièmement les profils de biomarqueurs évoluent avec la profondeur avec une diminution du signal prairial de surface et quelques indices fugaces de couvert forestier (conifères ?) en profondeur.

LE PROFIL DE SALAJKA (CZ)

Le profil de Salajka situé dans une réserve intégrale du massif des Beskidy (République Tchèque) a été choisi pour la stabilité de sa végétation. Les arguments de stabilité sont principalement construits sur des observations écologiques et morphologiques. Certains n'hésitent pas à la considérer comme une forêt « primaire ». La succession d'au moins deux génération d'arbres de 250-300 ans est avérée, soit au moins 500 ans d'histoire forestière. Par ailleurs des tamisages ont révélé l'absence de charbon de bois dans ces sols. Le profil SPIR est forestier sur toute l'épaisseur du sol, conformément à nos attentes.

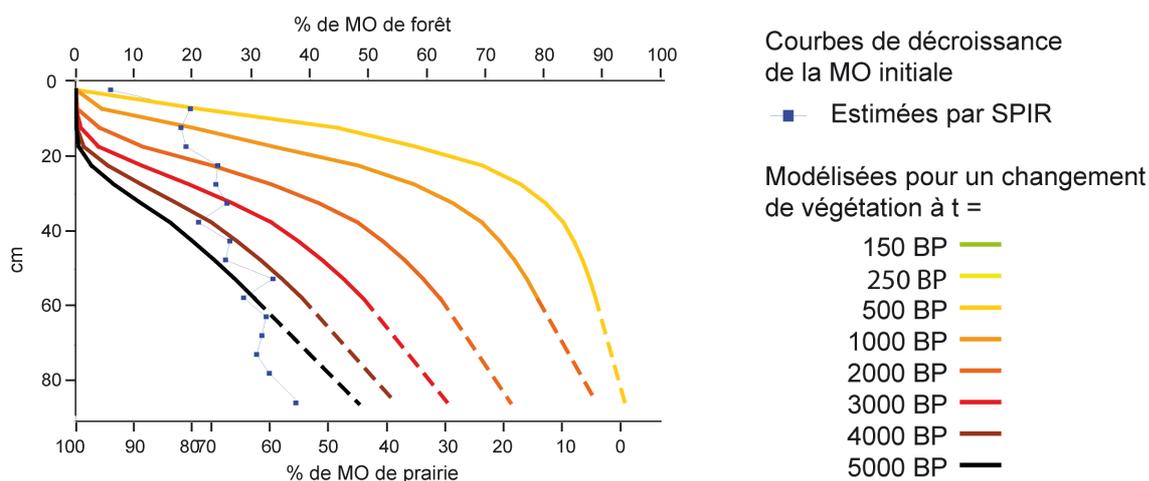


Figure 13 : Evolution du signal SPIR avec la profondeur pour le profil du Fallimont et modélisation d'un changement de végétation forêt/prairie.

LE PROFIL DE LA FORET DE WEGSCHEID

Le profil de Wegscheid est actuellement sous forêt; En 1760 il était sous pâturage comme l'atteste le plan de finage de l'intendance d'Alsace. Pour l'instant aucune étude paléoécologique n'est venue étayer ces constatations. Le profil SPIR a bien une tendance prairiale en profondeur.

La spectroscopie proche infrarouge fournit parfois des informations sur l'évolution du couvert végétal, là où les biomarqueurs sont absents ou modernes. Ceci pourrait signifier que d'autres compartiments chimiques, parfois plus récalcitrants, contribuent à distinguer les matières organiques en fonction de l'origine végétale. Cette distinction pourrait aussi s'opérer sur des différences de proportions d'éléments non marqueurs plutôt que sur des biomarqueurs bien identifiés.

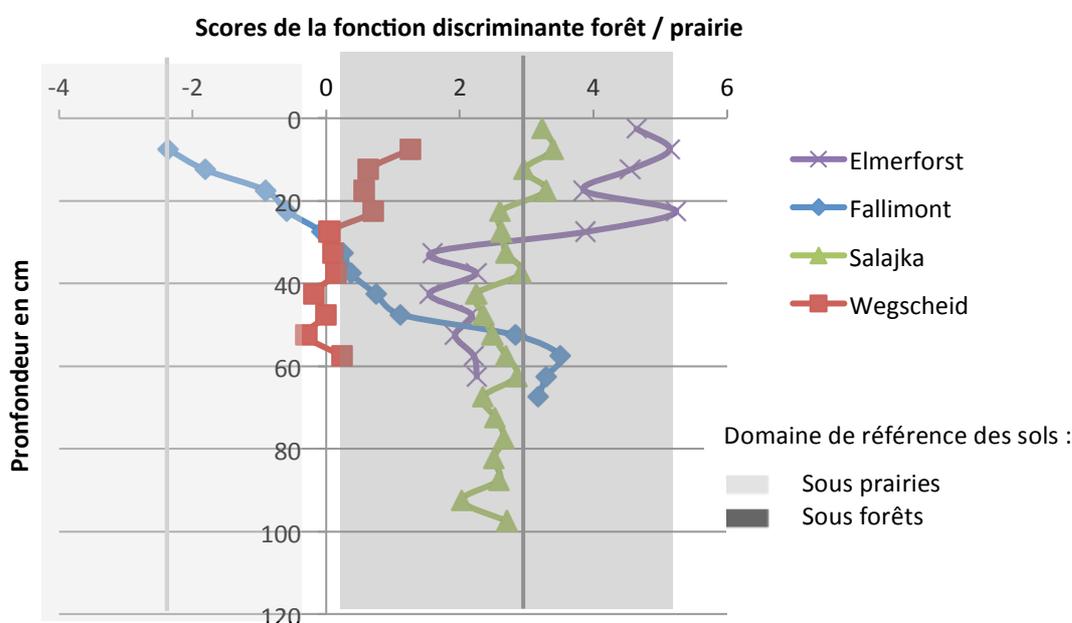
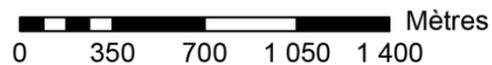
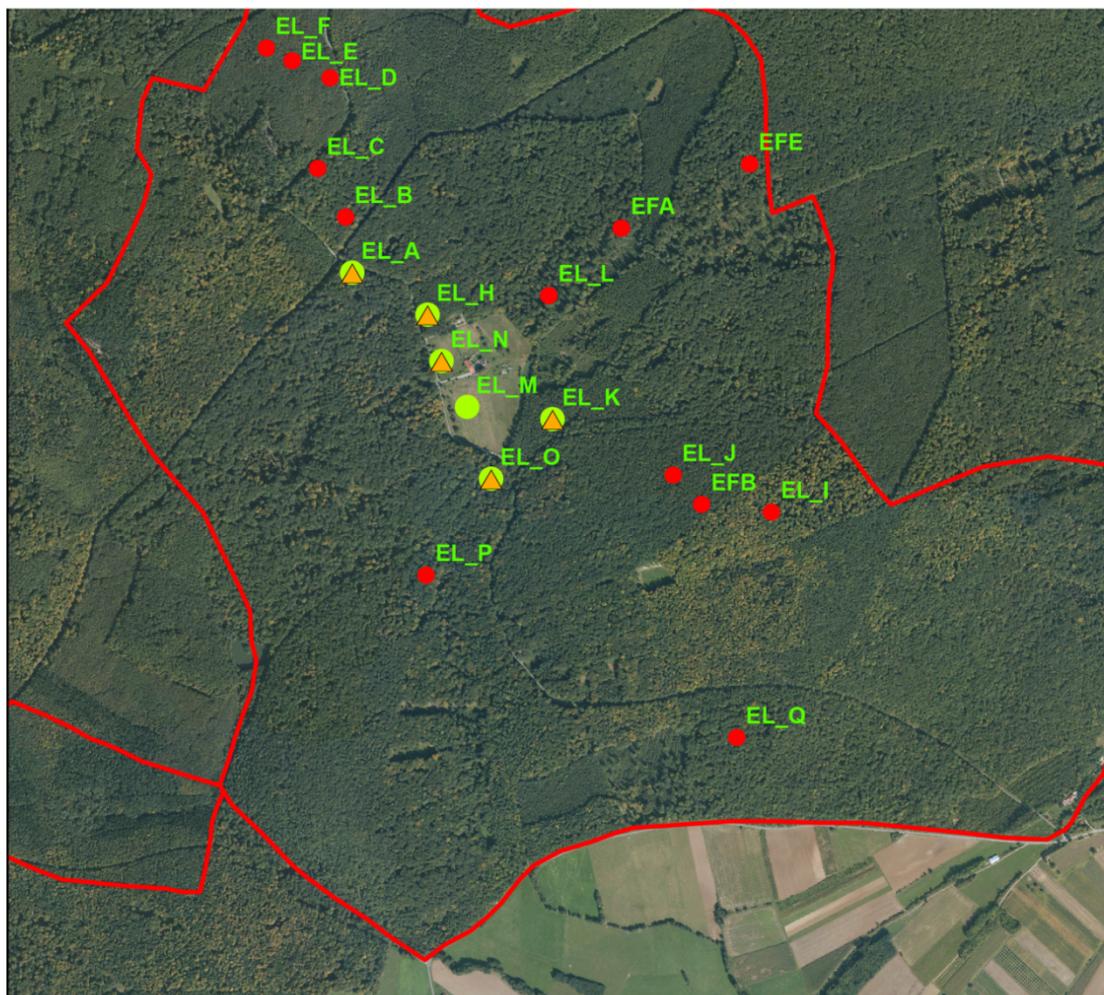


Figure 14 : Profils SPIR des quatre sols étudiés dans le cadre du programme GESSOL

AUTRES PROFILS DE SOL

A titre de tests, la SPIR a également été utilisée sur des sols non inclus dans le cadre d'APOGEE, mais la thématique traitée est la même. Il s'agit de chernozems, sols très représentés en Europe centrale (République tchèque, Hongrie,...) et de l'Est (Ukraine, Russie,...). Ces sols relativement caractéristiques des biomes continentaux sont censés s'être formés sous végétation de type prairial (steppes méditerranéennes, pampas, prairies américaines,...). Mais la question d'une formation ou d'une évolution ultérieure sous végétation forestière, comme celle de leur transformation en luvisol à l'Holocène en conséquence de leur envahissement par une végétation forestière ou de leur maintien en

chernozem par un défrichement précoce et la permanence d'une activité agricole est posée. Cette réflexion est au cœur d'une thèse en cours (B. Vyslouzilova), et la SPIR fait partie des méthodes employées pour y répondre. De nombreux profils ont été analysés dans ce cadre, dont plusieurs dans des réserves naturelles d'Europe centrale, et il semble bien qu'une partie au moins des végétations steppiques censées être « primaires » ne le soient pas. Il est difficile d'être plus affirmatif pour le moment, les résultats étant en cours de traitement.



Caractérisation des scores

-  Sites prairiaux/forestiers présentant un signal "culture" en profondeur
-  Sites présentant une évolution du couvert du type forêts/prairies
-  Sites ne présentant aucune évolution du couvert végétale
-  Limite de la forêt de L'Elmerforst

Figure 15 : Carte des profils étudiés par SPIR et évolution du signal avec la profondeur sur le site de l'Elmerforst

4.2.5. SPATIALISATION DES RESULTATS : LE SITE DE L'ELMERFORST

Sur le site forestier de l'Elmerforst, en plus du profil EFE sur lequel nous avons concentré une partie des moyens du programme APOGEE (biomarqueurs, SPIR, datations) nous avons prélevé en 2011/2012 dix-sept profils de sols répartis sur l'ensemble du terroir. Au cœur de ce terroir se trouve un village médiéval disparu qui fait l'objet de fouilles archéologiques depuis plusieurs années (Dottori, 2011). L'objectif, en concertation avec B. Dottori, était de retrouver les traces de modifications du couvert végétal en relation avec l'exploitation agricole de ce terroir. Pour cela l'ensemble des profils ont fait l'objet de mesures par spectroscopie proche infrarouge et ont été confrontés au référentiel de surface. Les premiers essais (Froehlicher, 2012) intégraient uniquement le référentiel de sites sous forêt et sous prairies. Ils étaient plutôt décevants et ne permettait pas de dégager clairement des secteurs avec un signal autre que le signal forestier actuel. Dans une seconde phase (Froehlicher, 2013) nous avons confronté les spectres des profils à un référentiel intégrant des références de sols cultivés. Ce deuxième essai s'est avéré bien plus fructueux puisque plusieurs profils situés à la périphérie proche du site archéologique présentent en profondeur un signal de sols cultivés (fig.15). Pour confirmer ces résultats nous avons également effectué environs 200 tests de phosphore qualitatifs répartis sur le terroir (Mocquot, 2013). Ces tests montrent un enrichissement relatif dans un périmètre équivalent à la périphérie cultivée.

Compte-tenu des connaissances historiques et archéologiques du site, nous avons de bonnes raisons de penser que ces traits pédologiques sont associés à l'utilisation médiévale du terroir. Cependant ces signaux ne sont pas datés ou avec une résolution temporelle médiocre. Le fait de disposer de résultats bien spatialisés et qui coïncident avec l'occupation médiévale procure un argument chronologique supplémentaire qui compense partiellement les limites temporelles des archives pédologiques dans les sols fonctionnels.

4.2.6. L'INFRAROUGE MOYEN

L'infrarouge moyen ne constituait pas une priorité méthodologique pour nous, cependant il nous a déjà permis en marge du programme de démarrer deux pistes de recherche

IDENTIFICATION D'OXALATES DE CALCIUM

Une collaboration s'est déroulée avec une équipe de géochimistes (LhyGeS, UMR7517 CNRS/UdS) autour de la problématique des isotopes du calcium dans les feuilles et les sols. L'objectif de ce projet piloté par A.D. Schmitt, (LhyGeS, UMR 7517) est de mieux comprendre les mécanismes qui régulent la biodisponibilité du Ca, son prélèvement et sa translocation au sein des végétaux, son recyclage au sein du sol afin de prédire l'évolution des écosystèmes naturels suite aux perturbations liées aux activités humaines. A l'aide d'une approche isotopique couplée Ca-Sr, il s'agit d'identifier le potentiel des arbres en tant qu'archives paléoenvironnementales des teneurs en nutriments de sols, à des échelles

temporelles pluridécennales. Pour ce faire, des comparaisons ont été effectuées entre des prélèvements par cernes d'arbres en milieu naturel avec des expérimentations en milieu contrôlé.

C'est sur l'expérimentation en milieu contrôlé que nous sommes intervenus. Les échantillons provenant de différents organes ont été analysés par spectroscopie moyen infrarouge et les différentes formes d'oxalates ont pu être identifiées. Dans la continuité de ces essais, nous allons analyser les organes du hêtre et des échantillons de sol. Ce programme même s'il diffère du programme APOGEE par ses objets d'étude (isotopes du Ca contre matières organiques du sol) demeure complémentaire dans la mesure où il tente de comprendre le fonctionnement du sol et son potentiel d'archivage paléo-environnemental.

TESTS D'IDENTIFICATION DE CHARBONS DE BOIS EN SPECTROSCOPIE MOYEN INFRAROUGE QUALITATIVE
(WILT 2011)

Un premier test a consisté à identifier des charbons de bois. Un set de calibration de charbons a été réalisé au laboratoire par carbonisation, en conditions contrôlées (durée et température) sur une vingtaine d'essences ligneuses différentes. Plus de 500 charbons ont ainsi été fabriqués pour constituer la banque de données de référence. Le test a été très positif sur des charbons de bois actuels, fabriqués pour la circonstance. La corrélation avec des charbons actuels « inconnus » est excellente. Le spectre moyen infrarouge de ces charbons a ensuite été comparé à une première série de charbons de bois archéologiques d'âges variés, identifiés par les méthodes classiques de l'anthracologie. Les résultats sont alors moins probants (Wilt, 2011). Ceci est peut-être lié à une altération des charbons dans les sols. Les tests n'ont pas été davantage poussés à cette heure.

5. REFLEXIONS SUR LES TEMPORALITES MISES EN EVIDENCE

Comme cela a été indiqué dans le paragraphe 4.1., les résultats des datations ^{14}C par AMS « MICADAS » sont quasiment les premières obtenues dans le monde sur des molécules individuelles isolées dans des matières organiques pédologiques. Il n'y a donc aucune comparaison possible avec d'autres travaux, et donc une absence de recul pour l'interprétation.

Rappelons également, qu'au même titre que pour la MOS totale, les datations ^{14}C sur fractions lipidiques ou molécules individuelles doivent s'interpréter en terme de temps moyen de résidence (TMR), c'est-à-dire d'espérance de vie de ces molécules entre leur entrée (par décomposition des matières organiques fraîches) et leur sortie (par dégradation et/ou minéralisation des produits humifiés) du sol. Ce TMR dépend de nombreux facteurs propres aux molécules concernées (stabilité chimique, susceptibilité à la biodégradation,...), et aux conditions édaphiques (pH, composition granulométrique, activité biologique,...) et environnementales (pluviosité, température, couvert végétal,...). Ceci dit, les résultats obtenus permettent pour le moins de poser quelques éléments importants.

- Il est clair que le comportement de la fraction lipidique ne reflète pas celle de la MOS totale. On peut en première hypothèse supposer que la stabilité de cette fraction lipidique est différente de celle de la MOS. Il semblerait que, à l'inverse de ce qui est souvent dit dans la littérature (cf. paragraphe 4.1.), bon nombre de ces constituants soient en fait peu stables. L'absence de biomarqueurs de végétation prairiale, dont la présence est pourtant documentée par les archives historiques et par la NIRS il y a 250 ans à Wegscheid, ou encore les TMR très jeunes de l'Elmerforst plaident par exemple en ce sens. Par ailleurs, il ne faut pas oublier un autre facteur. Les TMR de la MOS totale couvrent l'ensemble de l'histoire du sol, du début de sa formation à son fonctionnement actuel. Cela n'est pas le cas de certaines molécules individuelles. Ainsi, à Wegscheid, la forêt ayant succédé à la prairie il y a moins de 250 ans, il est vain d'attendre que les TMR de composés lipidiques spécifiques de la forêt actuellement présente soient supérieurs à 250 ans, quelle que soit la profondeur à laquelle l'échantillon aura été prélevé, alors que la MOS totale pourra avoir un TMR > 1000 ans dans les horizons profonds (analyses encore en cours). Plus généralement, pour un sol donné, et à une profondeur donnée, si T0 est le début de la pédogenèse, T0e, le début de la phase d'installation d'un écosystème E donné, T1e, celui de son remplacement par un autre écosystème et Ta l'époque actuelle, le TMR de la matière organique totale sera obligatoirement compris entre T0 et Ta, celui d'une molécule individuelle caractéristique de l'écosystème E sera compris entre T0e et T1e. Qu'il y ait des différences de TMR entre fraction lipidique totale, molécules individuelles et MOS totale est donc une règle tout à fait normale
- Cette règle ne préjuge pas –dans l'absolu- de la stabilité des lipides. En effet, si on prend l'exemple d'un écosystème installé depuis un temps relativement court (quelques décennies, quelques siècles) et qu'on applique la règle précédente, le TMR d'une molécule individuelle spécifique de cet écosystème ne pourra pas être supérieur, *de facto*, à la durée écoulée depuis son installation, même si cette molécule est particulièrement stable. La durée écoulée peut très bien être de loin inférieur au temps nécessaire pour qu'un équilibre entre entrées et sortie du compartiment organique du sol ne soit pas encore établi.
- Ces restrictions posées, il faut quand même noter que dans un certain nombre de cas, il est possible de trancher. Ainsi, sur l'Elmerforst, la présence d'une forêt de feuillus est attestée depuis au moins 800 ans. Que le TMR de molécules spécifiques du chêne, comme la friedeline, soit très moderne, démontre à l'évidence que, au moins dans les conditions locales, cette molécule est très dégradable... et n'est donc pas un bon marqueur paléoenvironnemental. Ceci est vrai quel que soit le mode d'apport au sol, par lixiviation de molécules provenant des écorces, ou par incorporation directe en profondeur de molécules provenant de racines décomposées. Pareillement, l'absence à Wegscheid de molécules lipidiques spécifiques des végétations prairiales présentes, on le rappelle, il y a moins de 250 ans, démontre que la stabilité de ces molécules est également faible dans les conditions locales.

- A l'inverse, le fait que sur le Fallimont certaines molécules individuelles aient un TMR très élevé prouve que la proportion de molécules modernes est très faible. Rappelons en effet que le TMR est une « moyenne » non arithmétique dans laquelle les fractions modernes déplacent considérablement le barycentre vers le récent. A titre d'exemple très simplifié, un mélange équipondéral de charbons de bois fabriqués en 1950 (année « 0 » du calendrier BP) et d'antracite du Carbonifère (325 millions d'années) aura un âge moyen de 5730 ans (période du 14C). Clairement, un TMR supérieur au millénaire pour certaines molécules dans ce sol atteste de la stabilité des molécules en question. Pourtant, des transferts de matière organique, depuis la surface, sous forme de complexe organo-métallique (liée à du fer et de l'aluminium) sont avérés analytiquement dans ces sols qualifiés de « rankers cryptopodzoliques ». Ces transferts sont susceptibles d'enrichir les horizons profonds du ranker en molécules jeunes. Le TMR élevé démontre qu'elles ne sont pas majoritaires, et donc que certaines fractions lipidiques sont susceptibles d'être préservées sur le long terme.

Ainsi, ces premières analyses démontrent la nécessité de poursuivre ce type d'étude pour identifier des molécules qui soient (1) spécifiques de végétations données et (2) susceptibles de vieillir dans les sols.

6. IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- Implications pratiques :

Le côté pionnier des recherches entreprises dans le cadre d'APOGEE ne permet pas encore d'envisager des implications pratiques de grande ampleur. Les données obtenues sont encore lacunaires et il est donc impossible d'établir des lois « générales ». Ceci est notamment le cas pour les datations de composés individuels, dont le comportement diffère notablement selon les sols. En revanche, sur le plan méthodologique, en spectroscopie proche infrarouge, le fait d'avoir pu compléter la base de données forêt-prairie par un référentiel de sols cultivés permet d'envisager des interprétations paléoenvironnementales plus fiables dans l'avenir sur les profils complets de sols en situation d'avoir été à un moment donné de leur histoire cultivés. Par ailleurs, les travaux effectués à partir de l'extrait lipidique des sols ont conduit à la mise au point de procédés analytiques applicables dans le futur dans le cas d'autres types de sols, permettant ainsi l'isolement de composés individuels à partir de mélanges complexes et donnant accès à la détermination de leur TMR.

- Recommendations :

Il importe donc dans un proche avenir de compléter les études effectuées dans le cadre du présent programme. Cela étant, le potentiel représenté par les archives pédologiques en tant qu'outil de meilleure gestion des écosystèmes est réel. Il est important de sensibiliser les gestionnaires du milieu à ce fait, en insistant sur les points suivants :

- les utilisations passées d'un écosystème et d'une manière générale tous les événements qui s'y sont déroulés peuvent rester inscrits durablement dans la composition floristique et faunistique, la structure des populations, la biodiversité, à des échelles de temps largement pluriséculaires ;
 - le fonctionnement actuel de ces systèmes s'inscrit dans une dynamique sur le long terme, qu'on qualifiera de trajectoire temporelle. Ces trajectoires se traduisent de façon tout à fait normale par des évolutions. La « stabilité » écosystémique ou paysagère est un leurre ;
 - la connaissance du passé et des trajectoires temporelles des systèmes est un moyen de mieux les comprendre et donc un moyen d'anticiper/prévoir leur évolution et de mieux les gérer. Il est donc important pour les gestionnaires de pouvoir s'appuyer sur un socle de connaissance important dans ce domaine ;
 - les « archives » naturelles sont un des moyens de renforcer ce socle. Et parmi ces archives naturelles, les archives pédologiques ne sont pas à négliger. Certes plus difficiles à interpréter en terme de temporalités que les archives sédimentaires, elles ont l'énorme avantage d'être ubiquistes (la couverture pédologique étant généralisée) et le plus souvent locales, ce qui est fondamental à l'échelle de la gestion de sites dont l'extension est souvent de quelques milliers d'hectares.
- Réalisations pratiques et valorisation :

L'équipe APOGEE a tenu, dès la conception du programme, à y inclure un colloque de restitution ouvert à un public de gestionnaires. Une partie (5000 euros) du budget du programme avait été fléchée en ce sens. Ce colloque s'est tenu les 25 et 26 septembre 2013. De l'avis des participants, il a été un réel succès. Outre les résultats du programme, encore trop neufs pour pouvoir être appliqués dans l'immédiat, les intervenants ont présenté des études de cas permettant d'illustrer les recommandations soulignées ci-dessus. Le programme du colloque, le nom des intervenants, la nature et le nombre de participants sont détaillés dans les annexes du présent rapport.

Une cinquantaine de personnes ont participé à au moins une des deux journées du programme, ce qui est en soi appréciable, mais reste en deçà de nos espérances. Ceci s'explique en grande partie par le fait que se tenait la même semaine une réunion de travail sur un thème différent, mais qui a mobilisé de très nombreux gestionnaires de réserves naturelles. Un autre facteur à prendre en compte, est celui de la culture associative qui régit une partie des organismes de gestion des espaces naturels. Dans cette culture, on ne libère

pas facilement des techniciens pour qu'ils assistent à des colloques. Pour n'en prendre qu'un exemple, aucun technicien du Conservatoire des Sites Alsaciens, organisme local largement informé de (et intéressé par) la tenue de ce colloque n'a assisté aux journées. Le CSA a été représenté par sa Directrice scientifique et deux membres du Conseil d'Administration.

L'action que nous avons entreprise doit être considérée comme une phase préliminaire, de sensibilisation, de ce public spécifique. Pour étrange que cela paraisse, des concepts tels que «trajectoires temporelles des écosystèmes», «les archives pédologiques et leur intérêt» sont peu familiers d'une partie importante des gestionnaires. Ceux-ci ont dans l'ensemble été très intéressés par la thématique, mais la distinction était nette entre quelques organismes (en général plutôt des structures tels que les Parc Naturels) qui ont déjà été confrontés à de tels questionnements et les autres, pour lesquels le colloque a pu servir de prise de conscience, de détonateur : de nombreux participants nous ont fait part du fait que les exposés qu'ils ont entendus étaient pour eux quelque chose de réellement neuf, qu'ils ne connaissaient pas. Il est certain que pour que le message porte, il conviendra de réitérer de telles opérations à l'avenir.

Un frein identifié par ailleurs est celui des moyens financiers des gestionnaires. Ceux-ci sont de plus en plus réduits, notamment en ce qui concerne la part « investissement scientifique ». Dès lors, même s'il existe la volonté de mettre en application des idées tirées de la thématique exposée lors du colloque, il devient difficile de passer au stade concret du travail de recherche effectif. A titre d'exemple, il y a quelques années, le Parc Naturel régional des Ballons des Vosges a largement financé le volet scientifique (terrain, analyses) de la thèse de S. Goepf sur l'origine des pelouses des Hautes-Vosges, étudiée sur la base d'une approche pédoanthracologique. De l'avis même des responsables scientifiques du Parc, il n'est pas sûr que cette opération puisse être possible actuellement.

Pour ce qui est de l'avenir, ce colloque et les discussions informelles qui ont pu être nouées à cette occasion ont aussi été pour les organisateurs l'occasion de réfléchir aux moyens les mieux appropriés pour faire le lien entre recherche et « société civile » dans le domaine de la gestion/protection des milieux remarquables. Voici quelques pistes que l'on peut évoquer :

- En ce qui concerne le contact oral, une réflexion doit porter sur le type de manifestation le plus appropriée. Le colloque/réunion de travail n'est peut-être pas la forme la plus appropriée vis-à-vis d'un public qui ne fréquente pas toujours ces lieux (cf. la remarque sur le fait que les techniciens ne sont pas toujours libérés à cet effet). Ils n'en demeurent pas moins indispensables, à condition peut-être de les organiser avec une certaine rythmicité (tous les 2 ans ?) et peut-être hors murs. Où tenir alors les débats : dans les locaux d'une structure partenaire ? mais peu de structures possèdent en propre des salles adaptées, et la location de salles extérieures coûte cher. Pour des raisons symétriques, les conférences tardives le soir ne sont pas efficaces : elles ne peuvent porter que sur un public (a) local (b) de passionnés. Il n'est pas certain que des techniciens se déplacent en masse pour cela en dehors de leurs heures de travail. Une solution pourrait être la tenue de réunions de travail spécifiques au sein de structures demandeuses et identifiées. Une proposition a été faite en ce sens à la Directrice Scientifique du CSA, pour une présentation de la

thématique « archives pédologiques » aux techniciens de la structure sur leur lieu de travail (sans réponse pour l'heure). Il est toutefois clair que de telles actions sont limitées par la disponibilité en temps des intervenants, et par le fait que le déplacement au sein des structures éloignées doit être financé. Une dernière idée est d'organiser de sessions de formation concentrées sur quelques jours, auxquelles le personnel des structures de gestion conservatoire des milieux pourrait participer dans le cadre de la formation permanente. Enfin, il est indispensable, de temps en temps, de participer à des Journées d'Etudes régionales organisées par des structures diverses (Sociétés Philomatiques, Sociétés savantes locales, Associations diverses).

- En ce qui concerne la transmission par l'écrit, il est clair qu'il est nécessaire de produire de la littérature qui sorte du cadre strict des circuits scientifiques classiques : journaux associatifs, revues de vulgarisation tels que « La Recherche », « Pour la Science », revues d'association (la Revue du Club Vosgien est lue par plus de 30000 membres, passionnés de nature,...). Un support à privilégier est sans doute celui des monographies régionales qui sont encore éditées régulièrement à l'occasion de journées d'étude qui se tiennent très fréquemment. Ces ouvrages sont très lus localement et régionalement, et bien connus par un public de naturalistes, d'historiens, d'historiens des paysages et de gestionnaires de milieux naturels. L'article de Schwartz et al. (2014, sous presse – cf. infra) est un essai en ce sens. Le frein ici est celui de la volonté des scientifiques de publier dans de tels supports non valorisés en termes de progression de carrières, notamment pour les jeunes qui doivent construire leur dossier scientifique.
- Un autre point devrait être développé : c'est de susciter davantage de contacts scientifiques entre organismes gestionnaires et scientifiques, par le biais de programmes de recherche nationaux les mettant explicitement en partenariat sur des appels d'offre spécifiques. En période de restrictions budgétaires, cette proposition a sans doute peu de chances d'être entendue...

7. PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES

La collaboration entre le Laboratoire de Biogéochimie Moléculaire (UMR 7177, Institut de Chimie) et l'équipe Dynamique des Paysages (UMR 7362, LIVE) est antérieure au programme APOGEE. Plusieurs programmes préalables (dont un programme EC2CO de l'INSU) ont permis de la mettre en place. Le financement par le MEDDE – GESSOL d'APOGEE a toutefois conféré à cette collaboration une autre dimension et scellé les bases d'un rapprochement thématique plus étroit. En revanche, la collaboration avec deux équipes de l'ETH de Zurich (Geologisches Institut – Prof. S. Bernasconi et Lab. of Ion Beam Physics – Dr. I. Hajdas) est nouvelle, sur la thématique de datation de molécules pédologiques. Elle est appelée à se développer, ce « consortium » présentant un projet d'ANR destiné à prendre le relais de GESSOL qui n'ouvre pas d'appel d'offres en 2014.

8. PUBLICATIONS DANS LE CADRE DU PROJET

Articles :

Trendel J.M., Schaeffer P., Adam P., Ertlen D. et Schwartz D., 2010. Molecular characterisation of soil surface horizons with different vegetation in the Vosges Massif (France). *Organic Geochemistry* **41**, 1036-1039.

Chapitres d'ouvrage :

Schwartz D., Goepp S., Ertlen D., Bastien C., Schaeffer P., Trendel J.M. et Adam P., 2014 (sous presse). Les défrichements anciens dans les massifs du Hohneck et du Rossberg. Une histoire revisitée des Hautes-Chaumes vosgiennes. In : J.P. Rothiot (éd.), Actes 15^e Journées d'Etude vosgiennes. Presses Universitaires de Lorraine, p. 89-106.

(N.B. : peut être considéré comme un ouvrage de vulgarisation à l'attention des naturalistes ; sera très lu dans les milieux des organismes de gestion conservatoire de sites naturels).

En préparation et en gestation :

- Un article de référence (pour Science ?) Détermination de temps moyens de résidence de différents compartiments organiques et molécules individuelles du sol ; implications sur la stabilité des matières organiques et les processus de transfert.
- Potentiel des biomarqueurs lipidiques dans les sols en tant qu'archives paléoenvironnementales à la lumière de leurs distributions et de leur temps moyen de résidence dans des profils de sol contrastés (*Organic Geochemistry*)
- Froehlicher L., Dottori B., Ertlen D., Schwartz et al., en préparation. Le décryptage des occupations du sol anciennes : apports des archives pédologiques à la reconstruction du terroir agricole du village disparu de l'Elmerforst. Pour : *Journal of Archeological Science*.
- Ertlen D., et al., (Vyslouzilova, Froehlicher, Schwartz, Trautmann), in preparation. Discriminating between organic matter from grassland forest and cultivated soil by NIR-spectroscopy: analyze of a wide set of spectra from 84 sites in temperate Europe.
- Ertlen D., et al., (Adam, Schaeffer, Schwartz...), Vegetation signature in soil organic matter: comparison of near infrared spectroscopy analysis with a referential of lipidic biomarkers
- Au moins un article de vulgarisation

Communications orales

Bastien C., Bernasconi S., Trendel J.M., Adam P., Schaeffer P., Ertlen D., Gierga M. et Schwartz D., 2012. Les biomarqueurs moléculaires dans les sols et leur potentiel en

- tant qu'archives paléoenvironnementales. 1ère Réunion Annuelle des Géochimistes Organiciens Français, Orléans, 30-31.08.2012.
- Ertlen D., Schwartz D. et Brunet D., 2012. Modélisation des dynamiques de la végétation fondée sur l'analyse de profils de sols par spectroscopie proche infrarouge. 11^{èmes} Journées d'Etudes des Sols – « Le sol face aux changements globaux », Versailles, 19-23/03/2012.
- Froelicher L., Vyslouziloval B., Ertlen D. et Schwartz D., 2014. L'apport des colluvions agricoles dans la reconstitution des dynamiques paysagères à partir de la méthode de la Spectroscopie dans le Proche InfraRouge (SPIR) qualitative. Comm. 12° JES, Chambéry, juillet 2014.
- Liaud C., Bastien C., Bernasconi S., Trendel J.M., Adam P., Schaeffer P., Ertlen D., Gierga M. et Schwartz D., .2012. Premières mesures ¹⁴C du TMR de biomarqueurs moléculaires dans les sols : quelles conséquences sur leur potentiel comme archives paléoenvironnementales ? 11^{èmes} Journées d'Etudes des Sols – « Le sol face aux changements globaux », Versailles, 19-23/03/2012.
- Schaeffer P. et les membres du programme APOGEE, 2011. APOGEE. Les archives pédologiques, un outil pour la gestion des écosystèmes. Séminaire de suivi GESSOL 3, Tours, 16-18 mai 2011.
- Schaeffer P., Ertlen D. et l'ensemble du Groupe Apogée (Stefano Bernasconi, Merle Gierga et Irka Hajdas – ETH Zurich ; Pierre Adam, Claire Bastien, Blandine Courel, Céline Liaud, Philippe Schaeffer, Jean Michel Trendel – UMR 7177, Strasbourg ; Damien Ertlen, Dominique Schwartz – UMR 7362, Strasbourg) : Principaux résultats du programme APOGEE : la signature des écosystèmes anciens dans les matières organiques des sols : approches par les biomarqueurs moléculaires, la spectrométrie proche infrarouge et les mesures d'âges moléculaires au ¹⁴C. Colloque de restitution Apogée : Le temps, les sols, la trajectoire temporelle des écosystèmes. Les archives pédologiques, outils d'aide à la décision pour la gestion des milieux remarquables, Strasbourg, 25-26 septembre 2013.
- Schwartz D. et les membres du programme APOGEE, 2012. APOGEE. Les archives pédologiques, un outil pour la gestion des écosystèmes. Séminaire de suivi de programme GESSOL 3, Paimpont, 7-9 novembre 2012.
- Schwartz D. et l'ensemble des membres du programme APOGEE, 2014. Les archives pédologiques : nouvelles approches en spectroscopie proche-infrarouge et sur les biomarqueurs moléculaires lipidiques. Les apports du programme GESSOL-APOGEE. Comm. 12° JES, Chambéry, juillet 2014.
- Vyslouzilova, B., Schwartz D., Sefrna L., Ertlen D. et Dreslerova D., 2013. Pedogenesis of chernozems in Central Europe. Communication XIIth International Symposium and Field Workshop on Paleopedology (IUSS) : Paleosols, pedosediments and landscape morphology as environmental archives (10-15th August 2013), Kursk, Russie.

Posters

- Bastien C., Liaud C., Courel B., Schaeffer P., Trendel J.M., Adam P., Gierga M., Bernasconi S.M., Ertlen D., Schwartz D. et Hajdas I., 2013. Investigating the mean residence time of soil organic matter : Are soil lipids reliable biomarkers. 26th International Meeting on Organic Geochemistry, Costa Adeje, Spain, 15-20.09.2013

- Courel B., Schaeffer P., Adam P., Bastien C., Ertlen D., Schwartz D., Bernasconi S.M. et Hajdas I., 2013. Distribution of isoprenoid and branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers from soil surface horizons and within three soil profiles. 26th International Meeting on Organic Geochemistry, Costa Adeje, Spain, 15-20.09.2013.
- Ertlen D., Schwartz D. et Brunet D., 2012. Near Infrared Spectra of soil organic matter as a tool to reconstruct past land use. Eurosoil, Bari, Italy, 2-6 juillet 2012.
- Vyslouzilova, B., Dreslerova D., Ertlen D., Schwartz D. et Sefrna L., 2012. Is chernozem relic of steppe vegetation? Eurosoil, Bari, Italy, 2-6 juillet 2012.

Mémoires de Master

- Bell J., 2013. Etude du potentiel d'archivage pédologique des structures néolithiques de type fente. Mémoire de M1, master GE, Université de Strasbourg, 60 p.
- Courel* B., 2013. Tétrathères de diglycérol dans les sols: Analyse, distributions, origines. Rapport de stage de master 2, spécialité sciences analytiques, Université de Strasbourg, Mars-Septembre 2013.
- Froehlicher L., 2012. Paléovégétations et impacts anthropiques sur le terroir du village disparu de l'Elbersforst. Mémoire de M1, master GE, Université de Strasbourg.
- Froehlicher L., 2013. L'apport des colluvions dans la reconstitution des dynamiques paysagères à partir de la méthode de la spectroscopie proche-infrarouge (SPIR). Mémoire de M2, master GE, Université de Strasbourg, 172 p.
- Liaud* C., 2011. Lipides biologiques dans les sols: caractérisation, modes de transformation et processus de transfert. Rapport de stage de master 2, spécialité sciences analytiques, Université de Strasbourg, Mars-Septembre 2011.
- Mocquot A., 2013. Etude quantitative de la teneur en phosphore du sol comme indicateur d'occupations humaines passées dans la forêt de l'Elmerforst. Mémoire M1 master GE, Université de Strasbourg, 74 p. + annexes.
- Wilt Y., 2011. Evaluation des limites d'une nouvelle méthode d'identification des charbons de bois par spectrométrie moyen infrarouge en vue d'applications géoarchéologiques. Mémoire de M2, master GE, Université de Strasbourg, 76 p.
- *: Rapports de Master 2 faisant également office de rapport de stage de l'école d'ingénieurs de Chimie, Polymères et Matériaux (ECPM, Strasbourg).

Références citées dans le rapport

- Avsejs, L.A., Nott, C.J., Xie, S., Maddy, D., Chambers, F.M., Evershed, R.P., 2002. 5-*n*-Alkylresorcinols as biomarkers of sedges in an ombrotrophic section. *Organic Geochemistry*, 33, 861-867.
- Bell J., 2013. Etude du potentiel d'archivage pédologique des structures néolithiques de type fente. Mémoire de M1, master GE, Université de Strasbourg, 60 p.
- Carbiener R., 1964. La détermination de la limite naturelle de la forêt par des critères pédologiques et géomorphologiques dans les Hautes-Vosges et le Massif Central. *C.R. Acad. Sc Paris*, 258, 11, 4136-4138.
- Courel B., 2013. Tétrahydrofur de diglycérol dans les sols: Analyse, distributions, origines. Rapport de stage de master 2, spécialité sciences analytiques, Université de Strasbourg, Mars-Septembre 2013.
- Diefendorf A.F., Freeman K.H., Wing S.L., Graham H.V., 2011. Production of *n*-alkyl lipids in living plants and implications for the geologic past. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75, 7472-7485.
- Dottori B., 2011. Elberforst (commune de Balbronn, Bas-Rhin) Histoire et archéologie d'un village aux périodes médiévale et moderne (XII^{ème}- XVIII^{ème} siècle). *Cahiers Alsaciens d'Archéologie et d'Histoire d'Alsace* 54: 79-105.
- Ertlen D., 2009. Archivage pédologique et dynamiques environnementales : Mise au point d'une nouvelle méthode de reconnaissance des paléovégétations fondée sur l'analyse spectroscopique dans le proche infrarouge (SPIR) des matières organiques des sols et des paléosols. Thèse, Université de Strasbourg, 382 p.
- Ertlen D., Schwartz D., Trautmann M., Webster R., Brunet D., 2010. Discriminating between organic matter in soil from grass and forest by near-infrared spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, 61(2): 207-216.
- Froehlicher L., 2012. Paléovégétations et impacts anthropiques sur le terroir du village disparu de l'Elbersforst. Mémoire de M1, master GE, Université de Strasbourg.
- Froehlicher L., 2013. L'apport des colluvions dans la reconstitution des dynamiques paysagères à partir de la méthode de la spectroscopie proche-infrarouge (SPIR). Mémoire de M2, master GE, Université de Strasbourg, 172 p.
- Goepp, S., 2007. Origine, histoire et dynamique des Hautes-Chaumes du massif vosgien. Déterminismes environnementaux et actions de l'Homme. Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 286 p.
- Huang, Y., Bol, R., Harkness, D.D., Ineson, P., Eglinton, G., 1996. Post-glacial variations in the distributions, ¹³C and ¹⁴C contents of aliphatic hydrocarbons and bulk organic matter in the three types of British acid upland soils. *Organic Geochemistry*, 24, 273-287.
- Lavrieux M., Jacob J., le Milbeau C., Zocatelli R., Bréheret J.G., Disnar J.R., 2011. Occurrence of triterpenyl acetates in soil and their potential use as chemotaxonomic markers of Asteraceae. *Organic Geochemistry*, 42, 1315-1323.

- Lavrieux, M., Breheret, J.G., Disnar, J.R., Jacob, J., Le Milbeau, CL., Zocatelli, R., 2012. Preservation of an ancient grassland biomarker signature in a forest soil from the French Massif Central. *Organic Geochemistry*, 51, 1-10.
- Liaud C., 2011. Lipides biologiques dans les sols: caractérisation, modes de transformation et processus de transfert. Rapport de stage de master 2, spécialité sciences analytiques, Université de Strasbourg, Mars-Septembre 2011.
- Lichtfouse, E., Eglinton, T.I., 2005. ^{13}C and ^{14}C evidence of pollution of a soil by fossil fuel and reconstruction of the composition of the pollutant. *Organic Geochemistry*, 23, 969-973.
- Melliou E., Magiatis P., Skaltsounis A.L., 2003. Alkylresorcinol derivatives and sesquiterpene lactones from *Cichorium spinosum*. *Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1289-1292.
- Mendez-Millan, M., Nguyen Tu, T.T., Balesdent, J., Derenne, S., Derrien, D., Egasse, C., Thongo, M'Bou, A., Zeller, B., Hatté, C., 2014. Compound-specific ^{13}C and ^{14}C measurements improve the understanding of soil organic matter dynamics. *Biogeochemistry*, 118, 205-223.
- Mocquot A., 2013. Etude quantitative de la teneur en phosphore du sol comme indicateur d'occupations humaines passées dans la forêt de l'Elmerforst. Mémoire M1 master GE, Université de Strasbourg, 74 p. + annexes.
- Mollenhauer, G., Rethemeyer, J., 2009. Compound specific radiocarbon analysis – analytical challenges and applications. Deep-sea to coastal zones: methods and techniques for studying palaeoenvironments. IOP Conference series: Earth and Environmental Science, 5, 012006 doi:10.1088/1755-1307/5/1/012006.
- Rethemeyer, J., Kramer, C., Gleixner, G., John, B., Yamashita, T., Flessa, H., Andersen, N., Nadeau, M.J., Grootes, P.M., 2005. Transformation of organic matter in agricultural soils. *Geoderma*, 128, 94-105.
- Ross A.B., Shepherd M.J., Schüpphaus M., Sinclair V., Alfaro B., Kamal-Eldin A., Aman P., 2003. Alkylresorcinols in cereals and cereal products. *Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4111-4118.
- Ruff M., Wacker L., Gäggeler H.W., Suter M., Synal H.A., Szidat S., 2007. A gas ion source for radiocarbon measurements at 200kV. *Radiocarbon*, 49, 307-314.
- Schouten S., Hopmans E.C., Sinninghe-Damsté J.S., 2013. The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: a review. *Organic Geochemistry* 54, 19-61.
- Schwartz D., de Foresta H., Mariotti A., Balesdent J., Massimba J.P., Girardin, C., 1996. Present dynamics of the savanna-forest boundary in the Congolese Mayombe : a pedological, botanical and isotopic (^{13}C and ^{14}C) study. *Oecologia* **106**: 516-524.
- Scognamiglio M., Fiumano V., D'Abrosca B., Pacifico S., Messere A., Esposito A., Fiorentino A., 2012. Allelopathic potential alkylphenols from *Dactylis glomerata* subsp. *Hispanica* (Roth) Nyman. *Phytochemistry Letters*, 5, 206-210.
- Synal H.A., Stocker M., Suter M., 2007. MICADAS: A new compact radiocarbon AMS system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 259, 7-13.
- Szakiel A., Nizynski B., Paczkowski C., 2013. Triterpenoid profile of flower and leaf cuticular waxes of heather *Calluna vulgaris*. *Natural Product Research*, 27, 1404-1407.
- Trendel J.M., Schaeffer P., Adam P., Ertlen D., Schwartz D., 2010. Molecular characterization of soil surface horizons with different vegetation in the Vosges Massif (France). *Organic Geochemistry*, 41, 1036-1039.

- Vyslouzilova, B., Schwartz D., Sefrna L., Ertlen D. et Dreslerova D., 2013. Pedogenesis of chernozems in Central Europe. Communication XIIth International Symposium and Field Workshop on Paleopedology (IUSS) : Paleosols, pedosediments and landscape morphology as environmental archives (10-15th August 2013), Kursk, Russie.
- Weijers J.W.H., Wiesenberg G.L.B, Bol R., Hopmans E.C., Pancost R.D., 2010. Carbon isotopic composition of branched tetraether membrane lipids in soils suggests a rapid turnover and heterotrophic life style of their source organism(s). *Biogeosciences*, 7, 2959-2973.
- Wilt Y., 2011. Evaluation des limites d'une nouvelle méthode d'identification des charbons de bois par spectrométrie moyen infrarouge en vue d'applications géoarchéologiques. Mémoire de M2, master GE, Université de Strasbourg, 76 p.

ANNEXES

ANNEXE 1 COLLOQUE APOGEE

ANNEXE 2 : POSTERS

ANNEXE 3 : RAPPORTS DE MASTER



Le temps, les sols, la trajectoire temporelle des écosystèmes

Les archives pédologiques, outils d'aide à la décision pour la gestion des milieux remarquables

Strasbourg, 25-26 septembre 2013

Colloque de restitution du programme APOGEE (les Archives Pédologiques, un Outil pour la Gestion des Ecosystèmes) financé par GESSOL-3 (MEDDE) et mené par des chercheurs du groupe *Dynamique des Paysages* (Laboratoire Image, Ville, Environnement - UMR 7362 CNRS/UdS), de l'équipe de *Biogéochimie Moléculaire* (UMR 7177, Institut de Chimie, UdS/CNRS) et du *Laboratory of stable isotopes and organic chemistry* (Geological Institute, ETH Zurich).

La dynamique des écosystèmes s'inscrit dans des trajectoires temporelles longues : l'observation de leur fonctionnement actuel ne suffit pas pour en comprendre la complexité, ni même pour en prévoir les évolutions futures. La gestion de ces milieux doit aussi pouvoir s'appuyer sur la connaissance du passé. Ce point est essentiel lorsqu'il s'agit de gérer et préserver des milieux remarquables. La connaissance du passé s'appuie le plus souvent sur des documents et archives historiques, ainsi que sur des études paléoenvironnementales fondées sur des archives sédimentaires et des proxys paléoécologiques. Les archives pédologiques sont relativement peu utilisées à ce dessein, alors que les constituants des sols offrent un fort potentiel de conservation de la mémoire passée des écosystèmes, à condition de savoir décrypter les particularités des modes d'archivages propres aux sols, milieux biologiquement actifs.

Au-delà des résultats du programme APOGEE, qui seront présentés ici, ce colloque est l'occasion de faire le point sur ces questions théoriques et de les illustrer par des exemples d'application variés. Ouvert à tous, il est toutefois principalement destiné aux gestionnaires des milieux naturels remarquables : Conservatoires de Sites, Parcs Naturels, Réserves Naturelles...

L'inscription est gratuite mais obligatoire. Elle ne comprend pas l'hébergement et les repas. Pour des questions pratiques, nous limitons le nombre de place à 100 participants. Le programme détaillé est joint à cet envoi. **Attention : la date limite d'inscription est fixée au 5 juillet 2013.** Les formulaires d'inscription sont à retourner par courrier électronique à dominique.schwartz@live-cnrs.unistra.fr.

La journée du 25 septembre est également ouverte en tant que module aux doctorants de l'Ecole doctorale ED 413 (STUES) – hors contingent des 100 places. Pour des raisons pratiques, la journée du 26 septembre n'est pas accessible à ce public.

Le temps, les sols, la trajectoire temporelle des écosystèmes

Les archives pédologiques, outils d'aide à la décision pour la gestion des milieux remarquables

Strasbourg, 25-26 septembre 2013

Colloque de restitution du programme APOGEE (les **Archives Pédologiques**, un **Outil** pour la **Gestion** des **Ecosystèmes**) financé par GESSOL-3 (MEDDE), à destination principalement des gestionnaires de milieux remarquables (Réserves Naturelles, Conservatoires de Sites, Parcs Naturels).

Inscription gratuite, mais obligatoire (nombre de place limité à 100 personnes). Comprend l'accueil et le transport en bus pour la visite de terrain.

Le colloque est également ouvert en tant que module aux doctorants de l'Ecole doctorale ED 413 (STUES)

25 septembre, Salle Pasteur, Palais Universitaire, Place de l'Université, Strasbourg

Tram C, arrêt Gallia (N.B. : le lieu sera confirmé ultérieurement)

9h00 – 9h30 : Accueil

9h30 – 10h15 : Dominique **Schwartz** (Univ. Strasbourg, UMR 7362) :
Les archives pédologiques : spécificités, intérêt, temporalités. Exemples d'application

10h15 – 11h00 : Jean-Luc **Dupouey** (INRA Nancy), Etienne Dambrine, Murielle Georges-Leroy et Laure Laüt :
La mémoire des forêts : passé agricole gallo-romain et biodiversité actuelle

Pause 11h – 11h15

11h15 – 12h00 : D. Etienne, Jean-Luc Dupouey, B. Hérault, Etienne **Dambrine** (Univ. Savoie) :
La biodiversité des mares forestières: une vision historique

12h00 – 12h45 : Benoit **Sittler** (Univ. Fribourg) & Dominique Schwartz :
Le laserscan aéroporté (LIDAR) au service de l'analyse des paysages, du passé agraire et de l'ancienneté des écosystèmes : exemples rhénans

12h45 – 14h00 Déjeuner

14h00 – 15h00 : Jean Marcel **Dorioz** (INRA Thonon) :

Les systèmes pastoraux des Alpes : évolutions séculaires et dynamiques actuelles. Caractéristiques pédologiques, systèmes agricoles et biodiversité des alpages

15h00 – 15h45 : Groupe Apogée (Stefano Bernasconi, Merle Gierga et Irka Hajdas – ETH Zurich ; Pierre Adam, Claire Bastien, Blandine Courel, Céline Liaud, Philippe Schaeffer, Jean Michel Trendel – UMR 7177, Strasbourg ; Damien Ertlen, Dominique Schwartz – UMR 7362, Strasbourg) :

Principaux résultats du programme APOGEE : la signature des écosystèmes anciens dans les matières organiques des sols : approches par les biomarqueurs moléculaires, la spectrométrie proche infrarouge et les mesures d'âges moléculaires au ¹⁴C

15h45 -16h30 : Yannick **Despert** et Claude Michel (PNR Ballons des Vosges)

La prise en compte des temporalités dans la gestion des espaces protégés. Aspects théoriques et exemples régionaux

16h30 – 17h00 : Pause

17h00 – 19h00 : Table-Ronde

26 septembre 2013

Sortie de terrain : massif du Hohneck (Histoire des Chaumes Vosgiennes) et Bollenberg (Histoire des collines sèches calcaires du secteur de Rouffach).

Repas de midi pris collectivement, mais à la charge des participants.

Départ de Strasbourg : 8 h ; retour aux alentours de 19 h



ETH

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich



Civilité	Nom	Prénom	Organisme
Mme	Vergne	Virginie	Univ. Lille
Mr	Bataillard	Philippe	BRGM
Mme	Grandet	Gaëlle	CSA
Mr	Etienne	David	Univ. Savoie
Mme	Waldvogel	M. Odile	CSA
Mr	Gaillot	Stéphane	Serv. Arch. Lyon
Mr	de Montgolfier	Jean	CSRPN
Mr	Baumgart	Gérard	CERPEA
Mme	Bajard	Manon	INRA ?
Mr	Morelle	Sébastien	PNR Vosges Nord
Mme	Coquillaud	Claude	consultante
Mr	Ertlen	Philippe	CSA
Mme	Guellier	Camille	INRA Infosol
Mme	Colicchio	Stéphanie	Maison de la Géologie
Mr	Maizière	Jean-Pierre	CSA
Mr	Chevallier	Guillaume	Cons. Sites Picardie
Mme	Heimlich	Christine	IPGS-EOST
Mme	Jacques	Charlène	Fac. Archéol (doct)
Mme	Lasserre	Marina	SRA
Mme	Ortlieb	Fanny	PNRBV
Mr	Zumbrunn	Olivier	INRAP
Mr	Longchamp	Frédéric	Ville Strasbourg, Esp. Verts
Mme	Schwoertzig	Eugénie	CUS
Mme	Besançon	Julie	PNRBV
Mr	Audinot	Samuel	CG68
Mme	Vonna	Anne	CG68
Mr	Dupont	Fabien	PNRBV
Mme	Schneider	Nathalie	INRAP
Mme	Costa	Céline	Univ. Freiburg
Mr	Levasseur	Eric	CG68
Mme	Trautmann	Martine	EOST
Mr	Wuscher	Patrice	INRAP
Mme	Boudiaf Nait-Kaci	Malika	Laboratoire Ressources Naturelles Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Algérie
Mr	Bourrié	Guilhem	INRA
Mr	Wassmer	Patrick	Université de Strasbourg
Mme	Courel	Blandine	Etudiante en Master Laboratoire de Biochimie Moléculaire UMR 7177

Mr	BROUILLARD	Yohann	Conservatoire d'espaces naturels de Champagne-Ardenne
Mme	Carbillet	Aurélie	Inrap
Mr	Campaner	Arnaud	ANTEA

11 Etudiants Ecoles Doctorales			
Mr	Hector	Basile	ED STUE
Mme	Chenin	Pauline	ED STUE
Mr	Pan	Yi	ED STUE
Mme	Adam	Véronique	ED STUE
Mr	Berez	Amor	ED STUE
Mr	Isch	Arnaud	ED STUE
Mme	Babcsanyi	Izabella	ED STUE
Mme	Bosia	Clio	ED STUE
Mr	Eschbach	David	ED STUE
Mme	Vyslousilova	Barbora	ED STUE
Mme	Bailly	Lucile	ED Chimie UMR 7177

11 Equipe APOGEE + Intervenants			
Mme	Froehlicher	Lucie	UdS
Mr	Dambrine	Etienne	Univ. Savoie
Mr	Dorioz	Jean Marcel	INRA Thonon
Mr	Dupouey	Jean-Luc	INRA Nancy
Mr	Ertlen	Damien	UDS
Mr	Schwartz	Dominique	UDS
Mr	Schaeffer	Philippe	UMR 7177
Mr	Adam	Pierre	UMR 7177
Mr	Sittler	Benoit	Univ. Fribourg
Mr	Despert	Yannick	PNR Ballons des Vosges
Mr	Bernasconi	Stefano	ETH Zurich

¹Equipe de Biogéochimie Moléculaire, UMR 7177 CNRS, Université de Strasbourg, France

²Geologisches Institut, ETH Zürich, Zürich, Switzerland

³Laboratoire Image, Ville, Environnement, UMR 7362, Université de Strasbourg-CNRS, Strasbourg, France

⁴Laboratory of Ion Beam Physics, ETH Zürich, Zürich, Switzerland

p.schaeff@unistra.fr

Introduction

The lipidic content from two acid soil profiles (Alsace, France), classified as acid cambisol (profile EFE, under forest, dominated by oak) and umbric leptosol (profile FAL, under meadow) has been investigated at a molecular level, in order to determine if genuine soil lipids are sufficiently well preserved, even in deep soil horizons, to be used as indicators of past vegetation. In addition to the molecular distribution of lipids, ¹⁴C AMS dating has been carried out to determine the mean residence time (MRT) of soil organic matter, organic extracts, lipidic fractions and individual biomarkers (Fig. 1). The two soil profiles have been selected based on their well documented history since at least several centuries.

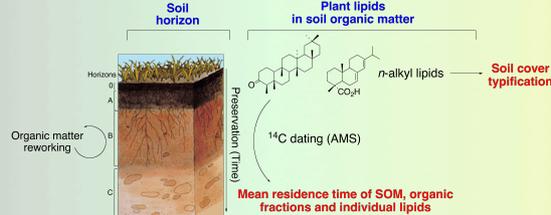


Figure 1: General approach used to investigate the mean residence time of organic matter in soils

Results and discussion

- GC-MS analysis of biomarkers:** the lipid fraction was recovered by liquid chromatography (silica gel) of the derivatised (acetylation/methylation) solvent extract.
- AMS radiocarbon dating (Micadas, ETH-Zürich):** large solvent extracts have been recovered and fractionated into conventional classes of polarity (alkanes, ketones, alcohols). Individual lipids were isolated by a succession of chromatographic steps comprising column chromatography, thin layer chromatography and high performance chromatography (normal and reversed phase). See also Poster # 511 (soil session)

Table 1: Organic carbon content (%) and radiocarbon ages from organic fractions and biomarkers isolated from samples from two soil profiles EFE and FAL.

	EFE 1 0-5 cm	EFE 2 10-20 cm	EFE 3 25-35 cm	EFE 4 45-60 cm	FAL 1 0-10 cm	FAL 3 40-50 cm	FAL 4 50-60 cm
Organic carbon	3.3	1.3	1.0	0.3	23.5	2.2	0.4
Extracted soil	-602*	-192*	-143*	466	-929*	n.d.	4272
Org. Extract	-690*	-480*	-269*	-237*	-874*	n.d.	5353
Diploptene	-534*	n.d.	n.d.	-514*	—	—	—
Friedelin	-1127*	-472*	n.d.	n.d.	—	—	—
n-C ₂₄ alcohol	-925*	n.d.	-762*	n.d.	—	—	—
n-C ₂₇ alkane	-660*	-1108*	-963*	-717*	—	—	—
n-alkanes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-516*	3352	n.d.
br-GDGTs	—	—	—	—	165	1543	n.d.
i-GDGTs	—	—	—	—	—	1527	n.d.

* a negative value indicates modern organic carbon (i.e., after 1950 AD).

Soil profile EFE

Lipid distributions (Figs. 2a,b)

- Unexpected similar signatures throughout the depth profile for the lipids.
- Signatures indicative of predominant oak inputs, in agreement with the main vegetation cover.

➡ **Hypothesis 1:** Constant organic inputs (stable vegetation) + good preservation conditions for the lipids ?

➡ **Hypothesis 2:** Low preservation of the organic matter, lipids mainly made of recent material ("i.e., contamination" from the surface by leaching and bioturbation)?

Radiocarbon dating (Table 1)

- Dating of different compartments of soil organic matter: total lipid extracts, non extractable organic matter, lipidic fractions (*n*-alkanes), individual molecules isolated from the solvent extract.
- Radiocarbon dating: organic matter essentially modern, including in the deep soil horizons.
- Individual lipids: modern signature, for both lipids from leaf waxes (*n*-C₂₇ alkane, *n*-C₂₄ alcohol) and from bark/roots (friedelin).

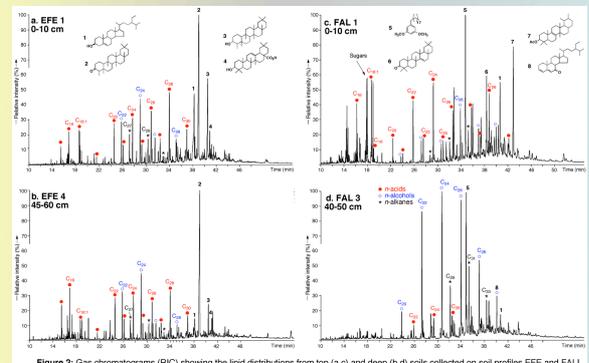


Figure 2: Gas chromatograms (GC) showing the lipid distributions from top (a,c) and deep (b,d) soils collected on soil profiles EFE and FAL

Soil profile FAL

Lipid distributions (Figs. 2c,d)

- Unlike EFE, changing lipid profiles with depth.
- Signature typical for grassland (natural acetate triterpenoids) for the surface soil.
- Progressive predominance of *n*-alkyl lipids (*n*-alcohols, notably) with increasing depth.

Radiocarbon dating (Table 1)

- Strong decrease of organic carbon content with depth.
- Unlike EFE, marked age gradient for organic matter from surface (modern age) to deep soil sample (4-5 kyrs BP).
- Important age difference between total lipid extract and non-extractable organic matter.
- Individual lipids (GDGTs): see poster # 511 (soil session). *i*-GDGTs and *br*-GDGTs in deep sample: same age
- n*-alkanes: ancient pool in deep sample. Important age difference between *n*-alkanes and GDGTs.
- Mixture of recent and ancient organic material?

Conclusions

- Radiocarbon dating: key tool, highlighting the difficulty to identify reliable genuine biomarkers in soils.
- Soil dynamics: depends on soil types.
- Lipids: not as refractory as generally considered. Cannot systematically be considered as reliable markers to trace back past vegetation in soils.

Acknowledgements

The ADEME and MEDDE are acknowledged for final support of the programme GESSOL under which this work has been performed.

Distributions of isoprenoid and branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers from soil surface horizons and within three soil profiles

Blandine Courel,¹ Philippe Schaeffer,¹ Pierre Adam,¹ Claire Bastien,¹ Damien Ertlen,² Dominique Schwartz,² Stefano M. Bernasconi,³ Irka Hajdas⁴

¹Equipe de Biogéochimie Moléculaire, UMR 7177 CNRS, Université de Strasbourg, France

²Laboratoire Image, Ville, Environnement, UMR 7362, Université de Strasbourg-CNRS, Strasbourg, France

³Geologisches Institut, ETH Zürich, Zürich, Switzerland

⁴Laboratory of Ion Beam Physics, ETH Zürich, Zürich, Switzerland

p.schaeff@unistra.fr

Introduction

Isoprenoid and branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (*i*-GDGTs and *br*-GDGTs, respectively) occur in marine, lacustrine and terrestrial-derived organic matter (Schouten et al., 2013).

They represent the core membrane lipids of archaea (*i*-GDGTs) and (acido)bacteria (*br*-GDGTs). In soils, both types of GDGTs can co-occur, *br*-GDGTs being predominant, whereas the opposite situation is encountered in the case of marine (and lacustrine) settings. However, if GDGT occurrence and distributions are well documented in the case of marine and freshwater sediments, only scarce information is available regarding these compounds in soils, notably in deep soil horizons.

We report here the distributions of GDGTs in a series of acidic soil surface horizons from the Vosges (France), all with a stable vegetation cover (grassland and forest) for at least 150 years. In addition, GDGT vertical distributions from 3 soil profiles have been examined (Table 1).

Results and discussion

For top soils, *br*-GDGTs generally predominate, the distribution of *i*-GDGTs being restricted to the presence of GDGT I (for structures, see Fig. 1). Among *br*-GDGTs, compound **VIII** is generally prevailing, followed by **VII**, in agreement with previously published data on soils (e.g., Weijers et al., 2006). In 2 top soils (RTH and WHS; Table 1), however, *i*-GDGTs I-V occur in rather high relative amounts, and even predominate over *br*-GDGTs in one case (RTH).

Table 1: Description and GDGT distributions from various acidic soil surface horizons and three acidic soil profiles

Sample code	Altitude (m)	Soil type	Depth (cm)	TOC	pH	Vegetation	<i>br</i> -GDGT (%)	<i>i</i> -GDGTs (%)
RTH	1080	leptosol	0-15	50.3	3.68	fir, beech, acer	96	64
RCA	1120	cambisol	0-4	16.8	4.2	pasture	34	6
CFA	1070	cambisol	0-4	19.9	4.0	pasture	100	0
RCB	1080	cambisol	0-4	16.6	4.35	pasture	83	17
DHS	680	cambisol	0-4	20.0	3.54	fir, few beech	96	4
KAC	1350	umbrisol	0-4	20.4	3.91	high altitude grassland	100	0
KAT	1350	umbrisol	0-4	31.4	3.96	high altitude grassland	100	0
WHS	650	entic podzol	0-4	4.5	3.70	fir, beech, acer	60	40
BLH	620	cambisol	0-4	12.4	4.45	oak, fir	100	0
EFE 1	600	cambisol	0-4	3.3	5.01	oak, beech	98	2
EFE 2	600	cambisol	10-20	1.3	-	oak, beech	93	7
EFE 3	600	cambisol	25-35	1.0	4.18	oak, beech	91	9
EFE 4	600	cambisol	45-60	0.3	4.29	oak, beech	85	15
FAL 1	1270	umbrisol	0-10	23.5	3.59	high altitude grassland	100	0
FAL 2	1270	umbrisol	20-30	5.8	3.5	high altitude grassland	91	9
FAL 3	1270	umbrisol	40-50	2.2	4.3	high altitude grassland	41	59
FAL 4	1270	umbrisol	50-60	4.0	4.2	high altitude grassland	48	52
VFJ 1	1020	cambisol	0-10	4.5	-	beech, fir	100	0
VFJ 2	1020	cambisol	20-30	2.2	-	beech, fir	99	1
VFJ 5	1020	cambisol	50-60	1.0	-	beech, fir	100	0

¹ determined as $\sum_{i=1}^8 (br-GDGTs) / \sum_{i=1}^8 (br-GDGTs + i-GDGTs) \times 100$; ² determined as $\sum_{i=1}^8 (i-GDGTs) / \sum_{i=1}^8 (br-GDGTs + i-GDGTs) \times 100$

Within the soil profile VFJ (Table 1), *br*-GDGTs VI-VIII represent the almost entire GDGTs from the top to the deepest soil samples, the predominance of **VII** vs. **VIII** varying with the samples. In contrast, the two other soil profiles (EFE, and FAL; Table 1) show a progressive increase of the relative abundance of *i*-GDGTs I-V with increasing depth, *i*-GDGTs becoming even predominant in the two deep samples from the FAL profile (Fig. 1 and Table 1).

Within the FAL soil profile, radiocarbon dating of *i*-GDGTs and *br*-GDGTs isolated by a combination of chromatographic techniques (Fig. 2) from the soil at 40-50 cm depth (FAL 3; Fig. 1) indicates that both GDGT pools have the same age (ca. 1500 yrs BP; Fig. 1). The determined age is markedly younger than that of the *n*-alkanes from the same sample (3500 yrs BP), suggesting either a mixed contribution of both ancient and more recent GDGTs, or that the GDGT-producing microorganisms use a carbon source made of a mixture of ancient and more recent organic matter.

Acknowledgements

The ADEME and MEDDE are acknowledged for final support of the programme GESSOL under which this work has been performed.

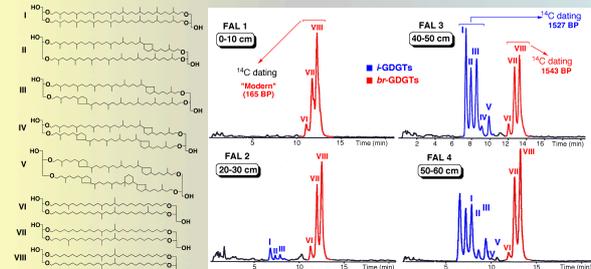


Figure 1: HPLC-MS mass chromatograms m/z (1302+1300+1298+1296+1292+1050+1036+1022) showing the distribution of GDGTs within the FAL soil profile.

In addition, radiocarbon dating of *br*-GDGTs isolated from the top soil (FAL 1; Figs. 1 and 2) gives an age of ca. 200 yrs BP, which is distinct from the age determined for both the total organic matter and total lipid extract (modern, post-bomb values). This likely indicates that *br*-GDGTs in the top soil are made of a mixture of recent, actual GDGTs and more ancient ones. However, regarding the existence of recent, viable GDGT-producing microorganisms, it is worth noting that no GDGTs with polar head groups (i.e., "intact polar lipids") have been evidenced, given the absence of GDGT core lipids following hydrolysis of polar lipid extracts (Fig. 2) from both FAL 1 and FAL 3 samples.

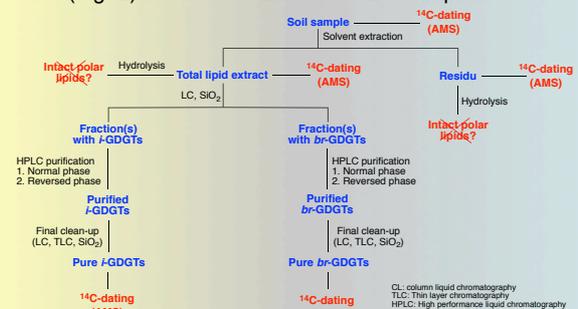


Figure 2: General flow-chart used for the analysis and purification of GDGTs in soils FAL 1 and FAL 3.

The present observations regarding the distribution and abundance of *i*-GDGTs in acidic soils (pH < 5) are in contrast with those reported by Weijers et al. (2006) and Yang et al. (2012) who suggest that soil *i*-GDGTs become abundant/predominant in the case of alkaline soils (pH > 8) and led Yang et al. (2012) to propose a new index (RAI) as a proxy of the pH values of paleosols.

In the view of our results on acidic soils, in which *i*-GDGTs can be predominant independently of the vegetation cover (forest vs. grassland), further studies are clearly needed to enlarge the data set on GDGT distributions in soils, in order to better define the ecological conditions that govern their biological sources (and hence, their distributions) in surface and in deep soil horizons.

References

- Hopmans E.C. et al. (2004) Earth and Planetary Science Letters 224, 107-116.
- Schouten S. et al. (2013) Organic Geochemistry 54, 19-61.
- Weijers, J.W.H. et al. (2006) Organic Geochemistry 37, 1680-1693.
- Yang H. et al. (2012) Science China Earth Sciences 55, 236-245.

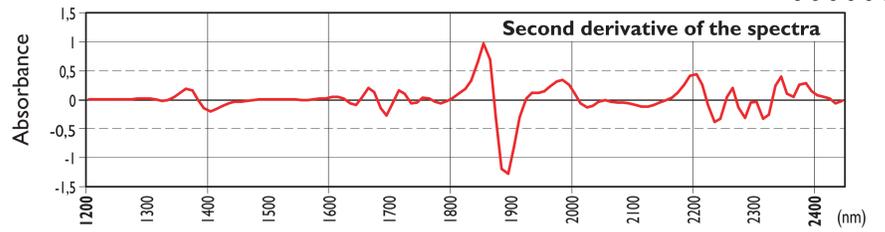
Near Infrared Spectra of soil organic matter as a tool to reconstruct past land use

Ertlen D.
Schwartz D.
Brunet D.

Aims of the project

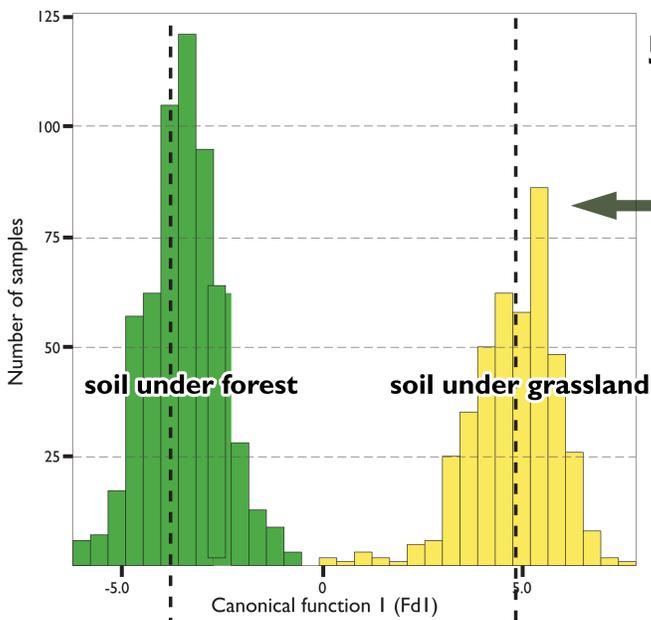
- Reconstruction of past environment
- Look for new indicators of past vegetation into soils
- Better understand the long term dynamics of Soil Organic Matter

The tool : Near Infrared Spectroscopy



- Absorbance of a soil sample between 1100 and 2500 nm (130 wavebands/variable)
- Peaks are generated by overtones of molecular vibrations
- The spectra can be considered as fingerprint of soil organic matter

A referential: topsoil samples with well known organic matter origin



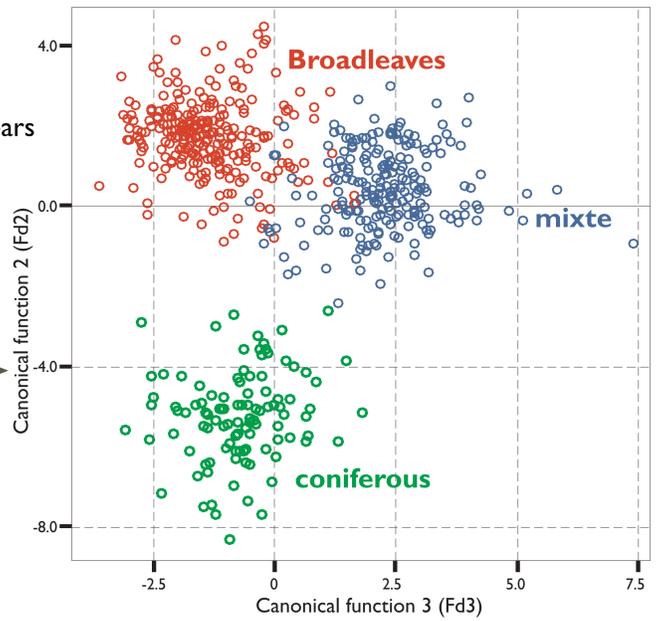
57 reference sites
1006 samples from topsoil
well documented on a period > 150 years

First canonical variate analysis (Fd1) discriminates between :

- soil under grassland and,
- soil under forest

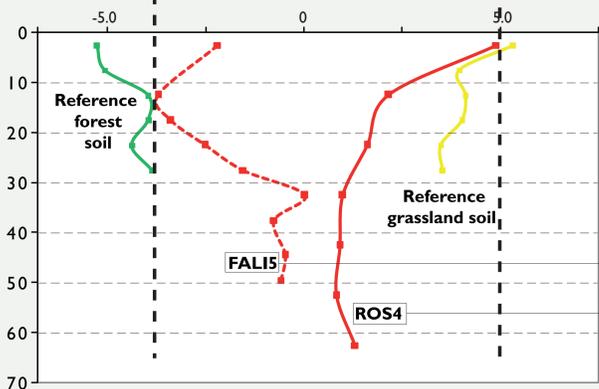
Second canonical variate analysis (Fd2 et Fd3) discriminates among forest soils :

- soils under broadleaves forests
- mixt forests
- coniferous forests



Reconstruction of past land use from soil profiles in the Vosges mountains

NIR data



The NIR spectra is stable with dept for reference forest and grassland soils (stability over several millenia is documented)

The NIR spectra is changing with dept for soil with changing landuse : forest- grassland ROS4 or grassland forest FAL15 (documented by pedo-anthracology)

Former landuse is recognized by NIR

Organic matter model

$$Q_{zr} = Q_{z0} \cdot e^{-t/TMRz}$$

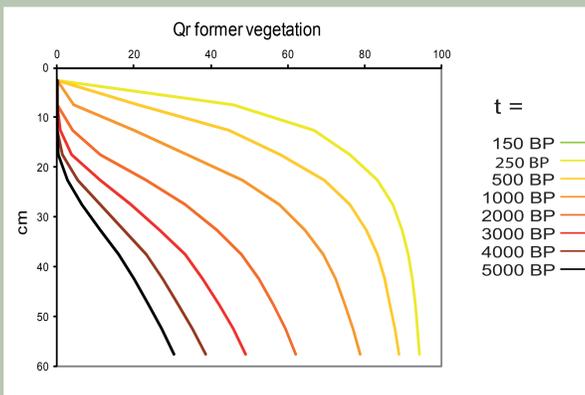
$$\text{with } Q = Q_f + Q_p$$

Q_r residual organic matter from former vegetation according the scenario:

- Q_f organic matter pool from forest
- Q_p organic matter pool from grassland

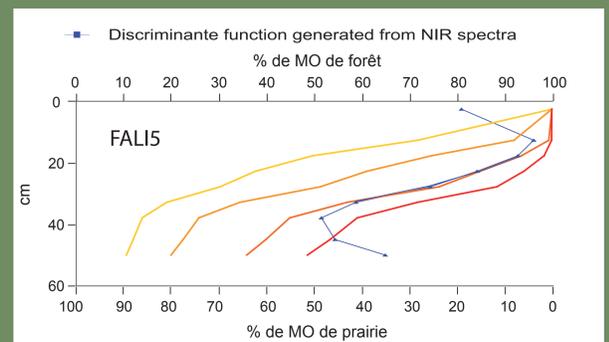
t the date of vegetation change

TMRz: ^{14}C measured on bulk soil at the depth Z according to Schwartz 1998 modified from Guillet 1979

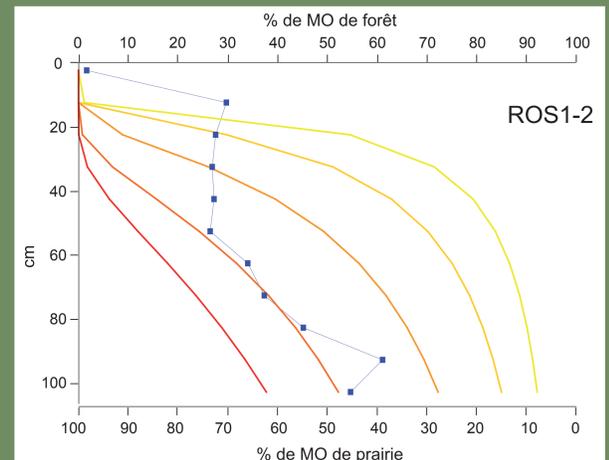


Organic matter pool from former vegetation is modelled for a given age of vegetation change

Comparison with pedo-anthracology



■ No fire detected after Antiquity



■ Forest clearing in the Antiquity 2000 BP

The Age of last vegetation change is correctly estimated

Ertlen, D., 2009, Thèse de l'Univ. de Strasbourg, 382 p
Ertlen, D., et al., 2010 Eur. J. of Soil Sci., 61(2): 207-21
Gœpp, S., 2007. Thèse de l'Univ. Louis Pasteur, Strasbourg,



Mémoire de Master 1

Géographie Environnementale (GE)

Spécialité Systèmes Géographiques et Environnements (SGE)

Lucie FROEHLICHER

Paléovégétations et impacts anthropiques sur le terroir du village disparu de l'Elbersforst.

Soutenu le 27 juin 2012

Membres du Jury :

Directeur du mémoire : **M. Damien ERTLEN**, Maître de conférences
Université de Strasbourg

Examineur : **M. Dominique SCHWARTZ**, Professeur
Université de Strasbourg

Examineur : **M. Jean-Jacques SCHWIEN**, Maître de conférences
Université de Strasbourg



RESUME

L'objectif de ce travail est de reconstituer la végétation de l'ancien terroir du village disparu d'Elbersforst.

Les archives pédologiques constituent une information locale et localisable. Parmi ces archives les changements de la matière organique (MO) dans le sol sont étudiés par spectroscopie proche infrarouge.

La comparaison avec un corpus de documents anciens sous SIG renforce et complète ces informations. Parmi ces documents une carte de 1786 nous fournit des informations précises sur l'occupation du sol au XVIIIème siècle. La spatialisation des données pédologiques apparaît elle aussi comme un outil idéal pour faire ressortir de manière plus claire des résultats mesurés. Ainsi, on peut dégager des tendances sur la répartition des pH, et relever un enrichissement dans la zone qui borde l'ancien village. L'approche qualitative de la SPIR présente de réelles difficultés de classement des échantillons. Cet insuccès du classement remet en question plusieurs éléments méthodologiques et techniques dont la qualité du référentiel utilisé. Ce dernier semble manquer de données plus locales pour les sols de prairie sur grès.

Néanmoins ces difficultés sont surmontables et ne constituent en rien un frein à la détermination de la paléovégétation pour le terroir de l'Elmersforst. Les résultats permettent d'envisager une nouvelle campagne de prélèvement pour enrichir le référentiel et améliorer l'échantillonnage.

SUMMARY

The aim of this work is to reconstruct the former landuse of territory of the disappeared Elbersforst village.

The soil archives produce information than can be spzialised in order to produce maps at local scale. This study focuses on changes in soil organic matter (SOM). These changes are tracked using near-infrared spectroscopy. The spectra of soil organic matter will allow classification of samples either of forest or grassland origin.

The comparison of a corpus of ancient documents and soil data is emphasized by a spatialisation of the results in GIS. From the database of ancient document the map from 1786 brings important information for the landuse of the XVIII century. Among pedological data pH is of special interest. It reveals an enrichment of soils in the surrounding of the former village. The qualitative approach of NIRS shows serious limit of classification. This failure calls into question several methodological and technical points of the reference used. Especially local references under grassland are missing. Nevertheless these difficulties are overcome and do not constitute an obstacle to determine the palaeovegetation of the Elmerforst. The results allow considering a new sampling campaign to enrich the repository.

Mémoire de Master 2
Géographie Environnementale
Spécialité : Systèmes Géographiques et environnements

Par **FROEHLICHER Lucie**

L'apport des colluvions dans la reconstitution des dynamiques paysagères à partir de la méthode de la spectroscopie proche infrarouge (SPIR).

Membres du Jury :

Directeur du mémoire : **M. Damien ERTLEN**, Maître de conférences

Université de Strasbourg

Examineur : **M. Dominique SCHWARTZ**, Professeur

Université de Strasbourg

Examineur : **M. Loup BERNARD**, Maître de conférences

Université de Strasbourg

RESUME

L'objectif de ce travail est d'améliorer la précision du set de référence déjà existant (Ertlen, 2009), qui doit servir par analyse en Spectroscopie dans le Proche Infrarouge (SPIR) à identifier le type de végétation qui est à l'origine des matières organiques des sols. Actuellement bipartite, ce référentiel se caractérise par les sets *forêt* et *prairie*, et occulte ainsi la référence culturelle. Or en milieu tempéré, l'occupation du sol est de trois grands types : forêt, prairie et culture. Cette absence de la référence *culture* peut aboutir à de mauvaises identifications de l'origine végétale de la matière organique de l'échantillon en question. Le but poursuivi est donc ici de passer d'un référentiel bipartite (prairie et forêt) à un référentiel tripartite (forêt, prairie et culture).

Avec des systèmes de cultures actuellement caractérisés par la monoculture intensive de quelques espèces (maïs, etc.) et par un déclin des assolements, cet objectif est délicat à mettre en œuvre puisque ces systèmes de culture ne sont pas comparables aux systèmes agricoles traditionnels auxquels est destiné le futur référentiel.

Pour pallier ce problème, les colluvions agricoles datées du Néolithique à l'Epoque Moderne apparaissent comme l'outil idéal. En effet, en formulant l'hypothèse que ces colluvions résultent de l'érosion de sols cultivés, on admet par conséquent que la matière organique qu'elles contiennent est représentative d'un signal de sol cultivé de l'époque en question. Il convient toutefois d'écarter du set de référence des échantillons suspects d'évolutions pédologiques postérieures aux colluvionnements (par exemple, les niveaux de colluvions trop superficiels et bioturbés).

L'analyse discriminante établie sur les spectres des trois sets de références : « prairie », « forêt » et « culture » acquis par la méthode de la Spectroscopie dans le Proche InfraRouge (SPIR), montre qu'une différenciation des trois origines végétales est possible. En effet, on distingue de manière très nette trois classes bien distinctes où 100 % des échantillons de référence ont été affectés dans leurs classes d'origine après la validation croisée.

Néanmoins la validité de ce référentiel reste discutable puisque la concentration des valeurs de pH et des teneurs en carbone organique (C.O.) semble influencer en partie la classification des références (pondération trop importante du pH et du C.O. dans l'analyse discriminante). Ainsi, la discrimination n'est pas faite uniquement sur l'objet d'étude : l'origine végétale de la matière organique, mais aussi sur des caractéristiques pédologiques.

Toutefois, l'application de ce nouveau référentiel sur le site du village disparu d'Elbersforst a permis de conforter la validité de notre hypothèse colluvions = signal culture et de nuancer l'influence des caractéristiques pédologiques (pH, C.O.). En effet, une évolution du couvert végétal au centre du village est identifiée et caractérisée par un signal cultural en profondeur cohérent avec l'occupation du sol relevé sur les cartes anciennes du 18^{ème} siècle, où l'on retrouve des parcelles agricoles. Ce signal cultural, très fort au centre du village disparu s'estompe vers la périphérie où le signal forestier est prédominant sur toute la profondeur des profils.

Les différentes perspectives en vue de l'amélioration de ce référentiel tripartite prévoient de compléter le référentiel, par des références « culturales » sur sol acides afin de limiter encore davantage la pondération du facteur pH dans l'analyse discriminante. Des références de crête de labour ou «Ackerberg » possédant aussi une signature culturale peuvent aussi être intégrées au référentiel. Pour « gommer » une hypothétique influence de la teneur en C.O. des colluvions, actuellement centrée entre 0,5 et 3 % de C.O., l'utilisation des horizons les moins enrichis des références prairies et forêts apparaît comme une alternative intéressante. De plus, il est évoqué aussi l'idée de tester les « colluvions » non retenues dans le référentiel (car n'obéissant pas aux règles strictes que nous avons pré-établies, cf. supra) pour caractériser des horizons de transition entre forêt/prairie et culture.

SUMMARY

The objective of this work is to improve the accuracy of the already existing reference set of Near Infra-Red Spectrometry (NIRS) (Ertlen, 2009) that serves to identify which type of vegetation is at the root of organic matters in soils. For the moment, this set is only characterized by a *forest* set and a *meadow* set and leaves the *cultural* references. Even though in temperate climate, the land use is a combination of three different types: forest, meadow and culture. The absence of a cultural reference set for the NIRS method can cause a misinterpretation of identification of soil organic matter origin for some samples. That is why the pursued purpose is to change the bipartite reference table (meadow and forest) into a tripartite reference table (meadow, forest and culture).

Given the wide use of the current systems of cultures characterized by a intensive monoculture of some species (corn, wheat, barley...) and by the decrease of the last of the crop rotation systems, this objective is hard to implement because those systems of cultures are not comparable with the traditional cultural systems used in the past and for which the reference table is planned.

To mitigate this problem, the agricultural colluvions dated from the Neolithis to the Modern age appear as the ideal tool. Indeed, by formulating the hypothesis that those colluvions result from the erosion of cultivated soils, we can consequently admit that the organic matter contained in those colluvions is representative of a signal of cultivated soil corresponding to the time of the cultivations. However it is advisable to exclude from the reference table suspect samples which have suffered from pedological evolution after the colluviation. For example, we have to exclude the too superficial and the bioturbated colluvions.

The discriminating analysis established with the spectra of the three reference sets (meadow, forest and culture) experienced by the NIRS method, shows that it is possible to distinguish three vegetal origins. Indeed we make out three clearly defined classes where 100% of the reference samples are allocated in their classes of origin after the crossed validation.

Nevertheless the validity of this reference table remains debatable because the pH values and the organic carbon (OC) contents of colluvions seems to influence partially the classification of references (there is a too important weighting of pH and OC contents in the discriminating analysis). So we can say that the discrimination is not only made with the subject of the study, the origin of the vegetal organic matter, but also with soil characteristics.

However the application of this new reference table on the samples of the disappeared village site of Elbersforst enables our colluvions hypothesis to be consolidated that is the presence of a culture signal and to quantify the influence of the soil characteristics (pH, OC contents). Indeed a vegetal cover evolution in the middle of the village is identified and characterized by a coherent in-depth cultural signal with the land use defined with 18th-century maps of the area where we can observe agricultural plots. This cultural signal is very strong in the middle of the disappeared village and decreases from the center to the periphery where the forest signal is dominant on all the depths of the profiles.

The various perspectives to improve this tripartite reference table plan to complete it with a cultural reference set from acid soils. That should still limit the weighting of the pH factor in the discriminating analysis. Moreover references of plowing crests or "Ackerberg" could also be integrated to the reference table thanks to their own cultural signals. Finally "to erase" a hypothetic influence of the colluvion OC contents, currently focus between 0.5 and 3% of OC, it could be interesting to use the less enriched horizons of meadow and forest samples. And it may be possible to use the no hold colluvions to test them to know if they are able to characterize transition horizons between forest/meadow and culture.

ÉTUDE DU POTENTIEL D'ARCHIVAGE PEDOLOGIQUE DES STRUCTURES NEOLITHIQUES DE TYPE FENTE

Membre du Jury :

Directeur du mémoire : **M. ERTLEN Damien**, Maitre de conférence
Université Strasbourg

Examineur : **M. SCHWARTZ Dominique**, Professeur
Université Strasbourg

Examineur : **M. ENAUX Christophe**, Maitre de conférence
Université Strasbourg

Soutenu le 4 septembre 2013



Stage de Master II – Sciences analytiques

Lipides biologiques dans les sols : Caractérisation, modes de transformation et processus de transfert

Laboratoire de Biogéochimie Moléculaire Institut de chimie, UMR 7177

25 rue Becquerel – 67200 STRASBOURG

Directeur : P. ADAM

Tuteur : P. SCHAEFFER

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier, Monsieur Pierre Adam, Directeur de recherche de l'équipe de Biogéochimie Moléculaire, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour la formation qu'il m'a permis d'acquérir durant ces 6 mois.

Je remercie également Philippe Schaeffer, mon tuteur lors de ce stage, et Jean-Michel Trendel pour leur accueil et leur disponibilité à mon égard. Ils m'ont permis d'enrichir mes connaissances sur l'étude des dérivés de triterpènes de végétaux supérieurs et m'ont fourni un grand nombre de lectures.

Merci également à Armelle Charrié-Duhaut, à Gaby Schmitt et à Estelle Motsch pour leurs leçons et leur aide en spectrométrie de masse.

Je remercie enfin toute l'équipe du laboratoire de Biogéochimie Moléculaire pour l'ambiance studieuse et sympathique qu'ils ont su maintenir.

Sommaire

Remerciements

Sommaire

Abbréviations.....	1
Introduction	2
Problématique	2
I. Echantillons.....	3
1. Choix des échantillons	3
2. Premières observations	3
II. Etude moléculaire des biomarqueurs de sols	4
1. Les biomarqueurs	4
2. Travaux antérieurs	4
3. Analyse moléculaire des échantillons de sol de l'Elmerforst	5
4. Conclusion.....	12
III. Etude de l'évolution de biomarqueurs dans les sols : apport de la datation au ¹⁴ C dans la compréhension des mécanismes de transfert.....	13
1. Accelerator Mass Spectrometry (AMS).....	14
2. Stratégie d'analyse.....	14
IV. Conclusion.....	16
V. Partie expérimentale	17
1. Indications générales	17
2. Analyses géochimiques.....	18
3. Méthodologie d'isolement et de fractionnement des n-alcanes et de la friedeline	19
VI. Bibliographie.....	20
Annexes	21

Abbreviations

AMS	Accelerator Mass Spectrometry
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GC	Chromatographie en phase Gazeuse
GC-MS	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IE	Impact électronique
MeOH	Méthanol
m.o	Matière Organique
MS	Spectrométrie de masse
m/z	Rapport masse/charge (en MS)
TMR	Temps de Résidence Moyen

Introduction

L'un des objectifs principaux de la biogéochimie consiste à étudier l'origine et l'évolution de la matière organique sédimentaire. Cette dernière provient pour l'essentiel des résidus d'organismes qui se sont déposés soit sur les sols (milieux terrestres), soit dans les sédiments (milieux aquatiques) et qui ont subi des transformations ⁽¹⁾. Les transformations dans les sols sont principalement d'ordre biologique notamment liées à l'action des microorganismes (biodégradation). En outre, certains paramètres physico-chimiques comme le pH ou l'action catalytique des minéraux vont aussi influencer sur la nature de certaines réactions, sièges de la transformation de la matière organique.

Le sujet de master proposé porte sur l'étude de l'évolution du couvert végétal par l'analyse de la matière organique contenue dans les sols. Ce projet repose sur l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques d'organismes producteurs précis (végétaux) susceptibles d'être conservés dans les sols afin d'établir, dans un premier temps, une typologie moléculaire sous des couverts végétaux variés. Par la suite, cette identification doit permettre, par l'étude de la matière organique du sol à différentes profondeurs, d'appréhender l'évolution de la végétation au cours du temps en relation, notamment, avec l'anthropisation du milieu ou les modifications climatiques.

Ainsi, les travaux effectués portent plus particulièrement sur l'étude des molécules organiques issues d'espèces végétales ayant été préservées dans la matière organique des sols. L'étude s'axe principalement sur l'analyse des lipides de végétaux de types terpénoïdes et stéroïdes. Ces composés peuvent en effet provenir spécifiquement d'espèces végétales données. Dans ce cas, ils possèdent un potentiel en tant que marqueurs moléculaires chemotaxonomiques. En outre, ces composés polycycliques ont la capacité de présenter une certaine résistance à la dégradation et sont, de ce fait, susceptibles d'être préservés dans des sols profonds.

Ce projet peut également mener à s'intéresser aux réactions chimiques et biologiques qui altèrent les lipides biologiques dans les horizons profonds des sols conduisant à des produits de transformation. En effet, ces produits de transformation peuvent, de manière générale, être utilisés comme biomarqueurs. De plus, sous l'effet du lessivage ou de la bioturbation, les sols sont brassés, ce qui peut conduire, pour ce type d'étude, au transfert soit de composés d'âge récent vers les horizons profonds de sols, soit de composés anciens vers les couches superficielles. Par conséquent, les distributions étudiées ne sont peut-être pas représentatives de la couverture végétale originelle, et la compréhension des processus de transfert de la matière organique s'avère être d'un intérêt particulier.

Problématique

Caractérisation du couvert végétal contribuant ou ayant contribué à la matière organique de différents sols ou horizons de sols par l'analyse des signatures lipidiques laissées dans les sols par des essences végétales données.

Ce projet s'inscrit dans le cadre du programme GESSOL cofinancé par le Ministère de l'Écologie et du Développement Durable et par l'ADEME. Ce programme s'axe sur la valorisation et la préservation des sols.

I. Echantillons

1. Choix des échantillons

Il s'agit dans un premier temps d'établir un référentiel - typologie moléculaire -, pour des sols de surface sous couvert végétal stable. Ainsi, pour cette étude, un sol a été choisi dans un site dont l'évolution générale est déjà connue suite à des études préalables afin de s'assurer de la stabilité du sol. En effet, le choix d'écosystèmes stables sur une durée d'au moins 150 ans apporte la garantie que plus de 95% de la matière organique est autochtone, suite au renouvellement rapide de la matière organique dans les sols de surface – moins de 50 ans – ⁽²⁾.

L'échantillon de sol étudié provient de la forêt de l'Elmerforst sur la commune de Balbronn située à l'ouest de Strasbourg, dont l'existence est attestée par les écrits depuis au moins 800 ans.

En apparence chênaie pure, mais en réalité chênaie-hêtraie dont tous les hêtres ont été coupés récemment, cette forêt est constituée d'un sous-bois peu dense, avec des ronces ainsi que des jeunes chênes et des jeunes hêtres. La litière est composée d'environ 50 % de feuilles de hêtre et 50 % de feuilles de chêne. Les chênes ont de 100 à 120 ans.

L'échantillon se scinde en 4 profondeurs de prélèvements (EFE1 : 0-5 cm, EFE2 : 10-20 cm, EFE3 : 25-35 cm, EFE4 : 45-60 cm) à partir d'un sol dont le profil pédologique est le suivant :



Horizon A : 0 - 5/10 cm, limoneux, gris, humide ; peu caillouteux, structure grenue, quelques racines, transition progressive.

Horizon S_{al} : 5/10 - 35 cm, frais à humide, limoneux, nombreuses racines de tailles variées ; caillouteux (grès altéré), bonne porosité et transition nette.

Horizon C : 35 - 70 cm, altérite des grès ; couleur bigarrée : rose, jaune, rouge, gris, brun, taches de manganèse nombreuses ; quelques racines bien moins nombreuses que dans S_{al} ; très caillouteux.

2. Premières observations

La simple observation à l'œil nu montre que les 4 profondeurs présentent quelques différences. En effet, outre la variation de couleur, la présence de cailloux est d'autant plus importante que la profondeur est grande.

Une fraction organique des échantillons de sols EFE 1, 2, 3 et 4 a été extraite par des solvants organiques dans le but d'obtenir des profils moléculaires des 4 profondeurs. C'est leur

Tableau 1. Taux d'humidité et quantité de matière organique extraite

Echantillons	Quantité de m.o (mg/g de sol sec)	Taux d'humidité
EFE 1	1,32	30%
EFE 2	0,67	20%
EFE 3	0,34	18%
EFE 4	0,14	14%

comparaison qui permettra de conclure quant à l'évolution de la matière organique (m.o). On peut déjà constater que la quantité de matière organique extraite sur les 4 profondeurs varie d'un rapport de 1 à 10 comme illustré dans le tableau 1.

Le taux d'humidité a également été déterminé pour les 4 profondeurs et on constate que ce dernier décroît avec la profondeur.

Par ailleurs, des feuilles de chêne et de hêtre prélevées dans une litière végétale et des racines de chêne et de hêtre présentes dans le profil de sols étudié ont également été analysées. Les profils des extraits organiques totaux (après dérivatisation et fractionnement) obtenus seront confrontés et comparés à ceux obtenus pour les sols.

II. Etude moléculaire des biomarqueurs de sols

1. Les biomarqueurs

Par définition, un biomarqueur est une molécule qui doit avoir une structure suffisamment spécifique pour pouvoir être corrélée avec une molécule précurseur pouvant être caractéristique d'un organisme producteur donné (cf. Figure 1).

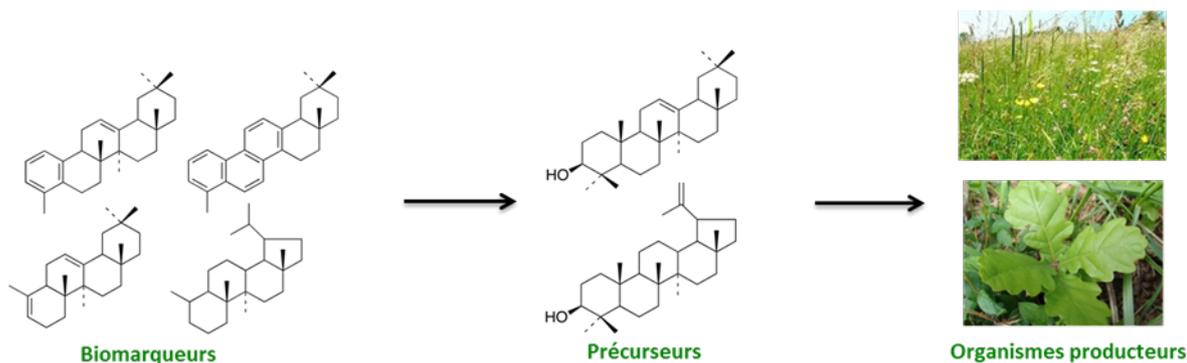


Figure 1. Relations entre biomarqueurs d'angiospermes, molécules précurseurs fonctionnalisées et organismes producteurs

L'étude s'est axée sur la recherche de telles molécules car, en raison de divers processus d'altération, les horizons de sols plus profonds sont susceptibles de contenir des produits de transformation issus des lipides biologiques précurseurs⁽¹⁾. Cependant, comme nous le verrons par la suite dans ce rapport, l'essentiel des molécules analysées sont des molécules ayant subi peu ou pas de transformation (précurseurs).

2. Travaux antérieurs⁽³⁾

Des travaux antérieurs effectués au laboratoire de Biogéochimie Moléculaire ont consisté à étudier une série d'échantillons de sol de surface provenant du massif des Vosges. Ces sols étaient recouverts d'une végétation stable et variée afin de pouvoir créer un référentiel d'échantillons de sols (prairie, chênaie, hêtraie, sapinière...).

L'objectif était dans un premier temps d'établir un référentiel de sols par la recherche de marqueurs moléculaires caractéristiques d'espèces végétales données (chênes, graminées ou encore

conifères). Dans un deuxième temps, des corrélations entre les différents couverts végétaux et les distributions de composés non spécifiques ont été recherchées.

Les chromatogrammes de la figure 2 sont issus de ces travaux et représentent le référentiel « hêtraie-chênaie » auquel nous nous référerons pour les interprétations issues de l'analyse des 4 échantillons de la forêt de l'Elmerforst étudiés au cours de ce stage.

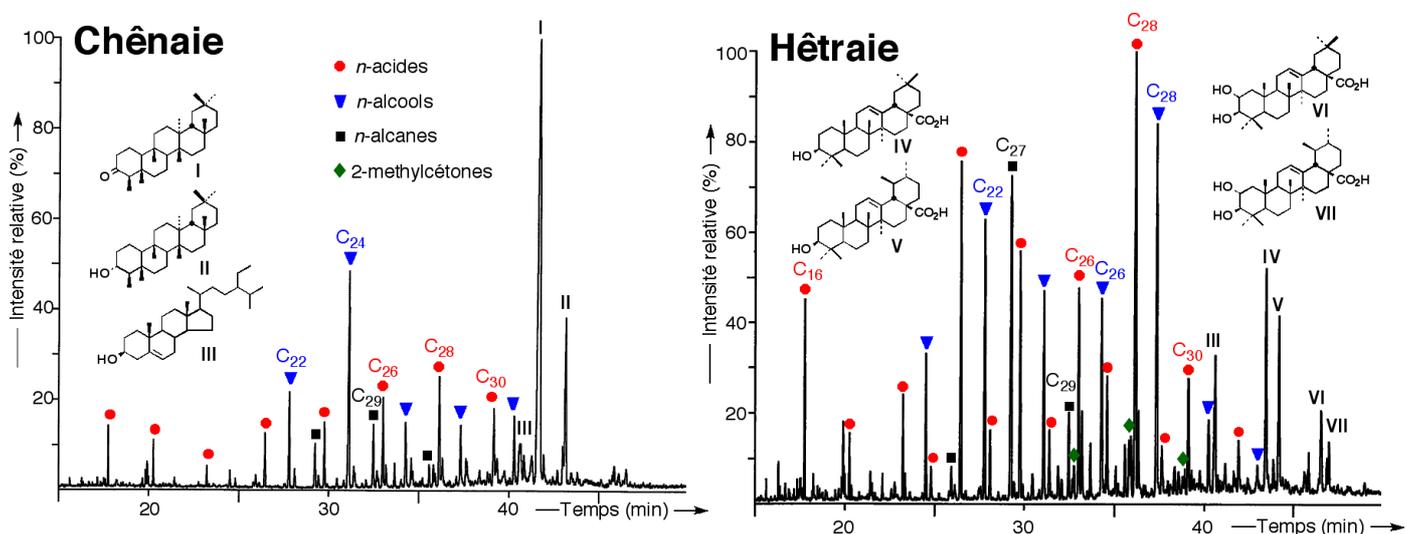


Figure 2. Chromatogrammes GC-MS des échantillons de chênaie et de hêtraie du massif des Vosges. Modifié d'après Trendel et al⁽³⁾

Corrélations entre couverts végétaux et distributions de composés non spécifiques :

Les extraits lipidiques sont dominés par les séries de composés linéaires de type alcanes, alcools et acides carboxyliques, ces deux dernières séries étant les plus abondantes. Ces distributions, abondantes dans les cires cuticulaires, semblent caractéristiques du couvert végétal. Ces travaux ont menés notamment aux conclusions suivantes :

- L'acide en C₂₈ prédomine dans les forêts de hêtre, ceux C₂₆ et C₂₈ dans les forêts de chêne
- L'alcool en C₂₄ est majeur dans les chênaies, celui en C₂₈ dans les hêtraies.
- Les alcanes en C₂₉ (n-nonacosane) et C₂₇ (n-heptacosane) semblent prédominer sous chênaie, celui en C₂₇ sous hêtraie

En outre, des analyses de feuilles de chêne et de hêtre ont effectivement mis en évidence la présence de ces composés linéaires avec une prédominance d'homologues donnés qui semble bien spécifique de l'espèce végétale étudiée⁽⁴⁾⁽⁵⁾. De plus, l'étude des lipides de feuilles mortes de hêtre et de chêne prélevées dans les litières de sols confirment globalement cette observation (cf. Figures e, f, annexes 3 et 4). Ainsi, ces feuilles, une fois déposées sur le sol, font partie intégrante du couvert végétal et leur dégradation libère des séries de composés linéaires de type alcanes, acides ou alcools dont la signature biologique est préservée.

3. Analyse moléculaire des échantillons de sol de l'Elmerforst

a) Profils moléculaires

Les différents profils lipidiques de sols sont obtenus en analysant les 4 extraits organiques

totaux par GC-MS après dérivation et purification chromatographique (cf. V, partie expérimentale).

Les chromatogrammes de la figure 3 représentent les profils moléculaires des 4 horizons de sol de la forêt de l'Elmerforst.

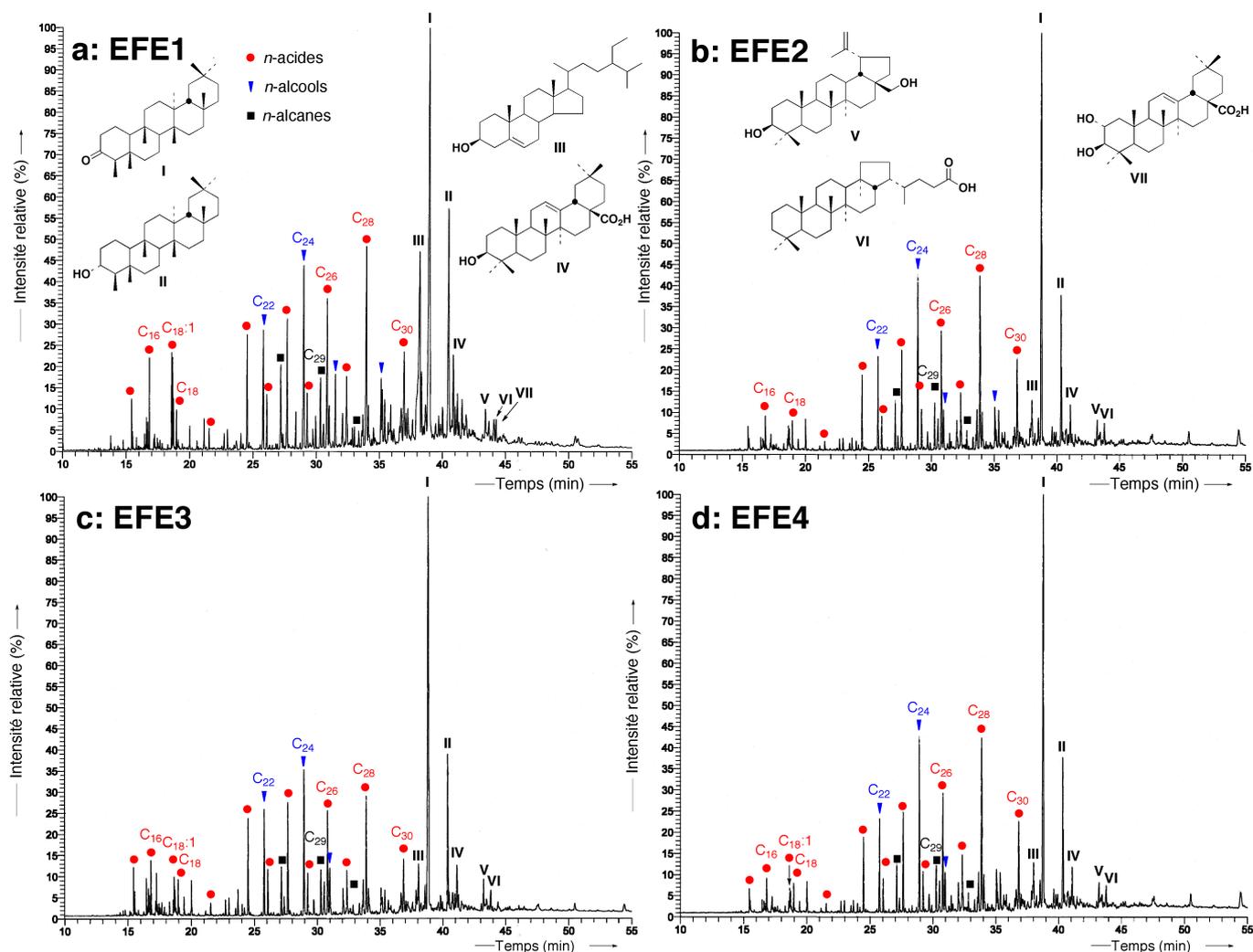


Figure 3. Chromatogrammes GC-MS des 4 horizons de sol. Les lipides sont analysés après dérivation (cf. IV)

Conditions : Colonne : HP 5-MS (30m x 0,25 mm x 0,1 µm, épaisseur de film) - Gaz vecteur : Helium - inj.vol : 1µL. Méthode : 40°C à 200°C - 10°C/min puis 200°C à 320°C - 4°C/min puis 320°C pendant 40 min. Gamme de masse : 50 -700 m/z - Mode ionisation : impact électronique, 70 eV

Lorsqu'on compare les profils chromatographiques des extraits totaux des 4 profondeurs, on constate de manière surprenante assez peu de différences au niveau de la distribution des biomarqueurs. En effet, nous aurions pu nous attendre à des profils chromatographiques montrant une altération croissante avec la profondeur, se traduisant notamment par l'apparition progressive d'un fond moléculaire non résolu.

b) Analyse moléculaire des marqueurs spécifiques des végétaux

Les marqueurs de végétaux mentionnés dans la partie suivante ont été caractérisés sur la base de la spectrométrie de masse par comparaison avec des spectres de masse de molécules de référence ⁽⁶⁾. Parallèlement à la recherche de ces marqueurs spécifiques, nous avons tenté de confirmer nos observations, par la recherche de corrélations entre couvert végétal et distributions de composés non spécifiques ⁽³⁾.

Composés linéaires :

Les composés linéaires retrouvés dans les profils sont essentiellement de trois types, à savoir les alcanes, les alcools et les acides carboxyliques. Dans le cas des 4 échantillons de sol étudiés, on observe des hydrocarbures saturés possédant principalement un squelette hydrocarboné linéaire.

Les hydrocarbures saturés et insaturés représentent une famille de composés qui a été très étudiée en biogéochimie. Les hydrocarbures saturés sont habituellement peu abondants dans les sédiments récents mais représentent en général une fraction importante de la matière organique ayant subi des processus de maturation/cracking, comme c'est le cas avec les pétroles. Les composés insaturés, quant à eux, sont principalement rencontrés dans les sédiments et sols relativement récents. En effet, la présence de doubles liaisons leur confère une instabilité qui ne leur permet pas une bonne préservation au cours des processus de maturation⁽⁷⁾.

- *Alcanes linéaires*

La présence d'alcane linéaires dans les sédiments et les sols récents est due à un certain nombre d'organismes (végétaux, algues) et dans notre cas, la distribution de ces derniers s'étend du terme en C₁₉ au terme en C₃₃ (cf. Figure 4) avec une prédominance des homologues impairs. Un des apports principaux est celui issu de végétaux supérieurs qui rassemblent les alcanes dont le nombre de carbones est supérieur à 20 avec une prédominance marquée des n-alcane à nombre de carbone impairs. Ces n-alcane sont caractéristiques de cires cuticulaires de végétaux supérieurs⁽⁷⁾.

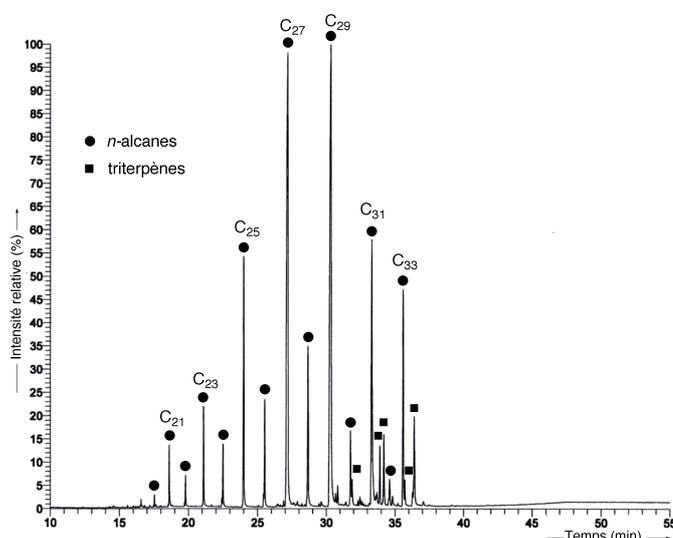


Figure 4. Chromatogramme GC-MS représentatif de la fraction alcanes (échantillon EFE2 représenté)

D'après la littérature (cf. II.2), la prédominance de certains homologues peut permettre de conclure quant à la nature de la couverture végétale, et pour les n-alcane, c'est l'homologue en C₂₉⁽³⁾ qui prédomine dans le cas du chêne (même si celui en C₂₇ est également bien représenté) alors que c'est celui en C₂₇^{(3) (5)} qui est prépondérant dans le cas du hêtre. Les profils moléculaires des n-alcane des 4 horizons de sol étudiés (cf. Figure 4) sont dominés à la fois par l'homologue en C₂₇ et par celui en C₂₉, ce qui confirme que nous sommes en présence d'un sol sous une couverture végétale de type chênaie – hêtraie avec une contribution importante de chaque espèce (estimation en accord avec celle établie sur la base de la litière végétale constituée en grande partie de feuilles de chêne et de hêtre en proportions quasi égales).

Lorsque l'on compare les profils d'alcane des 4 horizons, on constate que la distribution de cette série est conservée avec la profondeur. En effet, on observe toujours une prédominance des homologues en C₂₇ et C₂₉ et les proportions restent les mêmes, ce qui confirmerait la présence d'une couverture végétale stable.

- *Alcools linéaires*

Parmi les principaux résultats observés jusqu'à présent, on constate que les extraits lipidiques des quatre échantillons sont caractérisés par une présence marquée des alcools linéaires à prédominance paire. Dans notre cas, les fragmentogrammes de masse à $m/z=61$ (cf. annexe 2 et 3) montrent une distribution des n-alcools globalement semblable pour les 4 horizons de sols étudiés. De plus, on constate que l'homologue en C_{24} domine la distribution des n-alcools (cf. Figures a-d, annexe 3) ce qui semble être caractéristique de la contribution du chêne (cf. Figure f, annexe 3). Cependant, on ne distingue pas une prédominance aussi marquée du composé en C_{28} caractéristique des feuilles de hêtre (cf. Figure e, annexe 3). Quant à l'alcool en C_{22} , celui-ci est remarquablement présent dans les 4 sols, alors qu'il est peu abondant dans les feuilles de hêtre et de chêne. On remarquera toutefois que ce composé est bien représenté à la fois dans les racines de hêtre et de chêne (cf. Figures g et h, annexe 3), ce qui laisserait à penser que les lipides issus des racines sont susceptibles de contribuer de manière non négligeable à la m.o des sols, quel que soit l'horizon considéré. Nous reviendrons sur ce point, concernant notamment la possible contribution des racines de chêne dans le paragraphe 3.c.

- *Acides carboxyliques linéaires*

Tout comme pour les n-alcools, la distribution des n-acides (cf. Figures a-d, annexe 4) est marquée par une prédominance paire. En ce qui concerne les acides, outre les composés linéaires, leur distribution semble différente des distributions classiquement observées dans le cas de lipides de végétaux (cf. Figures e-h, annexe 4). En effet, on note la présence d'un massif composé d'acides ramifiés de C_{16} à C_{19} dans les sols, dont l'origine demeure incertaine (cf. annexe 4). Toutefois, la présence d'acides ramifiés (composés présentant des isomères de types *iso* et *anteiso*-acides dans la distribution des acides de C_{16} à C_{19}) indique une contribution de l'activité bactérienne à la matière organique du sol⁽⁸⁾. De plus, la proportion relative des acides impairs est particulièrement marquée dans les profils étudiés si l'on compare à leur abondance dans les extraits lipidiques de végétaux non altérés.

Si l'on confronte les fragmentogrammes de masse à $m/z=74$ (cf. annexe 2) montrant la distribution des n-acides des sols (cf. Figures a-d, annexe 4) à ceux des extraits de végétaux (racines et feuilles de hêtre et de chêne), on observe que les 4 profils de sols sont relativement proches, mais sont en revanche très différents de ceux des feuilles et racines. Cela nous indique qu'il serait trop simpliste de vouloir résumer l'origine des acides $>C_{20}$ à la seule contribution du hêtre et du chêne, et que ces derniers proviennent sans doute, en partie tout au moins, d'autres apports non caractérisés pour l'instant, sans même tenir compte du fait que des processus d'altération/ biodégradation sont susceptibles de modifier la nature des distributions.

Composés polycycliques :

- *Stéroïdes*

En ce qui concerne les stéroïdes de végétaux, on retrouve dans les échantillons essentiellement le sitostérol (III; Figure 3). La fonction des phytostérols (généralement en C_{29}) dans les plantes est identique à celle du cholestérol (C_{27}) chez l'homme et consiste au maintien de la structure et au fonctionnement de la membrane cellulaire, ce qui explique que ce stéroïde soit

majoritaire chez les végétaux. Cependant, sa présence ubiquiste au sein des végétaux en fait un composé inutilisable en tant que biomarqueur chemotaxonomique.

On observe également d'autres stéroïdes dérivés du sitostérol fonctionnalisés en 3 (alcool, cétone) ou présentant des insaturations, mais qui ne présentent pas non plus de valeur chemotaxonomique. Nous noterons toutefois la présence d'ergostérol (*composé 1, Figure 7.a*) parmi les lipides issus des feuilles de hêtre (litière) ; ce composé est caractéristique de champignons et peut être lié à la présence de ce type d'organismes contribuant fortement à la dégradation de la litière végétale.

- *Hopanes*

Les hopanoïdes sont une classe de composés en général abondante dans les sédiments ^{(1) (7)}. Dans la majorité des cas, ils proviennent de constituants membranaires de certains organismes procaryotes et assurent le même rôle de renforçateur membranaire que les stérols chez les eucaryotes. Dans notre cas d'étude, on ne retrouve que peu de hopanes (*VI, Figure 3*) dans les échantillons étudiés. Certains composés de cette série n'ont pu être mis en évidence qu'après un fractionnement plus fin par chromatographie sur gel de silice de l'extrait organique. Ces molécules attestent ainsi de l'activité de la flore bactérienne susceptible d'être à l'origine de processus de biotransformations affectant les structures lipidiques des sols.

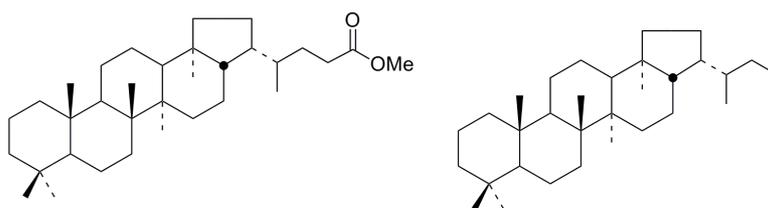


Figure 5. Structures de hopanes observées dans les profils chromatographiques

- *Dérivés de triterpènes de végétaux supérieurs*

Les triterpènes de végétaux supérieurs représentent une famille de lipides chez les angiospermes et montrent une très vaste diversité structurale. Toutefois la majorité d'entre eux possède un squelette hydrocarboné appartenant à la famille de l'oléanane, de l'ursane et du lupane (*cf. annexe 1 : nomenclature*). Comme nous le verrons par la suite, les triterpènes de végétaux supérieurs sont très bien représentés dans nos échantillons de sols où ils sont présents sous forme d'alcènes, de cétones, d'acides, d'alcools ou encore de composés polyfonctionnalisés. De même, ils font partie des lipides majeurs des extraits de végétaux que nous avons analysé (feuilles, racines), et leur distribution est très variable en fonction de la nature des espèces végétales considérées (chêne et hêtre dans notre cas).

Les 4 profils de sols présentent sensiblement le même cortège de triterpènes de végétaux supérieurs, comprenant la friedeline (*I, Figure 3*) et le friedelanol (*II, Figure 3*) en tant que triterpènes très majoritaires, ainsi que l'acide oléanolique (*IV, Figure 3*), la bétuline (*V, Figure 3*) et l'acide maslinique (*VII, Figure 3*). Ces composés sont généralement présents dans de nombreuses essences végétales, et ne possèdent pas de caractère chemotaxonomique important. Toutefois, comme nous le verrons dans le paragraphe 3.c, la présence des composés I et II dans de telles proportions est intrigante, et leur origine possible sera discutée.

En ce qui concerne les triterpènes de végétaux extraits des feuilles et racines (cf. Figures 6 et 7), nous observons une très grande diversité de structures de triterpènes, et une forte variabilité qualitative et quantitative, ceci non seulement entre espèces végétales (chêne vs. hêtre), dans un compartiment donné de la plante (feuilles, racines), mais aussi pour une espèce donnée, entre les différents compartiments (feuilles vs. racines).

Bien évidemment, cela aura des implications majeures concernant l'interprétation en termes d'origine des espèces contribuant à la m.o des sols à partir des profils lipidiques et démontre que les sols sont des écosystèmes dont l'étude moléculaire s'avère extrêmement complexe.

c) Etude du cas particulier de la friedeline

La friedeline est un triterpène pentacyclique, de masse moléculaire $M=426 \text{ g.mol}^{-1}$ et présentant un fragment caractéristique $m/z=273 \text{ g.mol}^{-1}$ en MS (cf. annexe 5). Ce composé est assez fréquent parmi les triterpènes des angiospermes, et ne peut donc être considéré comme spécifique d'une essence végétale donnée. Cependant, son abondance relative est particulièrement et systématiquement remarquable dans les sols sous chênaie⁽³⁾, et tel est le cas dans les distributions représentées en figure 3. Toutefois, d'après la littérature, ce composé, qui est abondant dans l'écorce du chêne liège⁽⁹⁾ (*Quercus suber L.*), espèce non localement implantée, ne fait pas partie des triterpènes majeurs des espèces de chêne communément présentes dans les forêts des Vosges – sont principalement présents *Quercus robur*, ou chêne pédonculé, et *Quercus petraea*, ou chêne rouvre ou sessile -, et son abondance dans de telles proportions demeure intrigante.

En effet, des études précédentes ont montré que ce composé n'était ni présent dans l'écorce des espèces de chênes les plus communes, ni dans leur tronc, ni dans leurs feuilles.

Ainsi, nous nous sommes penchés sur l'origine possible de la friedeline et avons tenté d'en trouver la source dans le cas de nos échantillons de sol :

- Relargage dans le sol à partir des racines de chêne (non étudiées à ce jour)?
- Produit néoformé lors de la décomposition du bois ou des feuilles de chêne ?

Nous avons alors entrepris l'analyse des lipides provenant d'une racine de chêne prélevée sur le profil de sol, ainsi que de feuilles mortes de chêne provenant d'une litière. Par ailleurs, dans la mesure où le hêtre contribue également à la m.o des sols étudiés, nous avons également analysé les lipides issus d'une racine de hêtre et de feuilles mortes de hêtre d'une litière.

- *Analyse d'une racine de chêne*

Le chromatogramme en phase gazeuse de la figure 6.b correspond à l'extrait lipidique provenant d'une racine de chêne prélevée sur le profil pédologique lors de la collecte de nos échantillons. Comme nous pouvons le constater, les composés linéaires, très présents dans les sols, sont pratiquement absents dans la racine de chêne. Ces composés provenant principalement des cires cuticulaires ne sont donc pas produits par les racines de manière importante.

Nous rappelons toutefois que la distribution des n-alcools issus de la racine est prédominée par les homologues en C_{24} et C_{22} (cf. Figure h, annexe 3), et montre certaines similitudes avec la distribution des n-alcools provenant des 4 sols ce qui pourrait suggérer qu'une partie des lipides du sol provient d'une m.o d'origine racinaire.

De plus, la présence de friedeline (*composé 5, Figure 6.b*) et de dérivés associés (*composés 6 et 8*) en tant que composés majeurs des lipides de la racine de chêne semble conforter cette possibilité même si la présence de certains triterpènes (*eg. composé 11, Figure 6.b*), absents dans les sols – et inversement – amène à nuancer cette conclusion.

Ainsi, même si de la friedeline semble être transmise dans le sol par l'intermédiaire des racines, il est vraisemblable qu'une autre source contribue à l'approvisionnement du sol, en quantité non négligeable.

- *Analyse de feuilles de chêne*

Contrairement aux racines, le profil lipidique des feuilles de chêne de litière (*cf. Figure 6.a*) est dominé par les composés linéaires (*n*-alcools, *n*-acides, *n*-alcanes, méthylcétones). Leur distribution présente le même type de prédominance que celles observées dans le cas des sols (*n*-alcanes : C₂₇ et C₂₉; *n*-alcools : C₂₄; *n*-acides : C₂₆ et C₂₈, *annexe 3*), ce qui indique que les feuilles de chêne contribuent très certainement de manière prépondérante à la m.o des sols. En revanche, la friedeline est totalement absente des triterpènes des feuilles de chêne, ces derniers étant principalement constitués de dérivés stéroïdiques (*sitostérol*) et de triterpènes en série oléane et lupane.

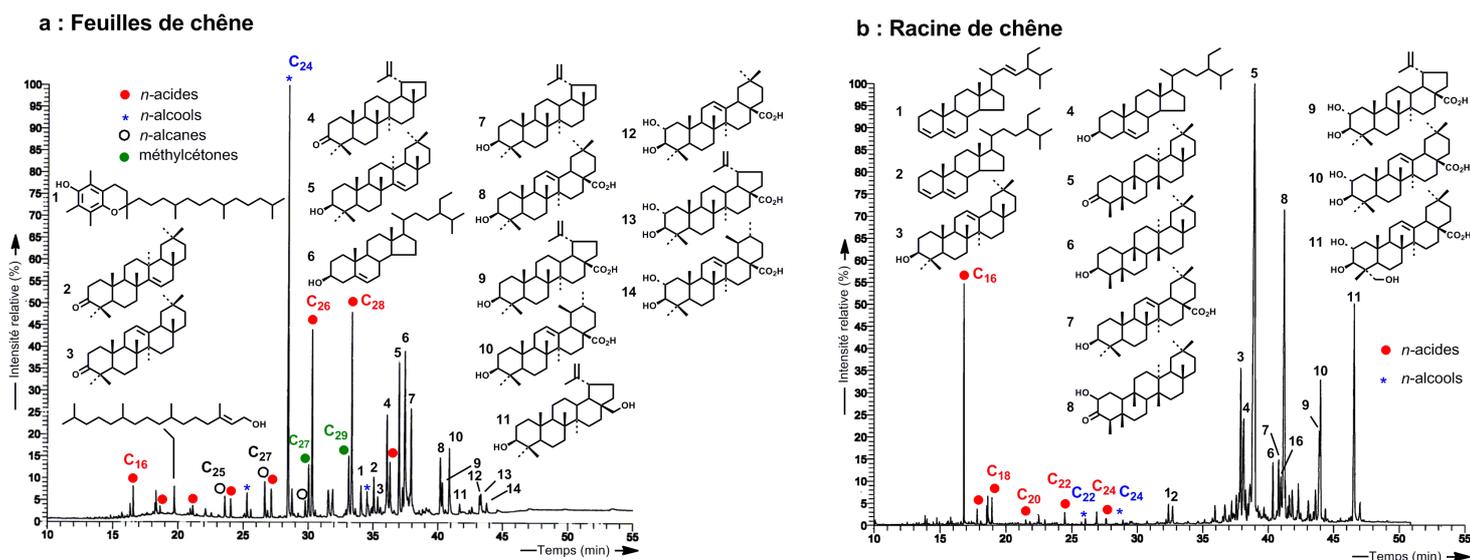


Figure 6. Chromatogrammes GC-MS des feuilles de chêne (a) et de la racine de chêne (b)

Conditions : Colonne : HP 5-MS (30m x 0,25 mm x 0,1 µm, épaisseur de film) - Gaz vecteur : Helium - inj.vol : 1µL. Méthode : 40°C à 200°C – 10°C/min puis 200°C à 320°C – 4°C/min puis 320°C pendant 40 min. Gamme de masse : 50 -700 m/z – Mode ionisation : impact électronique, 70 eV

- *Analyse d'une racine de hêtre*

Une racine de hêtre présente dans le profil pédologique a également été analysée en vue d'identifier, d'une part, des biomarqueurs chemotaxonomiques du hêtre (il n'en est en effet pas fait mention dans la littérature ⁽⁵⁾) et, d'autre part, afin de vérifier si ce type de racine ne contribue pas également à l'apport de friedeline dans les sols.

Le chromatogramme de la figure 7.b représente le profil moléculaire de l'extrait lipidique de la racine de hêtre.

De la même manière que pour la racine de chêne, on constate la présence limitée des séries de

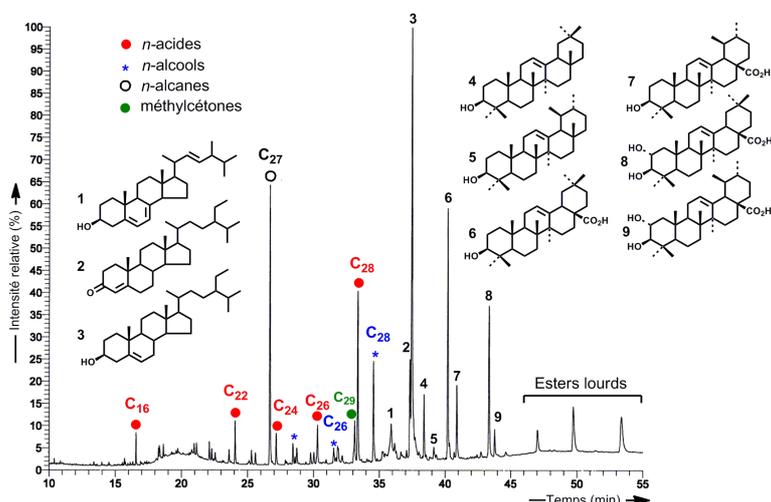
composés linéaires (alcools et acides principalement, avec prédominance des homologues en C₂₂ et C₁₆, respectivement ; *Figure 6.b et 7.b*).

En ce qui concerne les terpénoïdes polycycliques, on peut remarquer que les triterpènes sont moins bien représentés que dans le cas de la racine de chêne, et que c'est le sitostérol qui prédomine largement. Parmi les triterpènes, nous avons observé la présence de composés non chemospécifiques en série oléanane/ursane/lupane. En revanche, nous pouvons noter l'absence totale de dérivés en série friedeline, ce qui exclut les racines de hêtre comme source potentielle de friedeline.

- *Analyse de feuilles de hêtre*

Les feuilles de hêtre, tout comme les racines, sont dominées par les dérivés stéroïdiques (*cf. Figure 7.a*) et se caractérisent par une faible diversité de triterpènes. Nous noterons également l'absence totale de friedeline, excluant les feuilles de hêtre comme étant à l'origine de ce triterpène, dont la source demeure pour l'instant énigmatique.

a : Feuilles de hêtre



b : Racine de hêtre

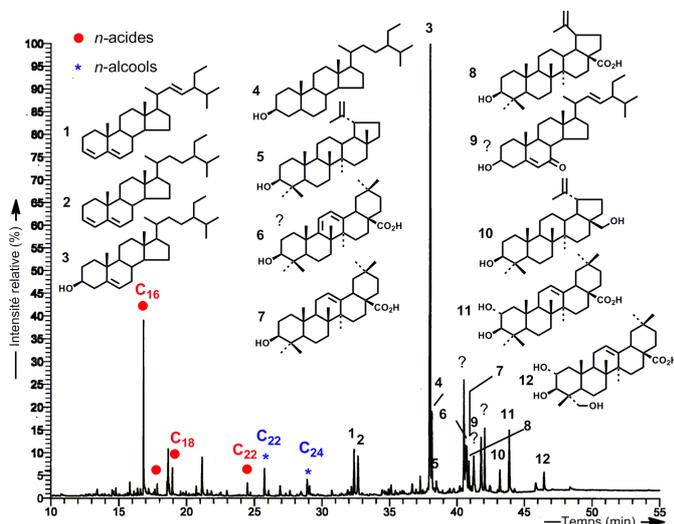


Figure 7. Chromatogrammes GC-MS des feuilles de hêtre (a) et de la racine de hêtre (b)

Conditions : Colonne : HP 5-MS (30m x 0,25 mm x 0,1 µm, épaisseur de film) - Gaz vecteur : Helium - inj.vol : 1µL. Méthode : 40°C à 200°C - 10°C/min puis 200°C à 320°C - 4°C/min puis 320°C pendant 40 min. Gamme de masse : 50 -700 m/z - Mode ionisation : impact électronique, 70 eV

4. Conclusion

L'étude des extraits lipidiques issus de quatre échantillons prélevés sur un horizon de sol de la forêt de l'Elmerforst n'a pas montré de différences marquantes en termes de composition en fonction de leur profondeur (et donc de leur âge). De plus, même si la quantité de matière organique extraite est 10 fois moins importante en profondeur qu'en surface, les profils sont dans l'ensemble relativement similaires d'un point de vue qualitatif. Nous aurions pu, en effet, nous attendre à ce que la matière organique soit partiellement ou sévèrement (bio)dégradée en profondeur.

Ainsi, la recherche des lipides présents dans les horizons de surface avec une végétation stable sur une période d'au moins 150 ans (800 ans dans le cas des sols étudiés ici) laisse entrevoir une distribution de biomarqueurs particulière qui semble se conserver sur une certaine profondeur. Ces constatations offrent donc la possibilité de caractériser le couvert végétal au niveau moléculaire afin

de retracer l'histoire du sol et les changements notables induits par l'anthropisation.

Une question importante subsiste quant à l'origine de l'abondance de la friedeline dans les sols sous chênaie. Nous avons pu voir que ni le chêne (bois, feuilles), ni le hêtre (bois, feuilles, racines) ne peuvent expliquer la présence de ce composé dans les sols. En revanche, la friedeline représente le composé majeur de l'extrait lipidique des racines de chêne, et celles-ci pourraient donc en être, partiellement, la source, même si cette observation ne peut être envisagée comme l'unique explication. Nous noterons à cet égard que des travaux récents au sein du laboratoire ⁽¹⁰⁾ ont permis d'établir que la friedeline était présente dans du bois de chêne fortement décomposé ce qui pourrait contribuer à la compréhension de ce phénomène.

III. Etude de l'évolution de biomarqueurs dans les sols : apport de la datation au ¹⁴C dans la compréhension des mécanismes de transfert

Dans le cadre de l'étude d'horizons de sols profonds, une étude semblable à celle mise en œuvre pour des horizons de surface pourrait permettre, par le biais de la caractérisation des biomarqueurs, de fournir des informations concernant la nature des végétaux qui contribuent à la matière organique ancienne. Cependant, la bioturbation ou la pénétration des racines peuvent apporter du matériel récent dans les horizons plus profonds, ou, inversement, remobiliser du matériel ancien vers la surface. C'est pourquoi une étude basée sur des méthodes de datation au ¹⁴C pourrait contribuer à la compréhension des mécanismes de transfert qui affectent les composés lipidiques selon leur structure, leur origine...

Des études sur des sédiments marins ⁽¹¹⁾ ont montré qu'on retrouve dans un même sédiment de la matière organique issue de différentes sources et de différents âges ; chaque composante apportant sa contribution au carbone organique total. Ce cas précis est particulièrement fréquent à proximité des continents où des débris de plantes, de la matière organique de sols et du carbone organique (issu de l'érosion des roches) se déposent et se mêlent à la biomasse formée in situ. Des datations au ¹⁴C effectuées sur les différentes classes de composés présentes dans les sédiments ont montré que la teneur en ¹⁴C est hétérogène. Ces variations sont, par ailleurs, également identifiables au niveau de marqueurs moléculaires individuels.

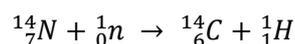
Ainsi, cette technique pourrait permettre de déterminer le temps de résidence moyen (TMR) à l'échelle de molécules individuelles dans les sols et donc de connaître les processus de transfert qui les affectent. Une molécule peut en effet rester durant un certain temps dans un réservoir et la durée moyenne durant laquelle elle réside dans ce réservoir est appelée temps de résidence. Ces temps de résidence dépendent de la rapidité des transferts. Ainsi, les temps de résidence sont d'autant plus courts que la rapidité des transferts est grande.

En réponse à notre problématique, l'idée serait d'isoler des molécules individuelles afin d'effectuer des mesures de TMR (datation au ¹⁴C) par AMS (Accelerator Mass Spectrometry). En effet, les développements de l'AMS pour la datation au ¹⁴C dans les années 70 ont apporté une nouvelle dimension aux études en permettant les analyses sur des échantillons de quelques

milligrammes. La datation au ^{14}C en haute résolution est aujourd'hui une méthode reconnue pour l'étude et la reconstruction des paléoclimats d'où l'idée d'appliquer cette méthode à notre thématique. De nos jours, elle permet les analyses sur seulement 10 μg de carbone, ce qui rend possible la datation sur des molécules individuelles à partir des extraits lipidiques de sols.

1. **Accelerator Mass Spectrometry (AMS)** ⁽¹²⁾

Le carbone 14 ($T_{1/2}=5370$ ans) est le seul des 3 isotopes du carbone à être radioactif. Il est le produit de la réaction entre un rayon cosmique, qui génère des neutrons secondaires, et un atome d'azote :



Le ^{14}C qui en résulte est rapidement oxydé en dioxyde de carbone et est répandu dans l'atmosphère. Le $^{14}\text{CO}_2$ est ensuite réparti dans les réservoirs naturels majeurs comme les océans et les sols via des processus de transfert de gaz et la photosynthèse.

Dater un échantillon de matière organique consiste à mesurer son rapport $^{14}\text{C}/\text{C}$ total, c'est-à-dire ce qu'il reste de radiocarbone naturel compte tenu de la désintégration radioactive. Le rapport obtenu permet ensuite de déduire l'âge de cet échantillon. Ce rapport $^{14}\text{C}/\text{C}$ total est mesuré soit indirectement par la mesure de l'activité spécifique - nombre de désintégrations par unité de temps et par unité de masse de carbone - due au radiocarbone naturel qui est proportionnelle au rapport $^{14}\text{C}/\text{C}$ total, soit directement par spectrométrie de masse.

Les développements récents de la spectrométrie de masse (cf. *annexe 6*) ont permis de développer des techniques novatrices d'AMS ⁽¹³⁾ qui permettent une datation absolue de très petites quantités de produit (quelques dizaines de microgrammes de carbone) avec une précision bien plus importante.

Dans le cadre du programme GESSOL, une collaboration avec l'ETH de Zürich nous permet de disposer du spectromètre afin d'effectuer des mesures de ^{14}C sur nos échantillons.

2. **Stratégie d'analyse**

Afin d'appliquer la méthode de datation précédente à des composés individuels présents dans les échantillons de sols de l'Elmerforst, la mise en place d'un protocole analytique basé sur des techniques de séparation qui permettent d'isoler et de purifier des quantités de composés suffisantes pour effectuer des datations par ^{14}C haute résolution est nécessaire.

a) **Choix des composés**

Comme nous l'avons vu précédemment, la friedeline (*I*; *Figure 3*) est un des constituants majeurs des lipides de végétaux analysés dans nos échantillons et pourrait donc être un candidat potentiel pour de premières mesures. Notre objectif est donc de l'isoler en quantités suffisantes dans les 4 horizons de sol par chromatographie sur silice (colonne et couche mince) et HPLC en phase inverse ⁽¹⁴⁾. En effet, la chromatographie sur colonne nous a permis de cibler la fraction dans laquelle se situe la friedeline. Cette dernière se retrouve mélangée à de nombreuses cétones triterpéniques desquelles elle sera séparée par CCM et HPLC. Une fois purifiée, la mesure du ^{14}C de la

molécule isolée pourra être réalisée. Ces travaux sont actuellement en cours.

Afin de pouvoir confronter les résultats de la datation de la friedeline avec d'autres mesures, nous avons opté pour la fraction comportant les alcanes linéaires. En effet, ces composés sont particulièrement résistants à l'altération et, de plus, des études antérieures ont permis de montrer que la purification et la datation de ces molécules étaient réalisables ^{(11) (15) (16)}.

b) Isolement des composés

- **Friedeline**

Après purification par HPLC de la friedeline, on ne distingue plus que 2 pics (*cf. annexe 7*). Le pic le moins intense correspond à l'isomère de la molécule cible, l'épi-friedeline. La présence de ce composé n'affectera en rien les résultats de la datation obtenus car il semble que l'épi-friedeline se soit formée par isomérisation de la friedeline lors de l'étape de purification par CC.

- **n-alcanes**

En ce qui concerne la fraction des n-alcanes (*cf. Figure 4*), on peut observer la présence d'autres composés mineurs (fernènes, hopanes...). En plus d'avoir une estimation de l'âge de la fraction des alcanes, il serait intéressant d'avoir l'âge de composés ciblés. Ainsi, aux vues de leur intensité relative plus importante que les autres, le n-nonacosane (C₂₉) et le n-heptacosane (C₂₇) ont été isolés par HPLC. Les résultats obtenus par datation au ¹⁴C pour ces 2 composés pourront ainsi être confrontés à ceux obtenus pour la fraction globale et la friedeline.

Les chromatogrammes GC-MS obtenus après cette purification figurent en annexe 8 et la séparation n'est pas optimale dans le cas des deux alcanes ciblés. En effet, le n-heptacosane n'a pu être séparé du diplotène par HPLC. Toutefois, il a été possible de séparer ces 2 composés car cela revient à séparer un composé saturé d'un composé insaturé. Pour ce faire, le mélange a été purifié par CC en utilisant de la silice imprégnée au nitrate d'argent (10%) qui retient sélectivement les composés insaturés. Cela a permis d'obtenir séparément le n-heptacosane et le diplotène purs (*cf. annexe 9*) qui pourront être datés par AMS. En revanche, la fraction contenant le n-nonacosane est plus problématique car d'autres n-alcanes quoique mineurs, coéluent dans cette fraction. Celle-ci sera tout de même analysée et les résultats seront confrontés à ceux obtenus pour la fraction des alcanes totale.

Dans notre cas d'étude, si l'on s'en réfère à la littérature ^{(11) (15)}, l'utilisation de la GC préparative aurait été plus aisée. Cette méthode permet de recueillir une quantité d'environ 5µg de composé pur par injection et, comme la datation par AMS haute résolution ne nécessite qu'une dizaine de microgramme de composé, une quantité suffisante aurait été collectée assez rapidement.

L'utilisation de la GC préparative aurait donc pu permettre une économie de temps certaine pour la séparation des n-alcanes ⁽¹⁷⁾.

c) Datation au ¹⁴C

La friedeline, le n-nonacosane, le n-heptacosane et la fraction des n-alcanes pour chacun des 4 horizons de sol de la forêt de l'Elmerforst ont été purifiées et vont pouvoir être datées par mesure

radiocarbone. Ces mesures n'ont malheureusement pas pu être effectuées durant la période du projet de master en raison des délais et des impératifs des différentes composantes du projet. Elles seront probablement effectuées dans la période de septembre à octobre 2011.

Néanmoins, si l'on envisage qu'aucune transformation n'a lieu et que tous les composés sont enfouis de manière régulière ⁽¹⁸⁾, on peut estimer que les résultats montreront une variation linéaire de l'âge du sol avec la profondeur. Or, nous avons pu constater qu'une partie de la friedeline semble être relarguée dans le sol au niveau des racines. Il se pourrait donc que les résultats obtenus pour les alcanes soient bien différents de ceux obtenus pour la friedeline.

Remarque : les mesures effectuées ne concernent que peu de composés par rapport à la diversité de familles identifiées dans les profils. Les résultats qui seront obtenus généralisés à un comportement global du vieillissement du sol et des processus de transfert peuvent être erronés car ces résultats ne sont valables uniquement pour les composés étudiés.

Ainsi, il est parfaitement envisageable que la friedeline et les n-alcanes ne subissent pas de brassage dû à une activité biologique.

IV. Conclusion

Au cours de ces travaux de master II, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des constituants lipidiques provenant d'un horizon de sol possédant une couverture végétale de type chênaie - hêtraie. Le couvert contribue à la matière organique du sol aussi bien en surface qu'en profondeur. Ainsi, par l'analyse des signatures lipidiques laissées dans les sols par des essences végétales données, nous avons tenté de retracer l'histoire de l'horizon de sol de la forêt de l'Elmerforst. Nous avons ainsi pu constater que la distribution observée semble se conserver sur une certaine profondeur. Il serait par conséquent possible de caractériser le couvert végétal au niveau moléculaire et de retracer l'histoire du sol et les changements notables notamment liés aux modifications climatiques ou à l'anthropisation.

Lors de la confrontation de cette étude avec la littérature, nous avons constaté que la friedeline était particulièrement abondante dans les sols sous chênaie. Pourtant, mis à part dans le chêne liège, la friedeline n'en n'est pas le composé majeur. C'est pourquoi nous avons tenté d'en rechercher l'origine. La racine du chêne semble relarguer de la friedeline dans le sol ; toutefois ce ne peut être la seule source.

Dans le cadre du programme GESSOL, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'évolution des biomarqueurs dans les sols. Pour ce faire, nous avons isolé des molécules individuelles en vue de les dater au carbone 14. Par la suite, il sera essentiel de comprendre l'apport de la datation au carbone 14 dans la compréhension des mécanismes de transfert qui affectent les sols.

V. *Partie expérimentale*

1. **Indications générales**

a) **Techniques chromatographiques**

- **Chromatographie sur couche mince (CCM)** : les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ Merck de 0,5 mm d'épaisseur pour purifier les fractions contenant la friedeline.

- **Chromatographie sur colonne (CC)** : les chromatographies sur colonne de silice ont été effectuées sur du gel de silice 60 Merck de granulométrie 40-63 µm ayant été activé pendant 4 heures à 120°C.

- **Chromatographie en phase gazeuse (GC)** : les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées sur un appareil Hewlett-Packard HP 6890 Series équipé d'un injecteur « on-column », d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) maintenu à 300°C et d'une colonne capillaire HP-5 (30m x 0,32mm x 0,25µm). L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur avec un débit constant de 2,5mL/min.

Le programme utilisé est le suivant : 40°C à 200°C – 10°C/min puis 200°C à 320°C – 4°C/min puis isotherme à 320°C pendant 40 min.

- **Chromatographie liquide haute performance (HPLC)** : l'isolement de la friedeline et des alcanes en C₂₇ et C₂₉ ont été effectués sur un système Waters 590 comportant un module de pompage SSV, un injecteur modèle U6K et un détecteur de type réfractomètre différentiel R430.

Colonne analytique : Du Pont Zorbax ODS RP C₁₈, 250 x 4,6mm, 5µm

Eluant : MeOH, 1mL/min pour la friedeline

MeOH : CH₂Cl₂ (7 : 3) pour les alcanes, 1mL/min

b) **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**

Les spectres de masse ont été obtenus par impact électronique (EI) avec un couplage chromatographique sur un appareil TSQ Quantum couplé à un chromatographe en phase gazeuse TRACE GC ULTRA Thermo Scientific équipé d'un injecteur automatique triplus « PTV simili on-column ».

Conditions d'utilisation :

- Source impact électronique (EI) : 70 eV
- Température de la source : 180 °C
- Température de l'injecteur : 75 °C à 300 °C (250 °C/min)
- Colonne capillaire en silice fondue (apolaire) : HP5-MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm
- Vitesse linéaire du gaz vecteur : Hélium, 1mL/min
- Programme de température : 40 °C à 200 °C – 10 °C/min puis 200 °C à 320 °C – 4 °C/min puis isotherme à 320 °C pendant 40 min.

2. Analyses géochimiques

a) Précautions particulières

Afin de s'affranchir de toute contamination organique dans nos échantillons (squalène, cholestérol, phtalates), un certain nombre de précautions particulières doivent être prises. Ainsi, les solvants utilisés sont redistillés, la silice, le coton, le sable et les pipettes Pasteur sont lavées pendant 48 heures au dichlorométhane dans un soxhlet. Quant à la verrerie, elle est lavée avec soin au détergent, rincée abondamment à l'eau puis séchée à l'acétone distillé. Enfin, la verrerie est lavée au dichlorométhane distillé. En ce qui concerne les plaques de silice employées pour les étapes de purification par CCM, elles sont éluées à l'acétate d'éthyle distillé, séchées à température ambiante (24 h) puis réactivées à 120 °C à l'étuve (4 h).

b) Extractions

Les prélèvements de sols, humides, ont été congelés dans le but de conserver l'échantillon en l'état. Avant chaque extraction on procède à la décongélation du sédiment ; une petite quantité de chaque échantillon est ensuite récupérée en vue de déterminer le taux d'humidité du sol. Ainsi, deux aliquotes d'environ 10 g et 20 g de sédiment humide sont placées à l'étuve à 110 °C pendant 24 h. La perte en masse constatée correspond à la perte en eau de l'échantillon.

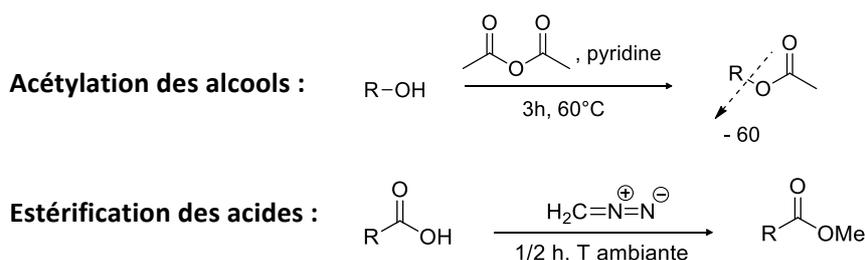
Les échantillons de sol (environ 2 kg) sont tout d'abord extraits dans 1,6 L un mélange CH₂Cl₂ : MeOH (2 : 1) sous ultrasons pendant 1 heure. L'extrait est ensuite laissé à décanter une nuit pour que la sédimentation ait lieu. L'extrait biphasique – dû à la présence importante d'eau dans les échantillons – est ensuite filtré sur coton. Le filtrat est récupéré puis placé dans une ampoule à décanter, puis après décantation, la phase organique est filtrée sur célite. Les échantillons subissent de 2 à 3 extractions supplémentaires avec un mélange CH₂Cl₂ : H₂O (1 : 1) pour conserver l'équilibre biphasique et les mêmes étapes de filtration sont répétées. La dernière extraction est effectuée avec du CH₂Cl₂ pur et la phase organique est séparée du sédiment par centrifugation. Les extraits organiques sont enfin réunis et les solvants sont évaporés à l'évaporateur rotatif.

Les racines trouvées dans le sol sont tout d'abord réduites en fins copeaux (environ 7 g). Ces copeaux sont ensuite extraits aux ultrasons avec un mélange CH₂Cl₂ : MeOH (2 : 1) pendant 30 min. L'extrait récupéré est ensuite filtré sur célite et le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif.

Les feuilles de la litière végétale sont lavées, séchées à l'air puis réduites en fins morceaux (environ 2 g). Les feuilles sont extraites aux ultrasons avec un mélange CH₂Cl₂ : MeOH (2 : 1) pendant 1 heure. L'extrait est ensuite filtré sur coton et le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif.

c) Dérivations

L'extrait total obtenu contient de nombreux alcools et acides qui requièrent une dérivation avant d'être analysés par GC et GC-MS. Pour ce faire, on procède à 2 étapes de dérivation selon le mode opératoire suivant :



d) Fractionnement préliminaire

Afin de s'affranchir de la partie la plus polaire de l'extrait total (non analysable par GC et GC-MS), un premier fractionnement préliminaire par CC est effectué. La totalité de l'échantillon dérivé est déposée sur une colonne de silice. Les composés élués dans un volume de CH_2Cl_2 équivalent à six fois le volume mort de la colonne constituent la fraction dite « apolaire », analysable par GC et GC-MS. Cette fraction constitue l'extrait organique dans lequel on retrouve les lipides de végétaux étudiés.

La deuxième fraction dite « polaire » est obtenue à l'aide d'un mélange $\text{MeOH} : \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1 : 1) dont la quantité équivaut à deux fois le volume mort de la colonne. Cette fraction, non analysable en GC et GC-MS, est essentiellement constituée de produits polyfonctionnalisés et macromoléculaires tels que des produits de dégradation de la cellulose et de la lignine.

Remarque : le schéma du protocole analytique employé pour obtenir les extraits totaux figure en annexe 10.

3. **Méthodologie d'isolement et de fractionnement des n-alcane et de la friedeline**

L'extrait organique non dérivé, repris dans un minimum de CH_2Cl_2 , est adsorbé sur silice. Il est ensuite déposé sur colonne de silice et différents éluants sont utilisés afin de procéder à la séparation des produits selon leur polarité. Ainsi, un gradient lent est réalisé en partant de cyclohexane pur pour récupérer la fraction des alcanes, puis une proportion croissante de dichlorométhane est ajoutée, permettant de faire éluer successivement les hydrocarbures insaturés et aromatiques, les esters, les cétones (notamment la friedeline) et une partie des alcools. Puis, de l'acétate d'éthyle en proportion croissante est ensuite ajouté au CH_2Cl_2 pour obtenir les alcools et les acides. Enfin, un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH}$ (1 : 1) est utilisé pour éluer la partie la plus polaire de l'échantillon.

Il est à noter que le suivi de la CC est assuré par un contrôle sur petites plaques de CCM, l'éluant étant adapté en fonction de la polarité des composés sortant. Les révélateurs sont l'UV et l'acide phosphomolybdique.

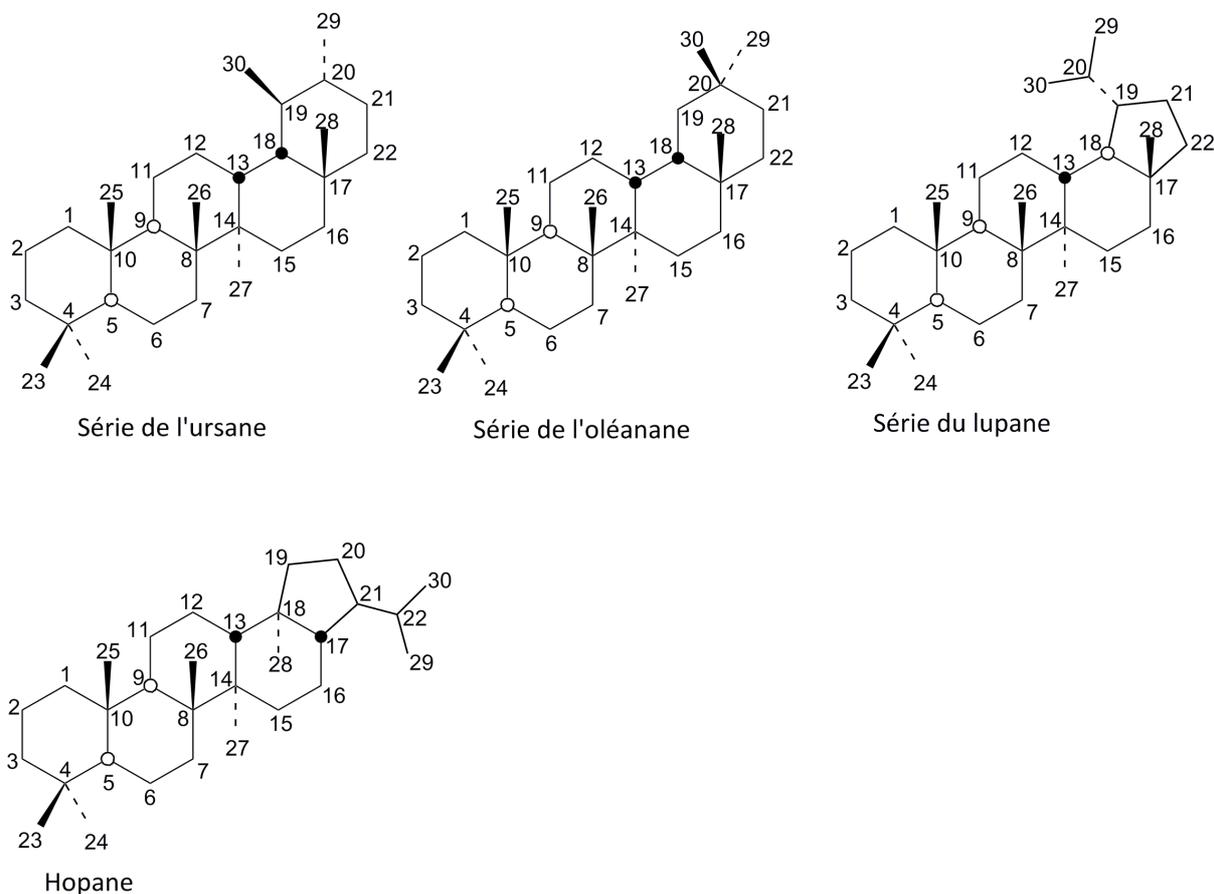
Purification de la friedeline par CCM :

La fraction isolée par CC et contenant principalement la friedeline est purifiée sur une plaque de silice en utilisant du dichlorométhane pur. Le fractionnement est effectué en utilisant de la friedeline de référence (déposée sur la marge de la plaque de CCM) pour délimiter les zones de R_f (cf. annexe 11).

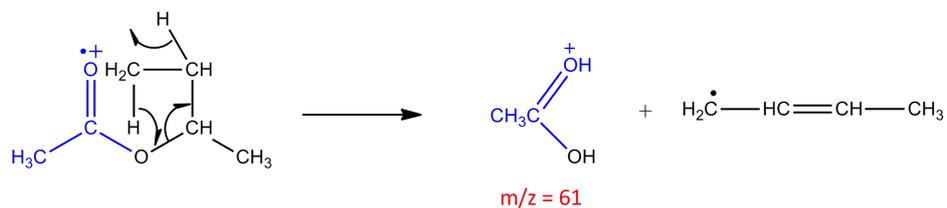
VI. Bibliographie

- (1) *Etude des lipides dans divers types de sols – Aspects moléculaires*, M. Ries-Kautt, 1986, Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg I, France.
- (2) *Discriminating between organic matter in soil from grass and forest by near-infrared spectroscopy*, D. Ertlen, D. Schwartz, M. Trautmann, R. Webster & D. Brunet, *European Journal of Soil Science*, 61, 2010, 207-216.
- (3) *Molecular characterization of soil surface horizons with different vegetation in the Vosges Massif (France)*, J-M. Trendel, P. Schaeffer, P. Adam, D. Ertlen, D. Schwartz, *Organic Geochemistry*, 41, 2010, 1036–1039.
- (4) *Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – V. The fate of lipids in different long-term experiments*, I. D. Bull, P. F. Van Bergen, C.J. Nott, P.R. Poulton, R.P. Evershed, *Organic geochemistry*, 31, 2000, 389-408.
- (5) *Chemotaxonomical investigations of fossil and extant beeches. I. Leaf lipids from the extant *Fagus sylvatica* L.*, T.T. Nguyen-Tu, C. Egasse, B. Zeller, S. Derenne, C. R. Palevol, 6, 2007, 451-461.
- (6) *A review of current applications of mass spectrometry for biomarker/molecular tracer elucidations*, B. R. T. Simoneit, *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 2005, 719-765.
- (7) *Diagénèse précoce de biolipides en milieu sédimentaire : étude moléculaire d'environnements naturels récents et simulations impliquant des terpénoïdes marqués au ^{13}C* , C. Le Milbeau, 2005, Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
- (8) *Wild tropical forest soil characteristics and composition of directly extractable soil lipid fraction*, S. Siaka, Y. Soro, A. A. Adima, L. Leme, A. Ambles, *Journal of Applied Sciences*, 6, 2006, 3110-3115.
- (9) *Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.)*, V. Castola, A. Bighelli, S. Rezzi, G. Melloni, S. Gladiali, J-M Desjoberg, J. Casanova, *Industrial Crops and Products*, 15, 2002, 15-22.
- (10) *Modes de transformation de composés d'origine végétale liés à des processus d'altération naturels*, G. Schnell, Rapport de stage, 2010.
- (11) *Variability in radiocarbon ages of individual organic compounds from marine sediments*, T.I. Eglington, B.C. Benitez-Nelson, A. Pearson, A.P. McNichol, J.E. Bauer, E.R.M. Druffel, *Science*, 277, 1997, 796-799.
- (12) *A gas ion source for radiocarbon measurements at 200 kV*, M. Ruff, L. Wacker, H.W. Gäggeler, M. Suter, H-A Synal, S. Szidat, *Radiocarbon*, 49, 2007, 307-314.
- (13) www.ams.ethz.ch/research/ams/radiocarbon
- (14) *Mixture of closely related isomeric triterpenoid derivatives: separation and purification by reversed-phase high-performance liquid chromatography*, F.J.Q. Monte, J.P. Kintzinger, J.M. Trendel, J. Poinot, *Chromatographia*, 46, 1997, 251-254.
- (15) *Gas chromatographic isolation of individual compounds from complex matrices for radiocarbon dating*, T.I. Eglington, L.I. Aluwihare, J. E. Bauer, E. R. M. Druffel, A.P. McNichol, *Analytical Chemistry*, 68, 1996, 904-912.
- (16) *Post-glacial variations in distributions, ^{13}C and ^{14}C contents of aliphatic hydrocarbons and bulk organic matter in three types of British acid upland soils*, Y. Huang, R. Bol, D. D. Harkness, P. Ineson, G. Eglington, *Organic Geochemistry*, 24, 1996, 273-287.
- (17) *Rapid isolation of biomarkers for compound specific radiocarbon dating using high-performance liquid chromatography and flow injection analysis-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, R.H. Smittenberg, E.C. Hopmans, S. Schouten, J.S. Sinninghe Damsté, *Journal of Chromatography A*, 978, 2002, 129-140.
- (18) *Can isoprenoids in leaves and roots of plants serve as biomarkers for past vegetation changes? A case study from the Ecuadorian Andes*, B. Jansen, K.G.J. Nierop, F.H. Tonneijck, F.W.M. Van der Wielen, J. Verstraten, *Plant Soil*, 291, 2007, 181-198.

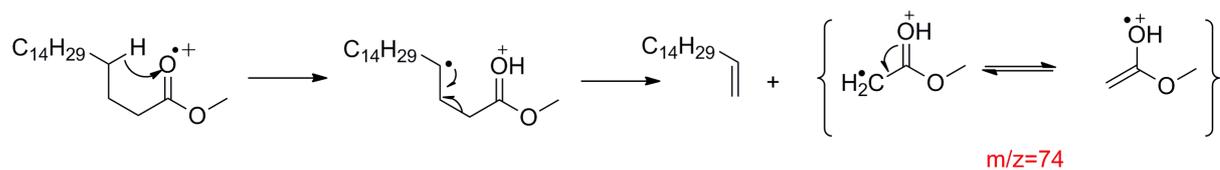
Annexe 1 : Nomenclature



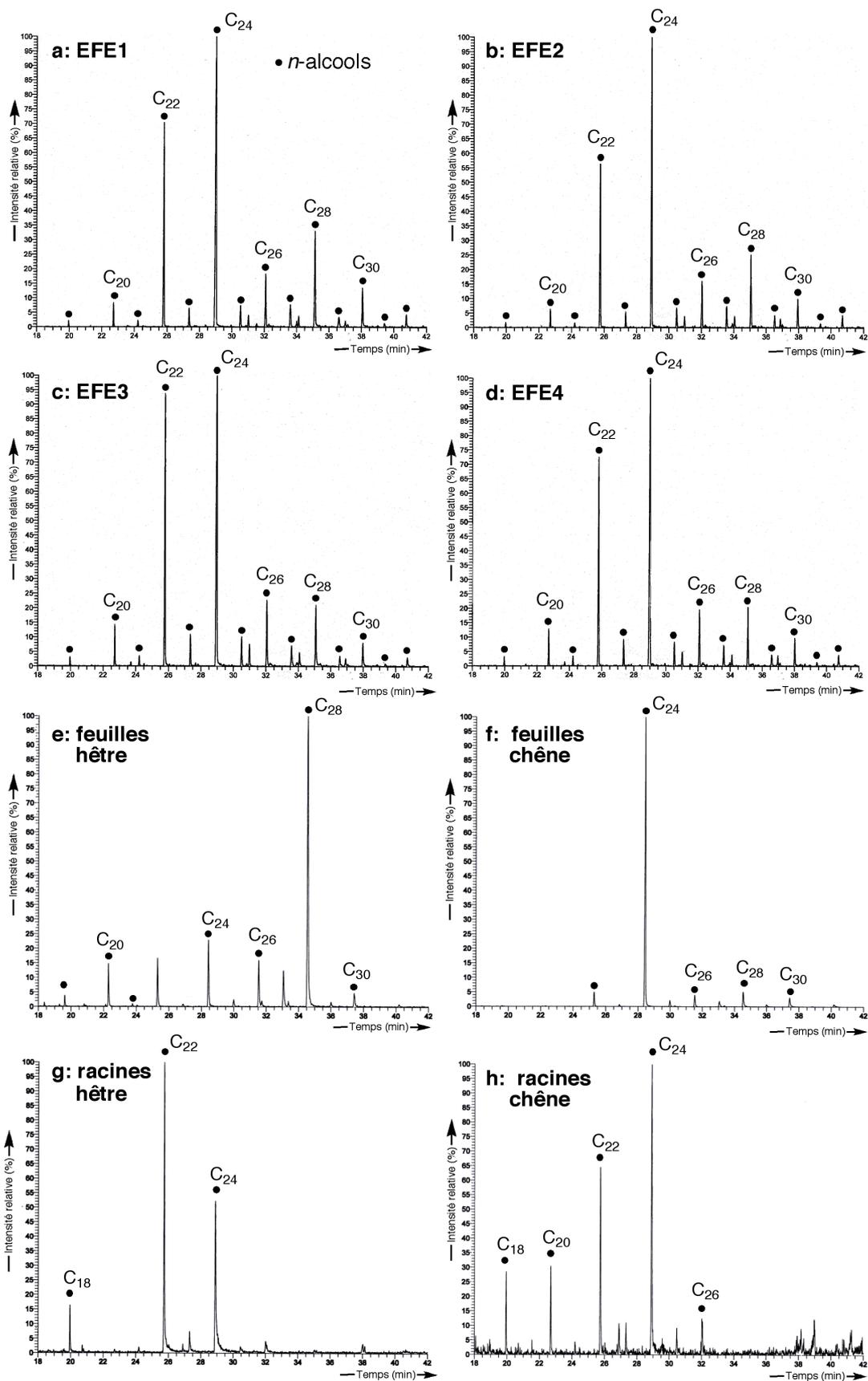
Annexe 2 : Obtention des fragments caractéristiques des alcools ($m/z = 61$) et des acides carboxyliques ($m/z = 74$) en SM



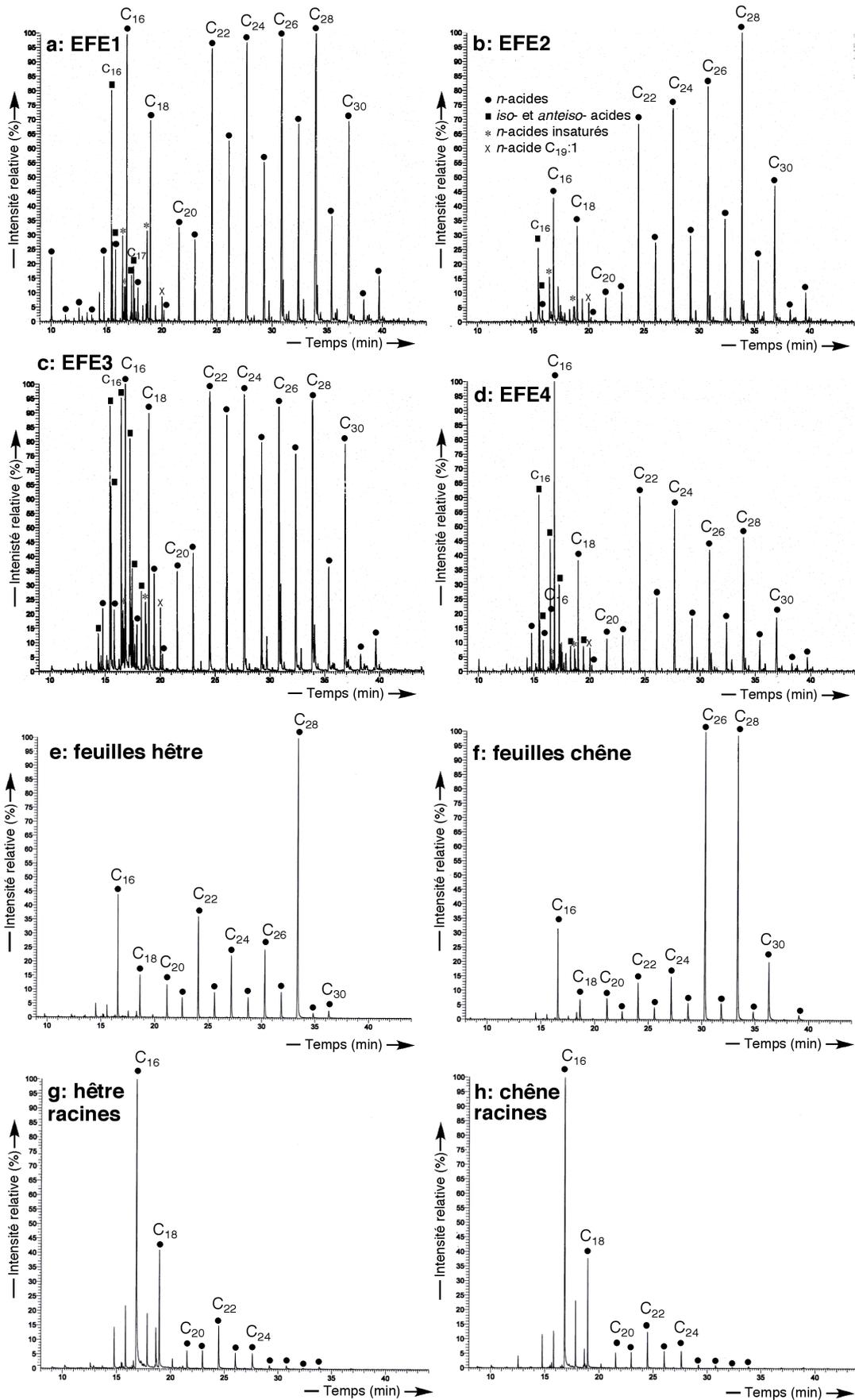
Réarrangement de Mc Lafferty :



Annexe 3 : Alcools linéaires - Fragmentogrammes de masses des 4 horizons de sols à $m/z = 61$

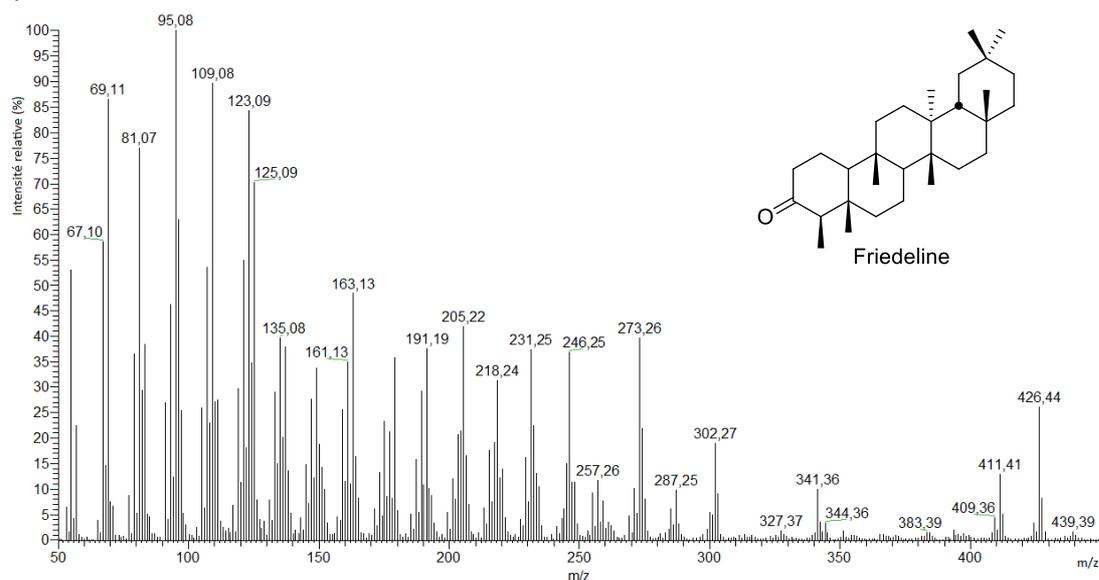


Annexe 4 : Acides carboxyliques linéaires - Fragmentogrammes de masses des 4 horizons de sols à $m/z = 74$.

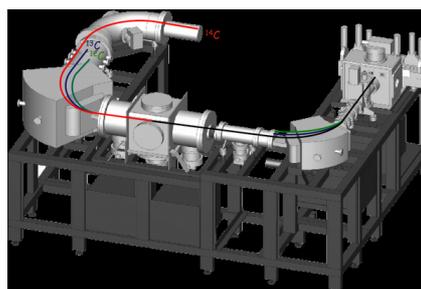


Annexe 5 : Spectre de masse de la friedeline

Spectre de masse de la friedeline



Annexe 6 : Micadas, nouvelle génération d'AMS pour la datation au ^{14}C développée à PSI/ETH Zürich.



www.ams.ethz.ch/research/ams/radiocarbon

Annexe 7 : Purification de la friedeline après CCM et HPLC

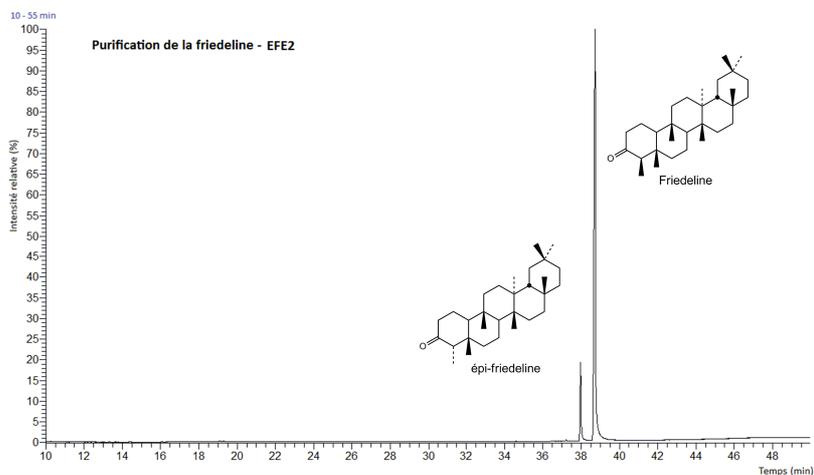
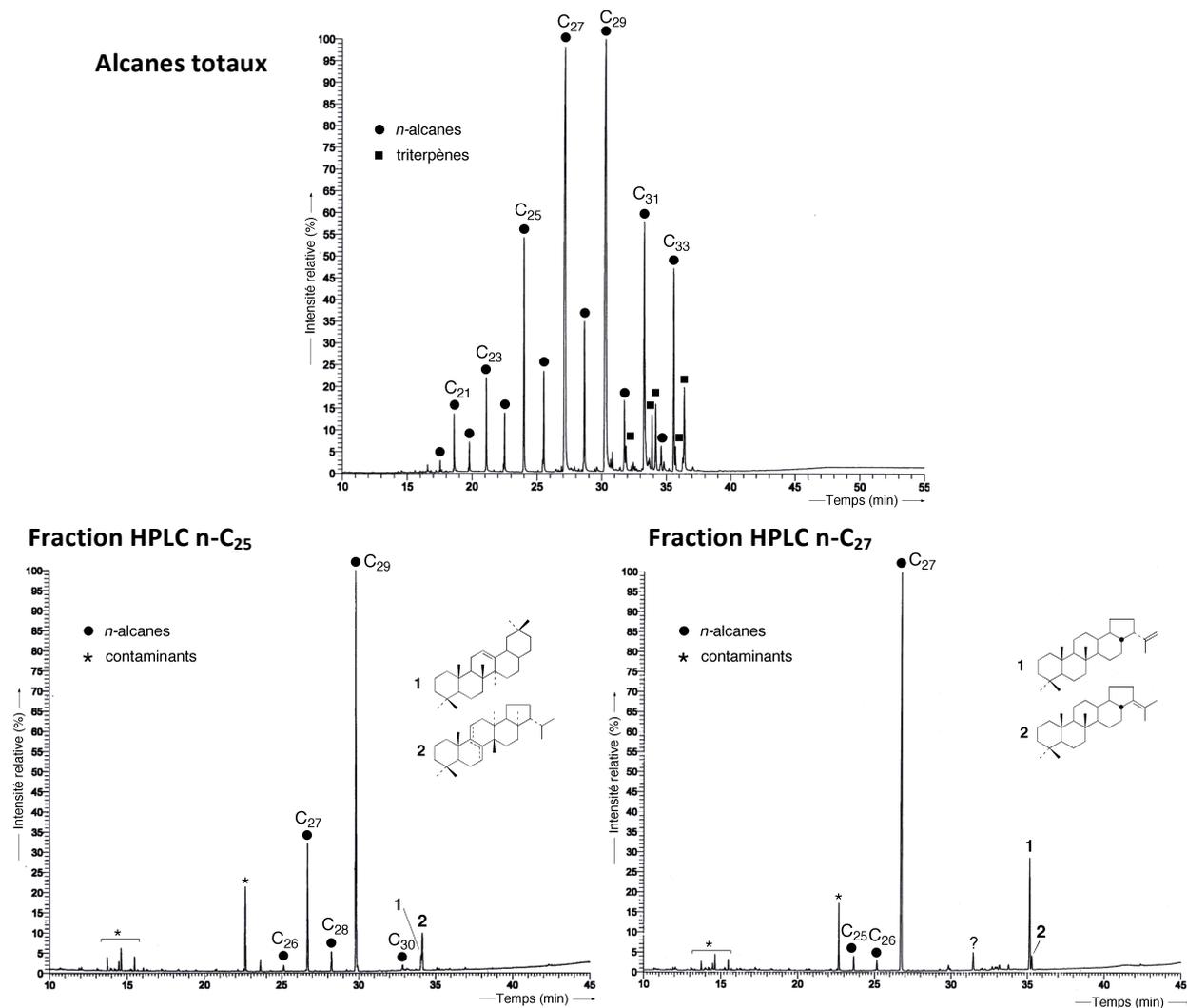


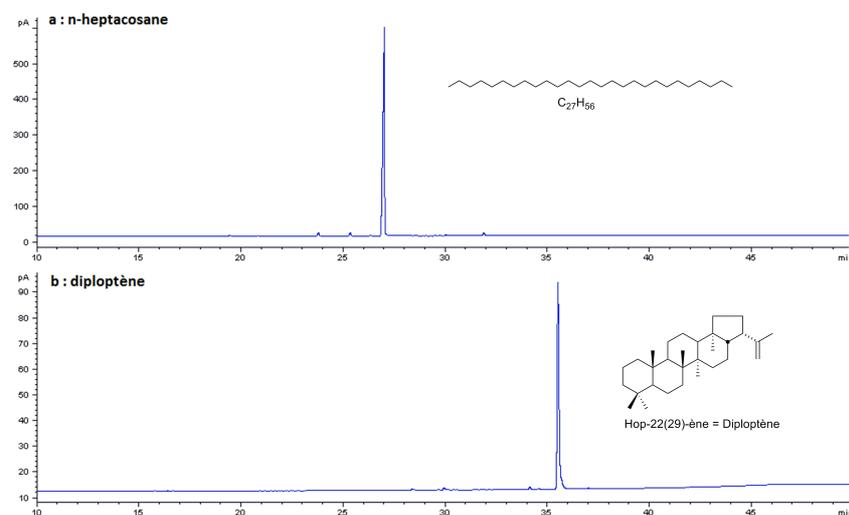
Figure 8. Chromatogramme GC-MS de la friedeline après purification

Conditions : Colonne : HP 5-MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm , épaisseur de film) - Gaz vecteur : Helium - inj.vol : 1 μL .
Méthode : 40°C à 200°C - 10°C/min puis 200°C à 320°C - 4°C/min puis 320°C pendant 40 min

Annexe 8 : Purification du n-heptacosane et du n-nonacosane après CC puis HPLC



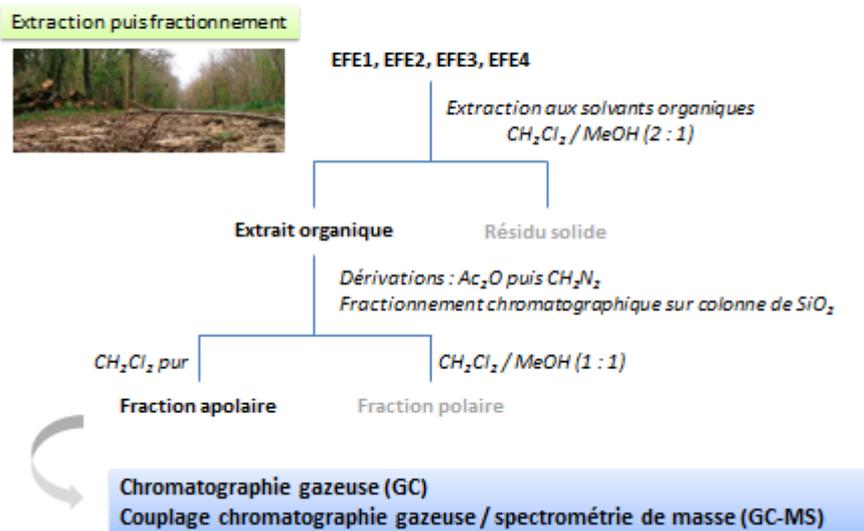
Annexe 9 : Chromatogrammes en phase gazeuse du n-heptacosane (a) et du diploptène (b) après purification sur AgNO₃-SiO₂.



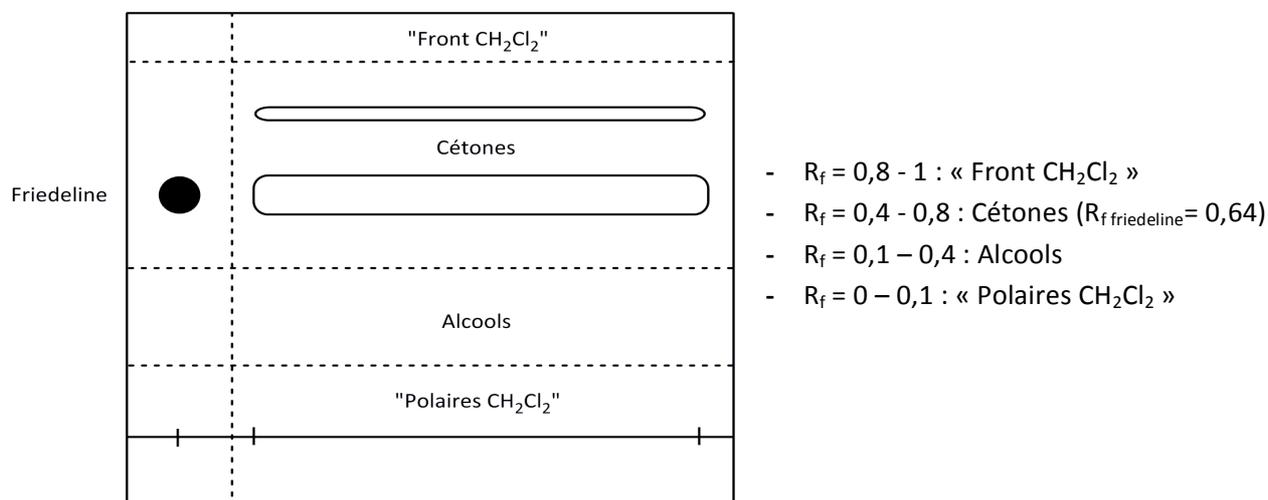
Conditions : Colonne : HP 5-MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm, épaisseur de film) -
 Gaz vecteur : Helium - inj.vol : 1µL.
 Méthode : 40°C à 200°C - 10°C/min puis 200°C à 320°C - 4°C/min puis 320°C pendant 40 min

Annexe 10 : Protocole analytique pour l'analyse des lipides des sols

ANALYSE MOLECULAIRE D'EXTRAITS LIPIDIQUES DE SOLS



Annexe 11 : CCM de la fraction contenant la friedeline



Tétraéthers de diglycérol dans les sols : Analyse, distributions, origines

Rapport de Stage ECPM

COUREL Blandine



Remerciements

Je souhaiterais avant tout remercier le Dr. Pierre ADAM, directeur du laboratoire de Biogéochimie Moléculaire pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Philippe SCHAEFFER pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long du projet. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir consacré de son temps et de son énergie et d'avoir su partager ses idées et ses connaissances en biogéochimie.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire pour leur bonne humeur, leur accueil, leur gentillesse et leurs conseils: Merci à Mme Estelle MOTSCH-MASTIO, Mme Gaby SCHMITT et Mr. Jean-Michel TRENDEL.

Je voudrais également remercier les doctorants du laboratoire, Raoul OSOWIECKI et Lucile BAILLY, pour m'avoir pleinement intégrée au sein de l'équipe et pour l'ambiance très sympathique qu'ils ont su créer tout au long de ce stage.

Enfin, j'adresse toute ma gratitude à Mr. BERNASCONI de l'Institut de Géologie de l'ETH (Zürich) et à Mme. HAJDAS du laboratoire de Physique de l'ETH pour avoir effectué les mesures de datation au ^{14}C par AMS. Sans leur collaboration, le projet n'aurait pu être réalisable. Je remercie aussi le Pr. Dominique SCHWARTZ et le Dr. Damien ERTLEN (équipe LIVE, Uds) pour la sélection et collecte des échantillons.

Sommaire

Remerciements

Sommaire

Abbréviations

I. Présentation du laboratoire de Biogéochimie Moléculaire	5
II. Introduction.....	6
III. Contexte général de l'étude	7
III.1. Les archées et les bactéries, sources de tétraéthers de diglycérol	7
III.2. Structure, distribution et synthèse des GDGTs	8
III.3. Etudes paléoenvironnementales.....	10
IV. Partie expérimentale.....	12
IV .1. Présentation et préparation des échantillons.....	12
IV.2. Analyses qualitatives de la distribution des GDGTs par LC-MS.....	13
IV.3. Analyses par chromatographie en phase gazeuse	14
IV.4. Datation au ¹⁴ C par AMS	15
V. Résultats et discussion	15
V.1. Profils moléculaires des GDGTs analysés par LC-MS et interprétations.....	15
V.2. Développement d'un protocole analytique pour la séparation des GDGTs et leur isolement..	17
V.3. Datation au ¹⁴ C par AMS des GDGTs	20
V.4. Mesures isotopiques du carbone et origines des GDGTs	21
VI. Conclusion	24
VII. Bibliographie	26

Annexes

Abbreviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
AMS	<i>Accelerated Mass Spectrometry</i> pour Spectrométrie de Masse par Accélérateur de particules
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
<i>br</i> -GDGT	Tétraéther de diglycérol ramifié ou « branché »
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CL	<i>Core lipids</i> : formés par hydrolyse des IPLs, ce sont des GDGTs ayant perdu leurs têtes polaires.
GC-IRMS	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse Isotopique
GC-MS	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
GDGT	Tétraéther de diglycérol
HI-LAH	Acide iodhydrique – hydrure de lithium et d'aluminium
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IE	Impact Electronique
<i>i</i> -GDGTs	Tétraéther de diglycérol isoprénoïde
IPL	<i>Intact Polar Lipids</i> : tétraéthers de diglycérol intacts, possédant leurs têtes polaires
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
MeOH	Méthanol
<i>m/z</i>	Rapport masse/charge (en MS)
PDB	PeeDee Belemnite
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
THF	Tétrahydrofurane

I. Présentation du laboratoire de Biogéochimie Moléculaire

Le laboratoire de Biogéochimie Moléculaire, situé sur le campus de Cronembourg, est une composante de l'Institut de Chimie de Strasbourg (UMR 7177 du CNRS). L'équipe de recherche est spécialisée dans l'étude moléculaire détaillée de mélanges organiques complexes provenant de sols, sédiments, pétroles et échantillons archéologiques. Le laboratoire travaille sur de nombreux projets nécessitant des connaissances en chimie bioorganique, analytique, écologie microbienne et synthèse organique.

Les thématiques abordées actuellement peuvent se résumer de la manière suivante :

- ✓ Élucidation des sources de la matière organique dans les milieux naturels actuels ou anciens et étude des marqueurs biologiques.
- ✓ Biogéochimie d'écosystèmes actuels : écologie microbienne, processus de transformation microbienne ou abiotique de molécules d'origine biologique.
- ✓ Analyse moléculaire de matière organique fossile et reconstitution d'environnements sédimentaires anciens.
- ✓ Archéologie moléculaire.
- ✓ Chimie de l'environnement.

Les projets de recherche reposent sur l'identification de produits naturels et leurs dérivés présents dans différents types d'environnements naturels contemporains ou anciens grâce à l'utilisation de matériel adapté tels que la chromatographie en phase gazeuse pouvant être couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ou à la spectrométrie de masse de rapport isotopique (GC-IRMS) ainsi que de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

Le projet de recherche de Master 2 faisant l'objet de ce rapport s'intègre parfaitement dans la thématique du laboratoire puisqu'il concerne l'étude de matière organique de sédiments (sols) récents et anciens et l'analyse moléculaire de certains de ses constituants lipidiques particuliers, les tétraéthers de diglycérol (GDGTs), afin d'obtenir des informations quant à l'origine de certaines sources organiques microbiennes contribuant à la matière organique dans les sols et les processus régissant son évolution au cours du temps. Plus globalement, cette étude des tétraéthers de diglycérol s'inscrit dans un objectif d'une meilleure compréhension et identification de ces traceurs moléculaires dont la présence est liée généralement aux conditions environnementales, à mettre notamment en relation avec les problématiques actuelles de réchauffement climatique.

II. Introduction

Au cours de ces dernières années, un accent important a été mis sur l'étude des sols dans le cadre d'études de biogéochimie organique. En effet, les sols, qui sont des systèmes complexes, comprennent une composante minérale prédominante, mais aussi de la matière organique provenant des organismes et microorganismes vivant actuellement dans et sur le sol, mais aussi des organismes ayant vécu au cours de l'histoire du sol et dont la matière organique a été partiellement préservée. Cette matière organique comprend entre autres des substances lipidiques dont l'étude permet, dans certains cas, de reconstituer l'histoire d'un sol et son évolution au cours du temps, en fonction des conditions environnementales (activités anthropiques, changement de végétation liés à des facteurs climatiques locaux ou globaux, etc.). A cet égard, il est important d'identifier des « traceurs moléculaires » susceptibles de fournir des informations concernant ces conditions environnementales et leur évolution, notamment en relation avec les problématiques actuelles de réchauffement climatique. Dans ce contexte, nous nous intéressons, au cours de ce stage, à l'étude d'une classe de lipides particuliers, les tétraéthers de diglycérol (ou GDGTs, pour « Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraethers »), qui sont des marqueurs moléculaires récemment mis en évidence dans pratiquement tous les types d'environnements, y compris dans les sols, et dont les distributions permettent de remonter à des paramètres tels que le paléopH, la paléotempérature de l'eau ou de l'air, ou encore la proportion de matière organique terrestre vs. matière organique aquatique (Schouten et al., 2013 et références citées).

Nous nous sommes intéressés au cours de cette étude aux deux classes de GDGTs identifiés à ce jour, les GDGTs isoprénoides (*i*-GDGTs) et les GDGTs ramifiés (*br*-GDGTs), présents dans les extraits lipidiques d'échantillons d'un profil de sol provenant du massif vosgien (prairie du Falimont, massif du Hohneck) et prélevés à différentes profondeurs. Nous avons tout d'abord étudié par LC-MS l'évolution des distributions des GDGTs (*i*-GDGT vs. *br*-GDGT) avec la profondeur, les distributions des GDGTs dans les sols (notamment les sols profonds) étant à ce jour encore peu ou mal documentées (i.e. Weijers et al., 2006; Yang et al., 2012). Afin de mieux cerner les facteurs environnementaux susceptibles de contrôler les distributions des *i*- et *br*-GDGTs dans les sols et de comprendre leur(s) origine(s), nous avons alors entrepris une étude isotopique de ces composés dans les différents horizons de sol associant des mesures de ^{14}C (datation) et de la composition en isotopes stables du carbone $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$).

Du fait de la complexité des extraits lipidiques issus de sols, il s'est avéré nécessaire, pour réaliser des mesures de datation au ^{14}C fiables de ces composés, de les isoler de manière spécifique afin d'éviter toute erreur de mesure liée à la présence de produits interférents. Le développement d'une méthode de séparation et purification des *i*- et *br*-GDGTs a constitué un volet important de ce stage. Cette méthode repose sur la combinaison de fractionnements des extraits organique obtenus à partir des sols par plusieurs étapes de chromatographie liquide sur colonne de silice, HPLC en phase directe et inverse, puis chromatographie sur couche mince (CCM). Il a ainsi été possible d'obtenir des fractions purifiées en quantités suffisantes (quelques microgrammes) pour les mesures de datation au ^{14}C qui ont été réalisées par la technique d'AMS (Accelerated Mass Spectrometry) à l'ETH à Zürich.

Un autre volet de ce stage a été consacré à l'étude de la composition isotopique des isotopes stables du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) des *i*- et *br*-GDGTs dans les différents horizons de sol. Ce type d'étude est

susceptible de fournir des informations sur les organismes qui ont biosynthétisé les *i*- et *br*-GDGTs en ce qui concerne, notamment, la source de carbone utilisée et les voies métaboliques mises en jeu. Comme les *i*- et *br*-GDGTs ne peuvent pas être directement analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de rapport isotopique (GC-iRMS), nous avons réalisé ces mesures de composition isotopique non pas sur les GDGTs intacts, mais sur les chaînes hydrocarbonées ramifiées ou isoprénoïdes constituant la partie centrale hydrophobe des *i*- et *br*-GDGTs. Ces chaînes ont pu être obtenues sous forme d'hydrocarbures saturés par coupure chimique sélective (HI-LiAlH₄) des liaisons éthers liant ces chaînes au glycérol, puis ont ensuite été analysées par GC-IRMS.

III. Contexte général de l'étude

III.1. Les archées et les bactéries, sources de tétraéthers de diglycérol

Dans les années 30, E. Chatton établit une classification du monde du Vivant basée sur une distinction entre les eucaryotes (présence d'un noyau cellulaire renfermant le matériel génétique) et les procaryotes (sans noyau). Ce n'est que bien plus tard, en 1987, que C. Woese propose une différenciation supplémentaire au sein des microorganismes procaryotes entre les eubactéries (bactéries) et les archéobactéries (ou archées) fondée sur des études phylogénétiques portant notamment sur l'ARN ribosomique 16S (16S rRNA). Ces dernières constituent donc une troisième famille dans la classification du Vivant - colonisant à la fois les milieux marins et terrestres. Ces archées sont, en effet, très abondantes dans les fonds marins, rivalisant même en abondance avec les bactéries puisqu'il a été évalué que les océans contiennent $1,3 \times 10^{28}$ cellules d'archées et $3,1 \times 10^{28}$ cellules bactériennes, de même que les archées appartenant aux Crenarchaéotes (Annexe 1) représenteraient 20% du picoplancton océanique (Karner et al., 2001).

Initialement, dans les années 1970-1980, les archées ont été décrites comme des êtres unicellulaires extrémophiles (voir dans l'article de revue de Schouten et al., 2013), c'est-à-dire ayant la capacité de vivre dans des milieux extrêmes dont l'acidité, la salinité ou bien la température sont particulièrement élevées. Ainsi par exemple, les archées hyperthermophiles du genre *Pyrodictum* et *Methanopyrus* se développent dans des conditions de température atteignant 113°C (Blöchl et al., 1997), et certaines crénarchaéotes acidophiles et généralement thermophiles croissent dans des milieux où le pH est parfois inférieur à 1. Bien plus tard, au début des années 2000, le développement de techniques de LC-MS en biogéochimie organique a permis d'approfondir et d'élargir la recherche de différentes classes de lipides sédimentaires, dont les lipides polaires, et ainsi de montrer la présence de marqueurs lipidiques spécifiques d'archées dans la plupart des milieux mésophiles (Schouten et al., 2000). C'est ainsi qu'ont pu être définis plusieurs sous-groupes au sein même de la famille des archées: les Euryarchaéotes, les Crenarchaéotes et les Thaumarchaéotes (Brochier-Armanet et al., 2008). Le groupe des Euryarchaéotes regroupe à la fois des archées méthanogènes, halophiles, thermoacidophiles, quelques hyperthermophiles, et des espèces (non cultivées) d'archées impliquées dans les processus d'oxydation anaérobies du méthane. Les Crenarchaéotes sont, quant à elles, des microorganismes hyperthermophiles, présents principalement dans les environnements marins et anaérobies, la présence de soufre étant dans certains cas nécessaire pour permettre leur croissance (Liu et al., 2012). Initialement classées parmi

les Crénarchaéotes, les archées mésophiles qui interviennent dans le processus de nitrification (oxydation de l'ammoniaque en nitrite) ont depuis 2008 été classées dans un nouveau groupe, les Thaumarchaéotes (Brochier-Armanet et al., 2008) et ces microorganismes seraient d'ailleurs les microorganismes les plus abondants dans l'écosystème terrestre impliqués dans le cycle de l'oxydation de l'ammoniaque (Leininger et al., 2006).

Quels que soient leur métabolisme et leur(s) niche(s) écologique(s), les archaea présentent la caractéristique commune de biosynthétiser des lipides membranaires uniques dans le monde du vivant, constitués d'une ou deux unités glycérol reliées entre elles par des chaînes hydrocarbonées en C₂₀ ou C₄₀ (éventuellement C₂₅) via des liaisons éthers. Il s'agit de diéthers de glycérol ou de tétraéthers de diglycérol isoprénoides (appelés *i*-GDGTs, pour « isoprenoid glycerol diethers glycerol tetraethers »), dont les structures et les modes de formation sont discutés dans le paragraphe III.2.

Les eubactéries (Annexe 1), quant à elles, remplissent de multiples rôles physiologiques (bactéries hétérotrophes, photosynthétiques, autotrophes, ...) et occupent la plupart des niches écologiques terrestres. Leurs structures membranaires sont différentes de celles des archées en ceci qu'elles sont, dans l'immense majorité des cas, constituées de (tri)glycérides, constitués de glycérol relié à des acides gras via des liaisons esters. Toutefois, très récemment ont été mis en évidence des lipides membranaires d'eubactéries possédant une structure très différente, constituée de deux unités glycérol reliées entre elles par des chaînes hydrocarbonées ramifiées en C₃₂, C₃₃ et C₃₄ via des liaisons éthers. Ces nouveaux constituants membranaires sont appelés *br*-GDGTs, pour « branched glycerol diethers glycerol tetraethers » (cf. paragraphe III.2.). Ces *br*-GDGTs ont été retrouvés de manière importante dans les sols et les tourbes, et leur présence semble être associée à l'existence de bactéries aérobies et anaérobies colonisant des micro-niches anoxiques. Par ailleurs, il convient de noter qu'à ce jour, les essais de culture bactérienne pour identifier les bactéries qui biosynthétisent les *br*-GDGTs ont pour la plupart échoué, et seule une culture d'une souche bactérienne acidophile présente dans les sols semble indiquer que cette dernière famille de bactéries est (parmi d'autres espèces, certainement) à l'origine des *br*-GDGTs (Sinninghe Damsté et al., 2011).

Ainsi donc, que ce soit les archées ou certaines bactéries, ces deux groupes de micro-organismes produisent des tétraéthers de diglycérol (*i*-GDGTs et *br*-GDGTs, respectivement). Ces GDGTs sont retrouvés de nos jours dans tous les types d'environnements tels que les sédiments marins et lacustres (Castañeda et al., 2011), les sols et les tourbières (Weijers et al., 2006). Ainsi, en milieu océanique, la teneur en *i*-GDGTs (par rapport aux autres lipides, quels que soient leurs origines) peut se situer aux alentours de 30% des lipides en milieu marin et peut même atteindre des valeurs bien supérieures à 50% (Lipp et al., 2008). En fait, bien que découverts que très récemment (une dizaine d'années) en milieux mésophiles, les *i*-GDGTs apparaissent aujourd'hui comme étant les lipides les plus abondants sur Terre (Karner et al., 2001).

III.2. Structure, distribution et synthèse des GDGTs

Chez les archées, les *i*-GDGTs forment la membrane cellulaire et un rôle similaire est supposé pour les *br*-GDGTs chez les bactéries qui en produisent (même si, dans ce dernier cas, cela ne demeure qu'hypothétique à ce jour). Ces lipides se composent de deux chaînes carbonées en C₄₀ (monocouche) ou en C₂₀ (bicouche), formant la partie hydrophobe située à l'intérieur de la membrane. Ces chaînes sont reliées par des fonctions éthers à deux entités glycérol, elles-mêmes

pouvant être attachées à des groupements polaires spécifiques (hexoses, dihexoses, phosphohexoses), l'ensemble formant alors des IPL ou « Intact Polar Lipids ». Le glycérol et la tête polaire constituent alors la partie hydrophile à l'extérieur de cette membrane (Figure 1). Ces molécules polaires sont toutefois très vite dégradées par hydrolyse naturelle dès la mort des microorganismes, d'où la présence exclusive, dans la plupart des cas, des GDGTs hydrolysés (c'est-à-dire sans têtes polaires, appelés « *core lipids* ») en milieu sédimentaire.

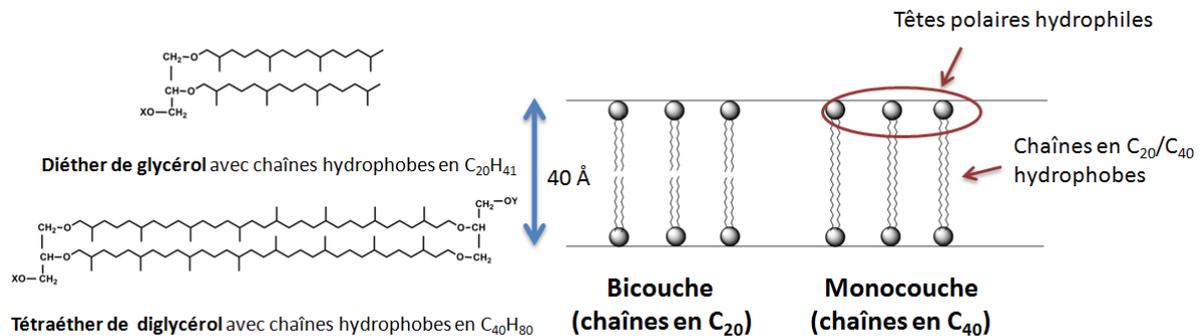


Figure 1: Représentation des membranes cellulaires de type mono et bicouche à partir de di- et tétraéthers de (di)glycérol.

Les *i*-GDGTs sont constitués de deux chaînes alkyles isoprénoïdes en C_{40} de type biphytane possédant un nombre variable de cyclopentyles (entre 0 et 8, annexe 2) et un cyclohexyle dans le cas particulier du crénarchéol (Sinninghe Damsté et al., 2002). Il a été observé que le GDGT acyclique **I** (Fig. 2) est abondamment présent au sein de chacune des catégories d'archées, à l'exception des archées halophiles où n'existent que des diéthers de glycérol. Les GDGTs **II-IV** (Fig.2) et GDGT-**4** (annexe 2), quant à eux, se retrouvent chez les archées thermophiles et sont également synthétisés par des archées vivant dans des milieux anaérobies qui participent à l'oxydation du méthane (Schouten et al., 2003 ; Blumenberg et al., 2004). Les GDGTs-**5 à 8** (annexe 2) sont couramment identifiés chez les archées hyperthermophiles (*Thermoplasma* et *Sulfolobus*). En effet, grâce à l'insertion de ces cycles formés par cyclisation interne, la membrane de la cellule se rigidifie et se densifie et devient alors plus stable thermiquement. Une corrélation est d'ailleurs observée entre augmentation du nombre de cycles et température croissante (Gliozzi et al., 1983) ou augmentation du pH (Weijers et al., 2007). Cette modification de la chaîne peut alors être perçue comme une réaction d'adaptation du microorganisme par rapport à un stress environnemental. Enfin, un cas particulier d'*i*-GDGTs est le crénarchéol (composé **V**, Fig. 2) qui serait principalement synthétisé par les Thaumarchaéotes intervenant dans l'oxydation de l'ammoniaque, ce qui en ferait un biomarqueur caractéristique de ce métabolisme particulier (Leininger et al., 2006).

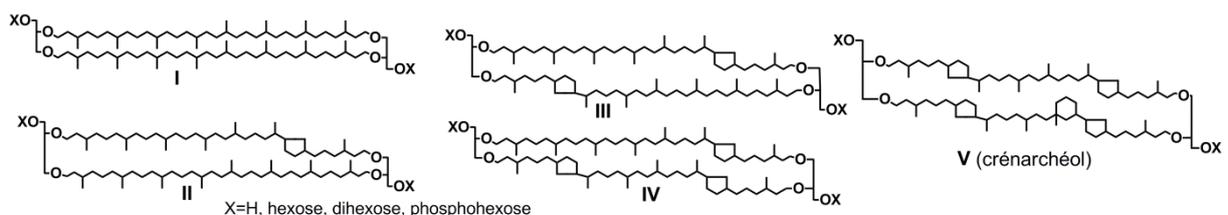


Figure 2: Structure des GDGTs isoprénoïdes analysés par LC-MS. Identification spécifique des GDGTs par leur ion $[M+H]^+$: **I**, m/z 1302.5 ; **II**, m/z 1300.5 ; **III**, m/z 1298.5 ; **IV**, m/z 1296.5 ; **V**, m/z 1292.5.

Dans le cas des GDGTs dits « ramifiés » ou « branchés », ceux-ci se composent de deux chaînes carbonées « de base » en C₃₀ qui présentent deux groupements méthyle aux positions 13 et 16 auxquels peuvent s'ajouter d'autres méthyles, en position 5 par exemple, ou des cyclopentyles. Ces GDGTs ramifiés (composés **VI** à **VIII**, Fig. 3) ont été identifiés par Sinninghe Damsté et al. (2000) au moyen de techniques de RMN après isolement des composés **VII** et **VIII** à partir d'extraits lipidiques de tourbe, tandis que les GDGTs ramifiés comprenant un ou deux cyclopentanes l'ont été ultérieurement par Weijers et al. (2006) par les mêmes techniques à partir du composé **IX**.

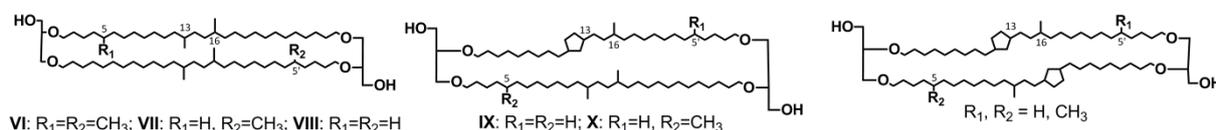


Figure 3: Structure des GDGTs ramifiés analysés par LC-MS. Identification spécifique des GDGTs par leur ion $[M+H]^+$: **VI**, m/z 1050 ; **VII**, m/z 1036 ; **VIII**, m/z 1022.

Qu'elles soient isoprénoïdes ou ramifiées, ces chaînes hydrocarbonées sont reliées à leurs extrémités à du glycérol grâce à une fonction éther. L'existence de cette liaison éther, plus stable que la liaison ester, est liée à une évolution de structure afin de permettre aux membranes cellulaires de résister à des conditions extrêmes (températures supérieures à 40° C, milieux très acides, ...). En effet, la très grande majorité des bactéries et tous les eucaryotes, se développant majoritairement dans des environnements « classiques » (dits mésophiles), présentent des membranes cellulaires principalement formées d'acides gras estérifiés à une molécule de glycérol.

III.3. Etudes paléoenvironnementales

De nombreuses études ont montré que la distribution des GDGTs peut fournir des informations d'ordre paléoclimatologique et paléoenvironnemental (permettant la reconstitution d'environnements anciens). Les plus anciennes preuves de la présence de GDGTs intacts sur Terre ont été établies dans des sédiments marins provenant de schistes bitumeux de Kahspir (plate-forme russe) datant de la période du Jurassique Supérieur (140 millions d'années ; Carrillo Hernandez, 2004) ainsi que dans les dépôts ODP 511 (160-115 Ma ; Jenkyns et al., 2012). Cependant, la préservation de tels composés implique l'existence de sédiments immatures, et les GDGTs ne seront de ce fait pas associés à de la matière organique mature, comme les pétroles par exemple. En effet, il a été observé qu'un traitement thermique entre 240 °C et 300 °C reproduisant artificiellement le phénomène de maturation avancée, entraîne la dégradation et la perte des GDGTs initialement contenus dans les sédiments (Schouten et al., 2004). De même, comme tous les composés sédimentaires, les GDGTs peuvent être exposés à l'oxygène de l'air lors du processus (parfois long) de sédimentation, ce qui a pour conséquence l'oxydation d'un bon nombre de composés (Huguet et al., 2008). Ainsi, un certain nombre de produits d'altération (Figure 4) des GDGTs ont été identifiés dans des sédiments anciens ou des pétroles. Il s'agit, par exemple, de chaînes isoprénoïdes de biphytane en C₄₀ (Chappe et al., 1982) ou de ces chaînes de biphytanes α,ω -diacides et α,ω -diols (Schouten et al., 2013), ou encore, de leur produits de dégradation intermédiaires, comme le glycerol dialkanol triol (Knappy et al., 2012).

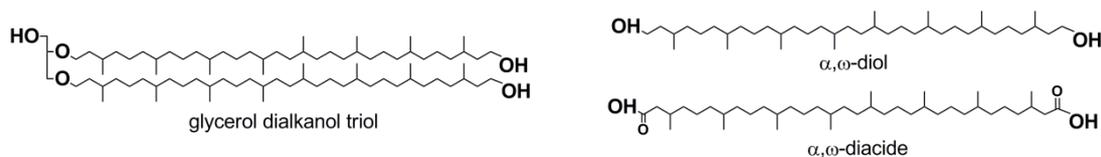


Figure 4: produits résultant de l'oxydation des GDGTs dans des sédiments matures

Dans les cas où les GDGTs sont identifiés dans des sédiments et des sols, ces composés apportent des informations nécessaires pour mieux comprendre et caractériser ceux-ci. Les GDGTs sont alors considérés comme des « traceurs moléculaires » de certaines conditions environnementales et de leur évolution. Leur analyse s'inscrit dans des études paléo-environnementales qui sont ensuite à mettre en relation notamment avec les problématiques actuelles du réchauffement climatique. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le nombre de cycles au niveau des chaînes biphytanyles des *i*-GDGTs varie en fonction des conditions environnementales, ce qui a conduit certains auteurs à proposer des équations reliant distribution des *i*-GDGTs et température de la colonne d'eau où vivent ces archées (Schouten et al., 2002). Plus tard, de mêmes types de relations ont été établies entre distributions des *br*-GDGTs et conditions environnementales, permettant de relier ces dernières avec le pH des sols, la température moyenne de l'air, etc (Weijers et al., 2007). Par ailleurs, la proportion des *i*-GDGTs par rapport aux *br*-GDGTs permet d'évaluer l'apport de matière organique issue du sol vs. celle issue de milieux marins (Hopmans et al. 2004). Les indices les plus couramment utilisés pour ces mesures sont les indices BIT, MBT/CBT et TEX₈₆, explicités en annexe 3.

Ces traceurs moléculaires présentent donc un intérêt majeur comme en témoigne le nombre d'études croissant depuis le développement, dans les années 2000, de techniques de LC-MS en biogéochimie. Alors que de nombreuses publications portent sur la distribution des GDGTs en milieu marin, les connaissances permettant d'expliquer la coexistence des *br*-GDGTs et *i*-GDGTs dans les sols sont encore insuffisantes. Il s'agit, dans le cadre de ce projet de recherche de Master 2, de mieux cerner les paramètres contrôlant la distribution des GDGTs dans les sols et de comprendre leur origine et cela grâce à une étude la plus complète possible associant notamment mesures isotopiques du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) et détermination des âges absolus des GDGTs par ^{14}C . Du fait de la complexité des extraits lipidiques issus de sols, ce travail de stage a nécessité la mise au point de méthodologies analytiques poussées afin d'isoler et de purifier de manière spécifique nos composés d'intérêt. Cette étape de mise au point s'est avérée particulièrement délicate du fait de la manipulation de très faibles quantités d'échantillons. Des travaux du même ordre, très consommateurs en temps, n'ont fait, à notre connaissance, l'objet que d'une seule publication à ce jour (Birkholz et al., 2013).

IV. Partie expérimentale

Précautions particulières :

Afin de s'affranchir de toute contamination organique dans nos échantillons (squalène, cholestérol, phtalates), un certain nombre de précautions particulières doivent être prises. Ainsi, les solvants utilisés sont redistillés, la silice, le coton, le sable et les pipettes Pasteur sont lavées pendant 48 heures au dichlorométhane dans un soxhlet. Quant à la verrerie, elle est lavée avec soin au détergent, rincée abondamment à l'eau, séchée à l'acétone puis rincée au dichlorométhane distillé.

IV .1. Présentation et préparation des échantillons

Dans le cadre de cette étude, quatre échantillons issus d'un profil de sol ont été prélevés dans le massif vosgien (prairie du Falimont, massif du Hohneck). Ces quatre prélèvements sédimentaires ont été effectués à des profondeurs différentes : un échantillon de surface (0-10 cm) et trois échantillons plus profonds (20-30 cm, 40-50 cm, 50-60 cm). Les données générales concernant les échantillons sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: données sur les rendements d'extraction et d'isolement des GDGTs

Échantillon	COT ¹ (%)	EOT ² (% de sédiment sec)	<i>i</i> -GDGTs		<i>br</i> -GDGTs	
			m (µg)	%	m (µg)	%
0-10 cm	23,5	2,45	/	/	200	0,017
20-30 cm	5,8	0,6	/	/	/	/
40-50 cm	2,2	0,2	200	0,022	100	0,011
50-60 cm	0,4	0,06	/	/	/	/

¹Carbone Organique Total ; ²Extrait Organique Total (également appelé extrait lipidique)

IV.1.1. Extraction – Préparation de l'extrait lipidique

500 g d'un sol de surface (1 kg dans le cas des sols plus profonds) sont prélevés et tamisés (tamis de maille 0,45 mm). L'extrait organique total est obtenu par extraction avec un mélange MeOH/CH₂Cl₂ (1 :1, 2 x 700 mL). La première extraction est effectuée à l'aide d'ultrasons (15 min) et la deuxième par agitation manuelle. Le mélange (sol+solvant) est laissé décanter puis la phase organique est récupérée par filtration sur célite. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif, conduisant à l'obtention de l'extrait lipidique. Une difficulté majeure de cette étude résulte du fait que, excepté le sol de surface, les sols analysés sont pauvres en matière organique extractible (Tableau 1), elle-même contenant des teneurs très faibles en GDGTs. Pour l'analyse qualitative des GDGTs par couplage LC-MS, une aliquote de l'extrait organique (à sec) est extraite avec un mélange *n*-hexane-isopropanol 99:1 (cf. Hopmans et al., 2004) en présence d'ultra-sons. Le surnageant est alors prélevé, filtré sur une membrane PTFE (0.45 µm, diamètre 30 mm) puis analysé par LC-MS.

IV.1.2. Hydrolyse acide (HCl/MeOH) des extraits lipidiques

Un échantillon d'extrait lipidique (environ 100 mg) est prélevé de l'extrait organique total et placé dans un tube à essai en Pyrex avec un bouchon à vis et un joint PTFE. Environ 5 mL d'une

solution HCl/MeOH à 1,33 N sont ajoutés à l'échantillon et l'ensemble est placé pendant 1 heure dans un four à 120° C. Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé sous pression réduite, conduisant à l'obtention de l'extrait lipidique hydrolysé. Les GDGTs contenus dans celui-ci sont ensuite extraits selon la méthode décrite par Hopmans et al. (2000). Ainsi, l'extrait (à sec) est mis en présence d'un mélange *n*-hexane-isopropanol (99:1), et placé sous ultrasons (15 minutes). Après décantation, le surnageant est alors prélevé, puis analysé par LC-MS.

IV.1.3. Purification et isolement chromatographique des GDGTs

Cette partie, qui a fait l'objet de l'essentiel de mon travail analytique au cours de ce stage, sera développée dans la partie « résultats et discussion » (cf. paragraphe V.2.).

IV.1.4. Coupure des liaisons éther par l'acide iodhydrique et réduction des iodures formés

Coupure des liaisons éther par HI

Les chaînes hydrocarbonées isoprénoïdes ou ramifiées formant la partie centrale hydrophobe des lipides de GDGTs sont obtenues par coupure des deux molécules de glycérol par réaction avec de l'acide iodhydrique (HI ; Schouten et al., 1998). L'échantillon solubilisé dans du CH₂Cl₂ et contenant les GDGTs est transféré dans un tube à essai en Pyrex à bouchon à vis et joint PTFE. Après élimination du solvant sous un flux d'azote, 2 mL d'acide iodhydrique à 57% dans l'eau sont ajoutés. L'ensemble est fermé, puis est placé dans un four à 120 °C pendant 3 heures. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans de l'eau distillée puis est extrait au cyclohexane dans une ampoule à décanter.

Réduction des iodures par LiAlH₄

Après élimination du cyclohexane, les iodures d'alkyles obtenus sont réduits par addition d'hydrure de lithium et d'aluminium (LiAlH₄) dissous dans du THF anhydre. Le mélange est laissé à température ambiante sous agitation magnétique (1 h). L'excès d'hydrure est alors détruit en versant le mélange réactionnel goutte à goutte dans de l'eau distillée. Les produits sont ensuite extraits avec du cyclohexane. Du fait de la présence de sels d'aluminium résiduels dans l'échantillon, une filtration sur célite est souvent nécessaire pour éliminer ceux-ci. Par la suite, les alcanes formés sont séparés par chromatographie liquide sur une petite colonne de silice en éluant avec du cyclohexane.

Dans le cas particulier de l'échantillon de surface Hohneck 1, la présence de nombreux dérivés stéroïdiques insaturés de type stérènes a été observée après traitement avec HI-LAH. Ces composés interférant avec les hydrocarbures saturés d'intérêt issus des *br*-GDGTs, une étape supplémentaire de purification sur colonne de silice imprégnée de nitrate d'argent (10%) a été employée. L'échantillon est déposé en tête de colonne dans du *n*-hexane, qui est également le solvant d'éluion. Les *br*-GDGTs sont ainsi récupérés au front, la plupart des dérivés insaturés étant retenus sur la phase stationnaire.

IV.2. Analyses qualitatives de la distribution des GDGTs par LC-MS

Après solubilisation dans un mélange *n*-hexane/isopropanol (99 :1), chacun des extraits est analysé par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse au moyen d'un appareil HP série 1100 équipé d'un injecteur automatique et du logiciel Chemstation pour l'exploitation des

analyses. La méthode analytique utilisée est inspirée de celle mise au point par Hopmans et al. (2000). Les GDGTs sont séparés avec un gradient d'éluion sur une colonne Prevail Cyano (150 x 2,1 mm, 3 μ , Grace Davison Discovery Sciences) maintenue à 30° C. Selon les échantillons, le volume d'injection varie entre 10 et 20 μ L. Les différents composés sont élués avec un débit de 0.8mL/min en utilisant un gradient linéaire binaire allant de 0,5% de A à 1,3% de A en 20 min (A : isopropanol, B : *n*-hexane) suivi d'un gradient à 5% de A en 5 minutes. Un palier de 5 min à 5% de A (rinçage de la colonne) est alors effectué puis un retour à 0.5% de A est effectué en 5 minutes.

La détection de chacun des composés se fait au moyen d'un spectromètre de masse Bruker Esquire 3000⁺ équipé d'une trappe ionique en mode APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique) pour générer des ions positifs [M+H⁺]. Les conditions de l'analyseur sont les suivantes : pression du nébuliseur 50 psi, température de vaporisation 350 °C, débit du gaz (N₂) 5 L/min, température du gaz 300 °C, tension du capillaire -2 kV, corona 4 μ a, gamme de masse *m/z* 200-1400. Les spectres de masse obtenus sont systématiquement corrigés par soustraction du bruit de fond. La détection spécifique des tétraéthers de diglycérol se fait en sélectionnant un courant d'ion extrait (EIC) avec les masses *m/z* 1302,5 ; 1300,5 ; 1298,5 ; 1296,5 ; 1292,5 pour les *i*-GDGTs et *m/z* 1050 ; 1036 ; 1022 pour les *br*-GDGTs.

IV.3. Analyses par chromatographie en phase gazeuse

IV.3.1. Analyse des hydrocarbures libérés par coupure des liaisons éthers par GC-MS

Les hydrocarbures résultant de la coupure des liaisons éthers (cf. paragraphe IV.1.4) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse au moyen d'un GC Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Thermo Fisher TSQ Quantum équipé d'une colonne HP5 MS, 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Les analyses sont effectuées en suivant le programme de températures suivant : deux gradients de températures successifs de 70 °C à 200 °C (10 °C/min) puis de 200 °C à 300 °C (4 °C/min) suivi d'un palier à 300 °C pendant 40 minutes. L'échantillon est dissous dans de l'acétate d'éthyle et le volume d'injection est de 0,8 μ L. Le spectromètre de masse fonctionne en mode full-scan balayant ainsi toutes les masses de 50 à 700 *m/z*. Le gaz vecteur est de l'hélium, utilisé avec un débit constant fixé à 1,1 mL/min. Les données sont exploitées à l'aide du logiciel Excalibur.

IV.3.2. Mesure de $\delta^{13}C$ par GC-IRMS

Les mesures de rapport isotopique du carbone sont effectuées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse isotopique (GC-IRMS) au moyen d'un GC Trace GC Ultra (Thermo Scientific) équipé d'un injecteur « on-column » et couplé à un système Delta V Plus (Thermo Scientific) avec à l'interface des deux appareils un système GC Isolink constitué d'un four de combustion (à 1000 °C dans le cas du carbone) et d'un système de dilution ConFlo IV. Les injections sont effectuées à l'aide d'un passeur automatique Triplus (ThermoScientific). L'exploitation des résultats se fait grâce au logiciel Isodat 3.0. Les composés individuels sont isolés grâce à une colonne Agilent HP 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) selon un programme de température correspondant à un gradient linéaire de 80 °C à 310 °C à 4 °C/min suivi d'un palier à 310 °C pendant 20 minutes.

Chaque échantillon est injecté 3 fois. Des précisions concernant le principe de la mesure des isotopes stables du carbone peuvent être trouvées en annexe 4.

IV.4. Datation au ^{14}C par AMS

Les analyses par AMS (*Accelerated Mass Spectrometry*, cf. IV.3) sont effectuées par le laboratoire de Physique de l'ETH (Swiss Federal Institute of Technology Zurich), selon les mêmes conditions opératoires que celles reportées pour les analyses décrites par Birkholz et al. (2013). Les mesures de ^{14}C ont été effectuées avec le système MICADAS (« Miniaturized Radiocarbon Dating System ») et sont données sous forme de fraction moderne ($F^{14}\text{C}$) et âge en ^{14}C BP (pour « Before Present »). Pour ce qui est de la calibration, des échantillons contenant de l'acide oxalique ancien et moderne sont pris pour référence.

V. Résultats et discussion

V.1. Profils moléculaires des GDGTs analysés par LC-MS et interprétations

Chacun des extraits organiques totaux a été analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse dans le but d'établir les profils moléculaires des tétraéthers de diglycérol isoprénoides et ramifiés. Ces profils (Figure 5) présentent des différences importantes selon la profondeur de l'échantillon. Seuls les *br*-GDGTs– m/z 1050 (composé **VI**), 1036 (**VII**) et 1022 (**VIII**) – sont détectés dans l'échantillon de surface et ils sont également nettement majoritaires par rapport aux *i*-GDGTs dans l'échantillon prélevé à 20-30 cm. Toutefois, l'abondance relative en *i*-GDGTs augmente significativement avec la profondeur (40-50 cm et 50-60 cm) avec la détection des ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1302 (**I**), 1300 (**II**), 1298 (**III**), 1296 (**IV**) et 1292 (**V**). Les dérivés cycliques de *br*-GDGTs, quant à eux, n'ont été observés dans aucun des échantillons. Cette première série d'analyses a ainsi permis de mettre en évidence que les *br*-GDGTs sont prédominants dans les sols de surface alors que la proportion en *i*-GDGTs augmente avec la profondeur (Figure 5).

Afin de mieux comprendre l'origine des variations des distributions de GDGTs en fonction de la profondeur, plusieurs hypothèses ont été émises. Tout d'abord, l'absence d'*i*-GDGTs en surface pourrait être due à l'existence d'une population active d'archées produisant essentiellement des IPLs (les IPLs n'étant pas analysés avec le protocole analytique utilisé ; cf. paragraphe IV.2). Afin de vérifier cette hypothèse, le sédiment superficiel a été hydrolysé avec un mélange HCl/MeOH (1,33N) dans le but d'hydrolyser les têtes polaires éventuellement présentes et de libérer d'éventuels *i*-GDGTs. Les distributions de GDGTs observées avant et après hydrolyse se sont toutefois montrées sensiblement identiques (absence d'*i*-GDGTs), indiquant de ce fait que la présence d'une population vivante d'archées en surface peut être exclue. En suivant le même protocole et le même raisonnement que précédemment, une hydrolyse du sédiment profond a été effectuée afin de montrer ou non la présence d'une population vivante d'archées colonisant cette fois-ci les profondeurs du sol. Cependant, cette hydrolyse n'a pas non plus libéré d'*i*-GDGTs supplémentaires de manière importante, ce qui semble indiquer que les *i*-GDGTs présents en profondeur proviennent plutôt d'une population ancienne d'archées (*i*-GDGTs fossiles), hypothèse à valider par une datation au ^{14}C par AMS qui nécessite auparavant d'isoler nos composés par une succession d'étapes de séparation et purification.

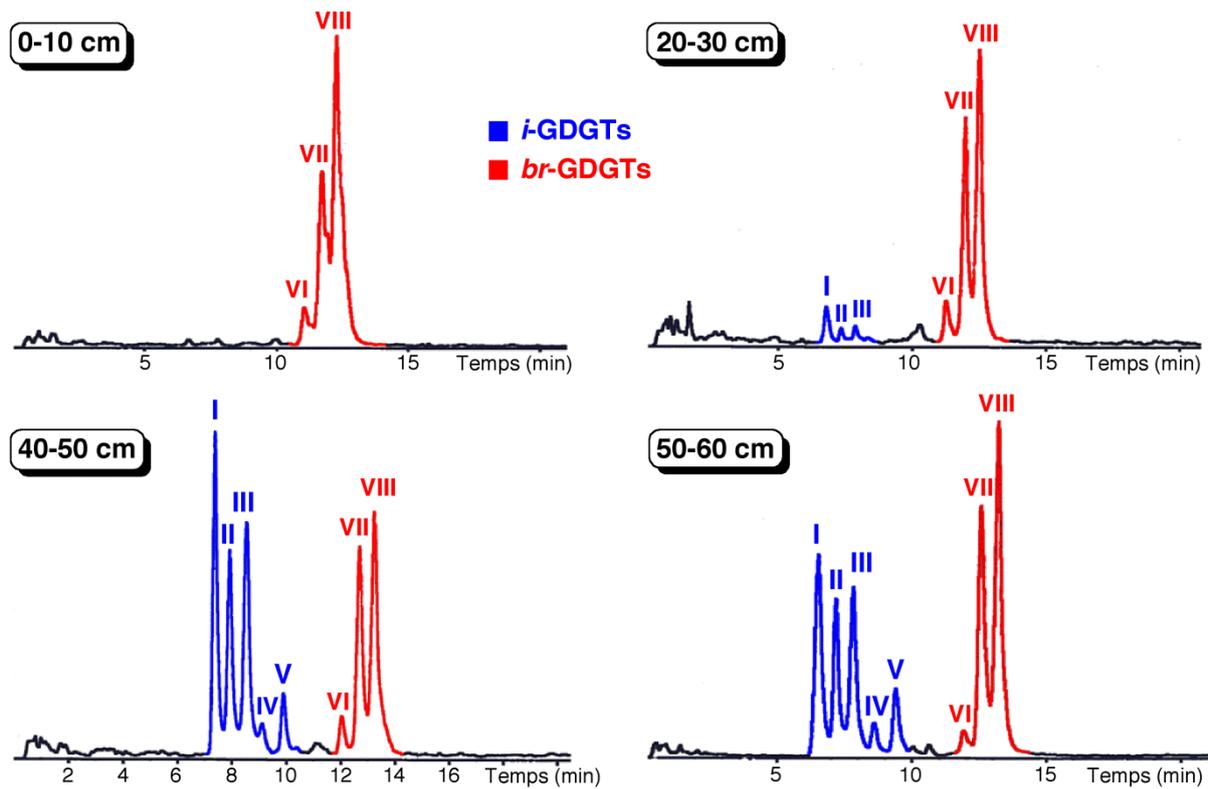


Figure 5: distribution des GDGTs obtenus pour un profil de sol. Échantillon de surface à 0-10 cm (a), 20-30 cm (b), 40-50 cm (c) 50-60 cm (d). Chromatogrammes obtenus par analyse LC-MS et identification des molécules par leur ion moléculaire avec une source APCI (I, m/z 1302.5 ; II, m/z 1300.5 ; III, m/z 1298.5 ; IV, m/z 1296.5 ; V, m/z 1292.5 ; VI, m/z 1050 ; VII, m/z 1036 ; VIII, m/z 1022). Conditions : LC-MS, colonne Prevail Cyano 150 x 2,1 mm, 3 μ . Gradient de solvant : 0,5-1,3% d'isopropanol dans hexane (0,04% /min), 1,3-5% (0,74% /min), 5% (5 min), 5-0,5% (0,9% /min), 0,5% (5 min).

Par ailleurs, d'après la littérature, les distributions des GDGTs dans les différents types de sols et de sédiments, permettent de remonter à des paramètres environnementaux, comme le pH ou la température moyenne annuelle de l'air (cf. Schouten et al., 2013 et références citées). Alors que les *i*-GDGTs prédominent généralement dans les milieux aquatiques, les *br*-GDGTs sont majoritairement présents dans les sols, aboutissant alors à la définition de l'indice BIT permettant de déterminer l'origine de la matière organique marine vs. terrestre (voir annexe 3). Sur la base de critères moléculaires du même type, Yang et al. (2012) proposent une relation permettant de corréliser l'abondance relative des *i*-GDGTs et *br*-GDGTs avec le pH du milieu. En effet, ces auteurs ont observé une prédominance des *br*-GDGTs dans des sols acides (pH < 5) tandis que pour des sols basiques (pH > 8) les *i*-GDGTs deviennent majoritaires. À partir de ces résultats, un nouvel indice, RAI (« *Relative Abundance of Isoprenoid GDGTs to branched GDGTs* » ; Tableau 2), a été établi dans le but d'obtenir une valeur du pH du sol. Dans le cadre de notre étude, les sols étudiés ont la caractéristique d'être acides (pH 3,5 – 4,3 ; Tableau 2), acidité causée par l'érosion des roches granitiques constituant le massif du Hohneck (Falimont). Les valeurs de pH pour chacune des profondeurs ont alors été calculées au moyen de l'équation proposée par Yang et al. (2012) et sont reportées sur le Tableau 2. Il ressort que la valeur ainsi calculée dans le cas de l'échantillon de surface est assez proche de celle mesurée sur le terrain. En revanche, pour les trois autres échantillons, dans lesquels sont présents à la fois des *i*-GDGTs et des *br*-GDGTs, ces valeurs calculées sont « aberrantes », conduisant à l'obtention de valeurs de pH caractéristiques de sols basiques (milieux calcaires). Ces mauvais résultats sont liés à la co-existence d'*i*-GDGTs (en proportions variables) et de *br*-GDGTs dans nos

échantillons de sols acides en contradiction avec les observations de Yang et al., (2012). Il apparaît donc, d'après nos résultats, que des études supplémentaires sont clairement nécessaires afin de mieux comprendre l'influence des paramètres environnementaux sur la distribution des GDGTs.

Tableau 2: pH calculé et pH mesuré des sols du FALIMONT pour différentes profondeurs.

FALIMONT	0-10 cm	20-30 cm	40-50 cm	50-60 cm
Σ aire (<i>i</i> -GDGTs)	1265738	721687	21669237	65634028
Σ aire (<i>br</i> -GDGTs)	141116812	9333465	17849713	75194859
RAI ¹	2,0472	1,1117	- 0,0842	0,0591
pH calculé ²	3,77	6,23	9,38	9,00
pH mesuré	3,59	3,5	4,3	4,2

¹RAI = $-\log (\Sigma_{\text{aire}}(i\text{-GDGTs}) / \Sigma_{\text{aire}}(br\text{-GDGTs}))$ et RAI = $-0,38 \times \text{pH} + 3,48$; ²pH calculé d'après l'équation de Yang et al., (2012).

V.2. Développement d'un protocole analytique pour la séparation des GDGTs et leur isolement

Une grande partie de ce stage a consisté à mettre au point une méthode de séparation et d'isolement des GDGTs en combinant plusieurs techniques chromatographiques, ceci afin d'obtenir des fractions contenant les *i*-GDGTs et *br*-GDGTs aussi purs que possible. Cette optimisation s'est faite sur des quantités modérées d'extrait organique de sol (autour du gramme) afin de pouvoir généraliser ce protocole à d'autres types d'échantillons, pour lesquels des quantités limitées sont disponibles.

V.2.1. Obtention de fractions enrichies en GDGTs par chromatographie sur colonne de silice

Environ 1 g d'extrait organique est dissous dans du CH₂Cl₂ puis adsorbé sur gel de silice. L'extrait adsorbé est alors déposé en tête d'une colonne de silice (diamètre de colonne : 3 cm, hauteur de silice : 10,5 cm). Une première fraction (F1) est récupérée en éluant avec deux volumes morts d'un mélange cyclohexane / AcOEt (3 :1) afin de collecter les composés les moins polaires de notre échantillon ainsi que les *i*-GDGTs. Une deuxième fraction (F2), contenant, entre autres, les *br*-GDGTs, est ensuite collectée par élution à l'aide de deux volumes mort d'un mélange cyclohexane / AcOEt (6 : 4). Enfin, les composés les plus polaires sont élués avec un volume et demi d'un mélange CH₂Cl₂ / MeOH (5 : 5).

Afin d'augmenter la pureté de nos composés, les fractions F1 et F2 sont séparées plus finement sur une deuxième colonne de silice (diamètre de colonne : 1,5 cm, hauteur de silice : 7,5 cm). La fraction est solubilisée dans un minimum de solvant (qui correspond au même mélange que celui utilisé comme phase mobile initiale, à savoir un mélange cyclohexane/AcOEt, 4 :1). Cinq fractions, chacune représentant l'équivalent d'un volume mort de la colonne, sont collectées en éluant avec un mélange cyclohexane/AcOEt (4 :1). Ainsi, après dépôt de la fraction F1, les *i*-GDGTs sont élués dans la fraction récupérée au deuxième volume mort, alors qu'après dépôt de la fraction F2, les *br*-GDGTs, plus polaires, migrent généralement à l'équivalent du quatrième volume mort (traces éventuelles dans le 3^{ème} et/ou le 5^{ème} volume mort).

V.2.2. Purification des fractions enrichies en GDGTs par LC-MS

Les fractions enrichies en GDGTs isolées par chromatographie liquide (cf. paragraphe précédent) sont ensuite purifiées plus spécifiquement par deux étapes successives de séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC), une première étape impliquant une purification avec une phase directe, puis une seconde avec une phase inverse de type C-18. Alors que le protocole analytique en phase directe est assez bien décrit dans la littérature (Hopmans et al., 2000), ce n'est pas le cas de la séparation/purification des GDGTs en phase inverse, qui n'a fait l'objet que d'études très limitées (cf. Birkholz et al. 2013). Il s'est donc agi, dans le cadre de notre projet de master, d'optimiser les méthodes de purification des GDGTs en combinant différentes étapes de purification.

Protocole analytique de purification des GDGTs en phase directe

La première purification a été réalisée avec une colonne Prevail Cyano (150 x 2.1 mm, 3 μ m, Grace, Alltech) dans les mêmes conditions d'élution que lors de l'analyse des GDGTs (cf. IV.2.). Afin de collecter de manière précise les GDGTs ciblés, une technique de collecte a été mise au point avec un système de dérivation en sortie de colonne permettant la collecte d'environ 95% des produits d'intérêt, les 5% restants étant introduits dans la source du spectromètre de masse (APCI) pour détection. Les *i*-GDGTs sont collectés ensemble (massif élué entre 6 et 10 minutes, avec visualisation en temps réel par spectrométrie de masse). De la même façon, les *br*-GDGTs sont collectés entre 11,5 et 15 minutes environ.

Protocole analytique de purification des GDGTs en phase inverse

La deuxième étape séparation par HPLC a dû être optimisée, une seule publication y faisant mention (Birkholz et al., 2013). Pour cette phase d'optimisation de méthode, des échantillons de tourbe et de sols, contenant respectivement des *br*-GDGTs et *i*-GDGTs, ont servi de références. Trois types de colonnes en phase inverse ont été testées : Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 μ m, Agilent), Zorbax Eclipse C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m, Agilent) et VYDAC C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Outre la nature des phases stationnaires, deux types de phases mobiles ont été testées : acétone/méthanol et acétate d'éthyle/méthanol en différentes proportions, à la fois en mode isocratique ou bien au moyen d'un gradient. À terme, ces protocoles d'isolement, l'un propre aux *i*-GDGTs et l'autre spécifique aux *br*-GDGTs, pourront être généralisés à l'analyse et à l'isolement des GDGTs dans tous les types d'environnements.

Purification des *i*-GDGTs

Dans le cas des GDGTs isoprénoïdes, de nombreux essais sur différentes colonnes et avec différents mélanges d'élution (Figure 6) ont ainsi été réalisés. Il ressort de ces essais que les meilleurs résultats sont obtenus avec une colonne VYDAC au moyen d'un gradient linéaire AcOEt/MeOH de 40% à 50% en AcOEt en 20 minutes – soit 0,5%/min – suivi d'un retour à 40% en 5 minutes. Ces conditions opératoires nous permettent alors une bonne séparation des *i*-GDGTs à des temps de rétention convenables (entre 10 et 20 minutes) pour ce qui est de la collecte.

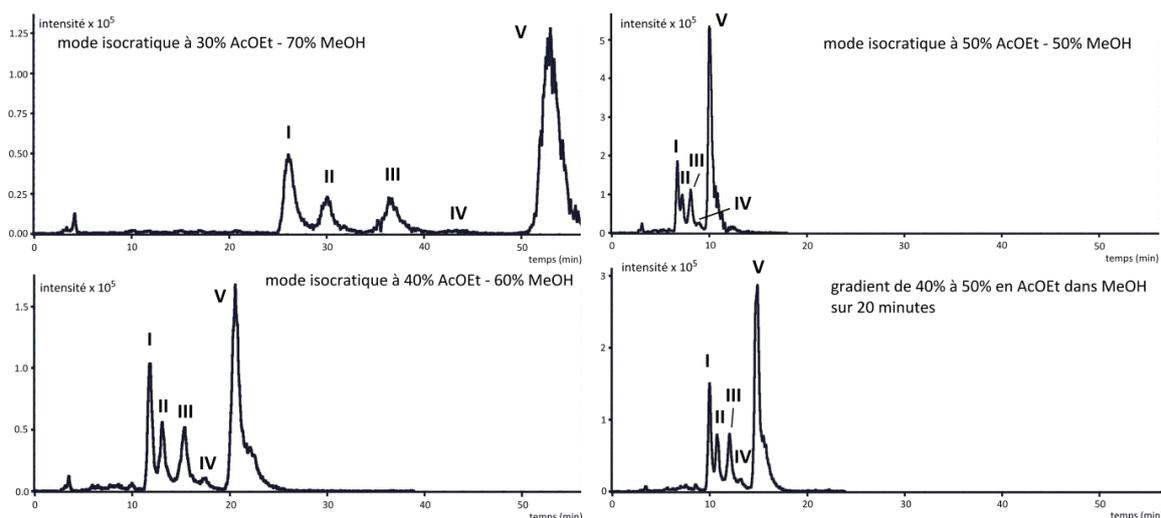


Figure 6 : Chromatogrammes HPLC en phase inverse (colonne VYDAC C18, 1 mL/min, volume d'injection : 20 μ L) des ions extraits [M+H]⁺ 1302⁺, 1300⁺, 1298⁺, 1296⁺, 1292⁺ (numérotés en accord avec la numérotation de la figure 2) obtenus avec différentes phases mobiles. Analyses réalisées par HPLC-MS sur un échantillon de référence contenant des *i*-GDGTs.

Purification des *br*-GDGTs

Concernant la purification des échantillons de *br*-GDGTs, des essais à partir d'un mélange de référence ont été initialement menés en utilisant une colonne en phase inverse de type VYDAC. Dans ces conditions, nous avons obtenu une bonne séparation des différents composés, mais ceux-ci étaient élués avec des temps de rétention trop longs dans le cadre d'une collecte des composés (Figure 7a). Après différents essais, notre choix s'est finalement porté sur une colonne ZORBAX C-18 (Figure 7b). Différentes conditions de gradient à partir d'un mélange binaire AcOEt/MeOH ont été testées, ce qui nous a conduit à opter pour le gradient suivant : passage de 30% à 65% d'AcOEt en 15 minutes, puis jusqu'à 80% d'AcOEt en 10 minutes, pour revenir au mélange de départ en 2 minutes. En suivant ce mode opératoire, les *br*-GDGTs **VII** et **VIII** sont collectés ensemble (un seul pic) et sont élués avec des temps de rétention suffisamment courts compatibles avec la collecte de composés.

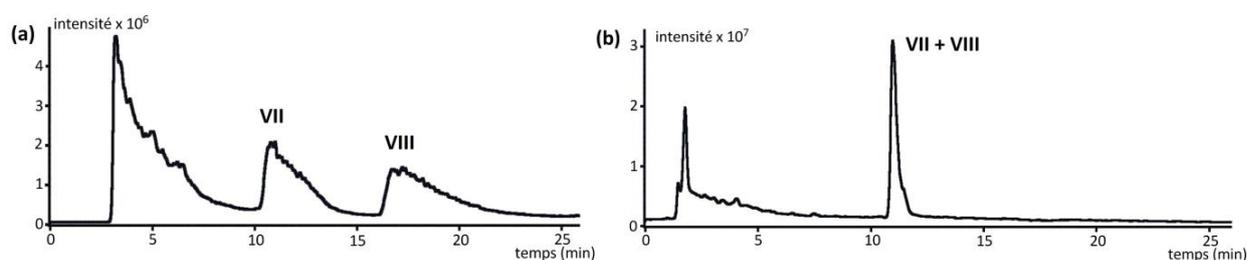


Figure 7 : Chromatogrammes HPLC obtenus pour un échantillon de référence de *br*-GDGTs avec deux modes d'éluions différents. (a) colonne VYDAC C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), programme d'éluion : gradient d'AcOEt de 55% à 90% dans le MeOH en 25 min, palier à 90% pendant 5 min, retour à 55% d'AcOEt en 1 min (b) colonne ZORBAX C-18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, Agilent), programme d'éluion : gradient binaire de 30% A à 65% A en 15 min (A : AcOEt ; B : MeOH) puis de 65% A à 80% A (10 min), retour à 30% A (2 min).

V.2.3. Purification par chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans le cas des échantillons contenant les *i*-GDGTs, une étape de purification supplémentaire par chromatographie sur couche mince a été réalisée après les deux étapes de collecte par HPLC. La fraction récoltée après purification par HPLC est dissoute dans du CH₂Cl₂, puis déposée sur une plaque préparative de SiO₂ d'épaisseur 0,25 mm. Un composé de référence (caldarchéol I), isolé à partir de l'archée *Methanobacterium thermoautotrophicum* (P. Schaeffer, résultats non publiés), est déposé en bordure de plaque. L'élution des composés est assurée à l'aide d'un mélange CH₂Cl₂/AcOEt (9 : 1) et le produit de référence est révélé au moyen d'acide phosphomolybdique dans de l'éthanol (caldarchéol : R_f 0,69). La zone de R_f choisie, dans laquelle nos produits d'intérêt (*i*-GDGTs) ont été élués (R_f de 0,76 à 0,45), est grattée puis introduite dans une tulipe contenant de la célite. Une filtration avec de l'AcOEt permet alors la récupération des *i*-GDGTs.

V.3. Datation au ¹⁴C par AMS des GDGTs

La datation au carbone 14 consiste de manière générale à mesurer la quantité de cet isotope présente au sein d'un organisme, ou, de manière générale, de matière organique. En effet, tout au long de leur vie, les êtres vivants absorbent et fixent le ¹⁴CO₂ de l'atmosphère. À leur mort, les échanges avec l'environnement cessent et la concentration en ¹⁴C décroît selon une loi de désintégration bien connue caractérisée par un temps de demi-vie (T_{1/2} = 5730 ans). Depuis les travaux de Libby dans les années 50, la datation au ¹⁴C consiste en une mesure de l'activité β⁻ permettant de remonter à la concentration en ¹⁴C et donc à l'âge de l'organisme grâce à la courbe de décroissance radioactive. Un des problèmes majeur de cette technique est qu'elle nécessite une grande quantité d'échantillon, de l'ordre du gramme du fait notamment de la très faible abondance du radioisotope à l'état naturel (0.000000001%). C'est la raison pour laquelle, depuis les années 80, les scientifiques s'intéressent au développement de techniques plus sensibles.

Les techniques actuelles de datation et plus particulièrement l'AMS (*Accelerated Mass Spectrometry*) permettent de remonter à l'âge de molécules individuelles dont les quantités disponibles sont de l'ordre du microgramme (Birkholz et al., 2013). Grâce à cette possibilité d'analyser des échantillons en très faibles quantités, l'AMS peut alors être considéré comme une « méthode non destructive » et trouve ainsi de nombreuses applications, notamment dans le domaine de l'archéologie. Les appareils liés à cette technique sont très coûteux et complexes, ce qui explique le fait que peu de laboratoires en soient équipés dans le monde. Grâce à une collaboration existant entre deux laboratoires de l'ETH de Zurich et notre équipe, nous avons eu accès à ce type d'équipement, ce qui nous a permis d'obtenir des âges absolus pour les GDGTs isolés de nos échantillons.

Le principe de cette technique est de déterminer la concentration en ¹⁴C résiduel par rapport aux autres isotopes stables (¹⁴C/¹²C et ¹⁴C/¹³C). Par un système de 2 spectromètres de masse séparés par un accélérateur de particules, toutes les interférences isobariques sont éliminées tels que ¹⁴C/¹⁴N ou bien ¹²CH₂⁻ et ¹³CH⁻. À partir des rapports isotopiques mesurés, la fraction de la valeur moderne (F¹⁴C) est obtenue puis corrigée par la valeur de δ¹³C permettant ainsi de prendre en compte les variations en isotope du carbone liées notamment au mode de fixation de cet élément par les micro-organismes. L'âge en ¹⁴C peut alors être calculé selon la formule suivante :

$$\text{âge en } ^{14}\text{C} = -8033 \times \ln F^{14}\text{C}$$

Cet âge en ^{14}C est exprimé en B.P. pour « Before Present » dont l'année 1950 est prise comme de référence pour définir le présent. En effet, dans ces années 1950, les essais nucléaires atmosphériques ont entraîné un apport important de carbone radioactif artificiel, biaisant alors les valeurs mesurées en ^{14}C . Des valeurs négatives de $F^{14}\text{C}$ indiquent ainsi des échantillons dont l'origine est postérieure à 1950 (Reimer et al., 2004).

En ce qui concerne nos échantillons, les *i*-GDGTs comme les *br*-GDGTs, présents à une profondeur de 40 - 50 cm, sont plus âgés que ceux de surface puisqu'ils sont datés d'il y a 1500 ans, âge à comparer à l'âge des GDGTs en surface, plus récents (165 ans, Tableau 3). Des études de datation antérieures sur l'échantillon le plus profond (50-60 cm) avaient permis d'obtenir des dates de 4300 et 5400 ans pour la matière organique totale et l'extrait organique, respectivement. Cette augmentation de l'âge avec la profondeur semble exclure la possibilité d'une matière organique profondément mélangée, par l'action des organismes (bioturbation) ou par lessivage de matière organique récente depuis la surface. Dans l'échantillon à 40-50 cm, pour lequel l'âge des *i*-GDGTs et des *br*-GDGTs a été mesuré, les valeurs obtenues (1500 ans environ) sont inférieures à celles mesurées pour une fraction lipidique (les *n*-alcanes, marqueurs de végétaux) de ce même échantillon, situées aux alentours de 3500 ans. Il se pourrait donc, en ce qui concerne les GDGTs, que ceux-ci proviennent d'un mélange d'une population ancienne de même âge que les *n*-alcanes, et d'une population plus récente, fournissant ainsi un âge « moyen ». Il s'agira, pour la suite du projet, de dater la matière organique du sol et l'extrait organique total de cet échantillon à 40-50 cm afin d'évaluer si la matière organique, dans sa globalité, a le même âge que les GDGTs, ou si celle-ci est plus ancienne, et se rapproche de l'âge déterminé pour les *n*-alcanes contenus dans cet échantillon.

Tableau 3: Résultats de la datation au carbone 14 par AMS. Mesures effectuées à l'ETH de Zürich en collaboration avec le Dr. Stefano Bernasconi et Dr. Irka Hajdas.

Nom de l'échantillon	Description	Quantité	Age ^{14}C (B.P.)	$\pm 1\sigma$	$F^{14}\text{C}$	$\pm 1\sigma$
BC03	0-10 cm, <i>br</i> -GDGTs	≈ 100 µg	165	205	0,980	0,025
CB18	0-10 cm, <i>n</i> -alcanes		-516*	63	1,066	0,008
BC01	40-50 cm, <i>i</i> -GDGTs	≈ 100 µg	1527	115	0,827	0,012
BC02	40-50 cm, <i>br</i> -GDGTs	≈ 100 µg	1543	147	0,825	0,015
CB19	40-50 cm, <i>n</i> -alcanes		3352	44	0,659	0,004
CB17	50-60 cm, extrait organique		5353	52	0,154	0,003

* une valeur négative traduit un âge moderne (i.e. post-bombe)

V.4. Mesures isotopiques du carbone et origines des GDGTs

La composition isotopique de toute molécule biosynthétisée est déterminée par plusieurs facteurs comme la composition isotopique de la source de carbone (CO_2 , CH_4 , bicarbonate, matière organique...) mais également les voies et mécanismes de biosynthèse permettant l'assimilation de ce carbone par l'organisme. Ainsi, grâce à cette mesure de rapport isotopique en carbone $\delta^{13}\text{C}$, il est possible d'obtenir des informations concernant la source de matière organique, le mode de vie de l'organisme et son métabolisme (source de carbone assimilée) – autotrophe (végétaux, bactéries) ou

hétérotrophe (animaux, champignons). Dans le premier cas, la production de matière organique par ces microorganismes est réalisée à partir de matière inorganique ($\text{CO}_{2(\text{aq})}$, HCO_3^-) sous l'action d'une source d'énergie externe qui peut être la lumière (phototrophes) ou des réactions chimiques (chimiotrophes) entre autres. Dans le second cas, ces organismes se nourrissent de substances organiques préexistantes issues d'autres organismes (carbohydrates tel le glucose, méthane, acétate,...).

Les études faisant état de la composition isotopique des GDGTs issus de sols sont toutefois rares. Ainsi, Weijers et al. (2010) rapportent les résultats de mesures de $\delta^{13}\text{C}$ pour différents types de sol. Dans ces milieux, la composition isotopique des chaînes alkyles dérivées des *i*-GDGTs est comprise entre -28 et 33 ‰ pour la chaîne acyclique, vers -29 ‰ pour la chaîne comportant 3 cycles et -28 ‰ pour la chaîne à 2 cycles, soit des valeurs allégées en ^{13}C comparées à celles calculées en milieu marin. En effet, les valeurs élevées en $\delta^{13}\text{C}$ du crénarchéol, identifié en milieu aquatique, s'expliquent par le fait que les Crénarchéotes marins sont des organismes chimioautotrophes assimilant le CO_2 et HCO_3^- (Schouten et al., 2013 ; Hoefs et al., 1997). Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ pour le 13,16-diméthyltacosane (**5**, Fig. 8) et le 5,13,16, triméthyltacosane (**6**, Fig. 8) provenant de sols avec une végétation en C3 varient entre -27 et -30 ‰ et pour le 5,13,16, triméthyltacosane présent au sein de végétation en C4 entre -18 et -19 ‰, suggérant ainsi un métabolisme de type hétérotrophe pour les bactéries à l'origine des *br*-GDGTs.

Dans la mesure où les GDGTs sont des composés lipidiques de poids moléculaire assez élevé (> 1 kDa), leur étude directe par chromatographie en phase gazeuse n'est pas possible. De ce fait, afin d'accéder à la composition isotopique du carbone de ces composés, il est nécessaire d'effectuer une étape de dégradation chimique sélective (traitement par HI- LiAlH_4) qui a pour but de couper les liaisons éther et de libérer la partie lipidique (hydrocarbures isoprénoides en C_{40} **1-4** (Fig. 8) pour les *i*-GDGTs, hydrocarbures ramifiés **5-6** (Fig. 8) pour les *br*-GDGTs).

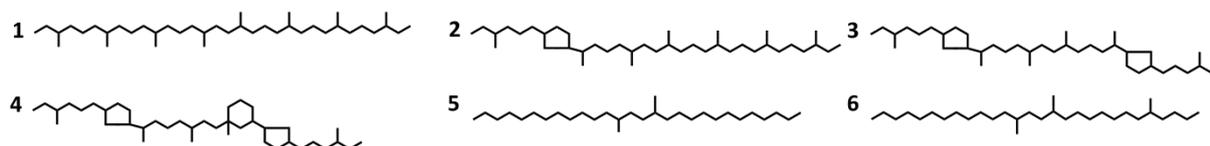


Figure 8: Structures des chaînes alkyles issues des *i*-GDGTs (1-4) et *br*-GDGTs (5-6) obtenues après traitement par HI-LAH.

Cette réaction de coupure sélective a été effectuée à l'aide d'acide iodhydrique (HI), qui va conduire à l'obtention d'iodures d'alkyles. Ces composés étant toutefois trop instables pour être analysés tels quels par chromatographie gazeuse, les iodures sont alors convertis en hydrocarbures saturés par hydrogénolyse à l'aide d'hydrure de lithium et d'aluminium. Le principe de la réaction est résumé sur la figure 9.

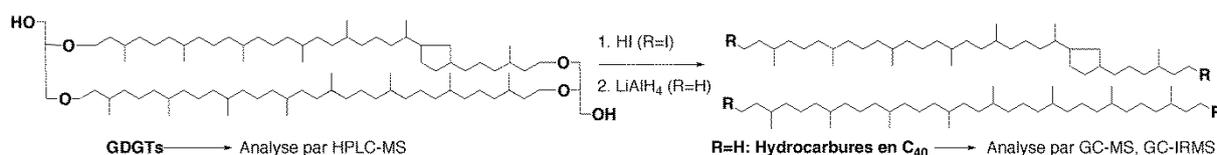


Figure 9: Coupure des liaisons éthers et formations des hydrocarbures saturés correspondants à partir des GDGTs par dégradation chimique sélective.

Dans le cas de nos échantillons, nous avons effectué cette réaction de coupure des liaisons éthers à partir de fractions chromatographiques enrichies en GDGTs obtenues par chromatographie liquide (sous-fractions chromatographiques obtenues lors de la séparation de l'extrait organique sur colonne de silice; cf. paragraphe V.2.1.). Les fractions du Hohneck 1 et Hohneck 3 ont ainsi été traitées, et les hydrocarbures saturés ainsi formés ont été analysés par couplage GC-MS, puis GC-IRMS. Les chromatogrammes obtenus dans le cas de l'échantillon Hohneck 3 sont représentés sur la figure 10a (*i*-GDGTs) et 10b (*br*-GDGTs).

Dans le cas de la fraction enrichie en *i*-GDGTs, nous observons bien, après traitement chimique, la présence de biphytane **1** parmi les composés majeurs, ainsi que de ses dérivés mono- (**2**), di- (**3**) et tri-cycliques (**4**). Nous observons également un certain nombre d'autres composés, comme des dérivés stéroïdiques et des *n*-alcanes, qui sont formés lors de la réaction de coupure d'éthers à partir des alcools correspondants présents dans la fraction de départ enrichie en *i*-GDGTs.

De même, le traitement par HI/LiAlH₄ d'une fraction enrichie en *br*-GDGTs de ce même échantillon conduit majoritairement à l'obtention des hydrocarbures ramifiés en C₃₂ (**5**) et C₃₃ (**6**), accompagnés de quelques alcanes linéaires formés à partir des alcools correspondants. Ces mêmes alcanes ramifiés sont également obtenus majoritairement dans le cas du traitement d'une fraction enrichie en *br*-GDGTs à partir de l'échantillon Hohneck 1.

La présence de ces différents hydrocarbures issus des GDGTs et leur abondance relative sont en accord avec la distribution des GDGTs dans les fractions avant coupure d'éthers. Par ailleurs, les alcanes linéaires formés à partir des *n*-alcools correspondants présentent une prédominance des homologues à nombre de carbone pair, ce qui est caractéristique d'une distribution provenant de végétaux. Les valeurs isotopiques de ces *n*-alcanes seront donc utilisées comme valeurs de référence pour ce qui est des lipides issus de végétaux. Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ ainsi mesurées par GC-IRMS sont reportées dans le tableau 4.

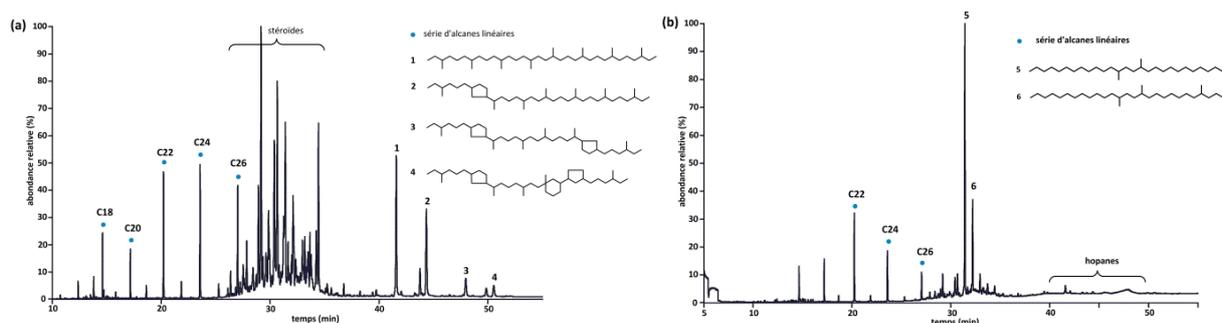


Figure 10: Chromatogrammes en phase gazeuse des fractions d'hydrocarbures issues du traitement par HI-LAH des GDGTs de l'échantillon Hohneck 3 (40-50 cm) (a) fraction issue des *i*-GDGTs et (b) fraction issue des *br*-GDGTs. Conditions : GC-MS (IE), colonne HP5 MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . Programme de température : 70-200°C (10°C/min), 200-300°C (4°C/min), isotherme à 300°C.

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont en accord avec celles reportées dans l'unique publication où figurent des mesures de $\delta^{13}\text{C}$ de dérivés de GDGTs dans des sols profonds (Weijers et al., 2010).

Tableau 4: Composition isotopique en carbone ($\delta^{13}\text{C}$) des *n*-alcane et des hydrocarbures 1-6.

		$\delta^{13}\text{C}$ (\pm écart-type) en ‰							
	<i>n</i> -C20	<i>n</i> -C22	<i>n</i> -C24	<i>n</i> -C26	1 ¹	2 ¹	3 ¹	5 ¹	6 ¹
Hohneck 1	-35,1 (0,5)	-34,5 (0,4)	-34,2 (0,4)	-34,7 (0,7)	/	/	/	-29,0 (1,4)	-28,1 (1,1)
Hohneck 3	-32,0 (0,6)	-32,7 (0,2)	-32,4 (0,7)	SLD	-29,1 (1,3)	-30,8 (0,9)	-29,1 (1,4)	-29,5 (0,9)	-26,3 (1,0)

¹Voir figure 8 pour les structures ; SLD = sous la limite de détection. Les chiffres entre parenthèse correspondent à l'écart-type des mesures.

Les composés **5** et **6** (13,16-diméthyl-octacosane et 5,13,16-triméthyl-octacosane, respectivement) présentent des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ comprises entre -26,3 et -29,5 ‰ et sont relativement proches entre elles (à l'exception du composé **6** en profondeur, peut être lié à un problème de coélution ?), aux deux profondeurs étudiées. Ces valeurs sont assez différentes de celles des *n*-alcane issus de végétaux (valeurs typiques de plantes en C3), qui, elles-mêmes, varient entre la surface et la profondeur. Ces résultats laissent à penser qu'il n'y a pas de lien direct entre composition isotopique des GDGTs et celle de la végétation environnante. En ce qui concerne les valeurs isotopiques des hydrocarbures isoprénoïdes, celles-ci sont proches, indiquant une origine commune.

Au vu de ces résultats, il apparaît toutefois que l'interprétation des données isotopiques est extrêmement hasardeuse, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les bactéries responsables de la biosynthèse des *br*-GDGTs sont, pour l'essentiel, inconnues à ce jour, tout comme le sont leurs voies métaboliques (et de fractionnement isotopique associé). Les mêmes remarques peuvent être adressées en ce qui concerne les *i*-GDGTs dont l'origine et les sources de carbone, dans les sols, sont aussi largement méconnues. Enfin, il convient de noter qu'il s'agit là d'un travail pionnier, et il n'existe à ce jour que peu (une seule publication, à notre connaissance) de données isotopiques concernant les GDGTs dans les sols profonds. Ces seules données sont toutefois très proches de celles que nous avons obtenues. Il est clair que des travaux complémentaires, incluant des expériences de marquage isotopique avec des sources de carbone potentielles, sont indispensables pour mieux comprendre le métabolisme de ces microorganismes particuliers dans les sols.

VI. Conclusion

Cette étude sur la distribution et l'origine des tétraéthers de diglycérol (GDGTs) dans l'environnement et leurs implications en terme paléoclimatiques et paléoenvironnementaux s'inscrit dans les problématiques actuelles développées en biogéochimie organique, comme le montre le nombre croissant de publications traitant de ce sujet depuis les années 2000. Afin de mener à bien ces études, il semblait important, au travers de ce stage, de proposer un nouveau protocole d'analyse et de purification des GDGTs et d'obtenir des données supplémentaires concernant l'origine de ces GDGTs, leur distribution et les facteurs environnementaux gouvernant ces distributions dans les sols, notamment dans les sols profonds.

Du fait des très faibles teneurs en GDGTs dans les échantillons étudiés (quelques microgrammes isolés à partir de sols de l'ordre du kilogramme), ainsi que l'extrême complexité des extraits lipidiques sédimentaires de manière générale, ce travail d'isolement des GDGTs représentait un réel

défi analytique. Une méthode de séparation et purification de nos composés a pu être optimisée combinant plusieurs techniques chromatographiques : CL, HPLC-MS en phase inverse et en phase normale avec collecte et CCM. Par la suite, ce protocole pourra être utilisé plus généralement pour l'étude des GDGTs dans tous les types d'environnements (milieux marins, lacustres, sols, tourbières). Grâce à ces étapes d'isolement des GDGTs, qui ont permis d'obtenir les *i*-GDGTs et *br*-GDGTs purs à partir de deux échantillons de sols, des âges absolus ont pu être obtenus pour ces derniers par datation au ^{14}C par AMS. Par ailleurs, ce protocole nous a également permis d'obtenir des fractions suffisamment enrichies en GDGTs pour effectuer des réactions de dégradation chimique sélective (réactions de coupure de fonctions éthers) afin d'avoir accès à la composition isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) des GDGTs, fournissant ainsi (potentiellement) des informations concernant les origines des GDGTs dans les sols, et les sources de carbone utilisées par les microorganismes produisant ceux-ci.

Alors que le sol de surface contient exclusivement des *br*-GDGTs d'origine bactérienne, une augmentation progressive de l'abondance relative des *i*-GDGTs issus d'archées avec la profondeur a été observée, qui pourrait être due à la présence de molécules « fossiles », témoins d'une population fossile d'archées. Les mesures de datation au ^{14}C indiquent que ces *i*-GDGTs et *br*-GDGTs coexistant en profondeur ont le même âge (environ 1500 ans BP) mais sont nettement plus jeunes que d'autres composantes lipidiques (les *n*-alcanes) du même échantillon de sol (5500 ans BP). Ces résultats suggèrent un possible mélange de GDGTs anciens et plus récents ou bien l'utilisation de matière organique ancienne et plus récente comme source de carbone par ces microorganismes, dans la mesure où ils seraient hétérotrophes. Les *br*-GDGTs présents en surface sont quant à eux bien plus récents (200 ans BP) et pourraient correspondre également à un mélange de GDGTs actuels et sub-récents. La composition isotopique du carbone des GDGTs dans les sols est proche des rares données publiées dans la littérature (un seul article), et le manque actuel de données rend l'interprétation de cette signature isotopique délicate, voire hasardeuse.

Il ressort de ces travaux que des études supplémentaires s'avèrent nécessaires dans le futur afin d'accroître nos connaissances concernant l'origine des différentes GDGTs dans les sols, ainsi que les paramètres environnementaux qui gouvernent la distribution des sources biologiques (encore méconnues) de ces composés dans les différents sols, que ce soit en surface ou en profondeur. Le protocole analytique de séparation des GDGTs mis au point dans le cadre de ce stage devrait, à ce titre, se montrer très utile.

VII. Bibliographie

1. Birkholz, A., Smittenberg, R.H., Hajdas, I., Wacker, L., Bernasconi, S.M., **2013**, Isolation and compound specific radiocarbon dating of terrigenous branched glycerol dialkyl glycerol tétraéthers (brGDGTs), *Organic Geochemistry*, 60, 9-19.
2. Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., Stetter, K.O., **1997**, *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113° C, *Extremophiles*, 1, 14-21.
3. Blumenberg, M., Seifert, R., Reitner, J., Pape, T., Michaelis, W., **2004**, Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 30, 11111-11116.
4. Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P., **2008**, Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota, *Nature Reviews in Microbiology*, 6, 245-252.
5. Carrillo Hernandez, T.d.J., thèse soutenue le 27 janvier **2004**, Caractérisation moléculaire et isotopique de biomarqueurs de milieu de dépôt anciens très immature (Jurassique Supérieur de la plate-forme russe, Laboratoire de Géochimie Bioorganique de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
6. Castañeda, I.S., Schouten, S., **2011**, A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments, *Quaternary Science Reviews*, 30, 2851-2891.
7. Chappe, B., Albrecht, P., Michaelis, W., **1982**, Polar lipids of archaebacteria in sediments and petroleum, *Science*, 217, 65-66.
8. Gliozzi, A., Paoli, G., De Rosa, M., Gambacorta, A., **1983**, Effect of isoprenoid cyclisation on the transition temperature of lipids in thermophilic archaebacteria, *Biochimica et Biophysica Acta*, 735, 234-242.
9. Hoefs, M.J.L., Schouten, S., De Leeuw, J.W., King, L.L., Wakeham, S.G., Sinninghe Damsté, J.S., **1997**, Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3090-3095.
10. Hopmans, E.C., Schouten, S., Pancost, R.D., Van der Meer, M.T.J., Sinninghe Damsté, J.S., **2000**, Analysis of intact tetraether lipids in archaeal cell material and sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14, 585-589.
11. Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Schefuß, E., Herfort, L., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., **2004**, A novel proxy for terrestrial organic matter in sediments based on branched and isoprenoid tetraether lipids, *Earth and Planetary Science Letters*, 224, 107-116.
12. Huguet, C., De Lange, G.J., Gustafsson, O., Middelburg, J.J., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., **2008**, Selective preservation of soil organic matter in oxidized marine sediments (Madeira Abyssal Plain), *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72, 6061-6068.
13. Jenkyns, H.C., Schouten-Huibers, L., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., **2012**, Warm Middle Jurassic-Early Cretaceous high-latitude sea-surface temperatures from the Southern Ocean, *Climate of the Past*, 8, 215-226.
14. Karner, M.B., DeLong, E.F., Karl, D.M., **2001**, Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean, *Nature*, 409, 507-510.
15. Knappy, C.S., Keely, B.J., **2012**, Novel glycerol dialkanol triols in sediments: transformation products of glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids or biosynthetic intermediates?, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 48, 841-843.
16. Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., **2006**, Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils, *Nature*, 442, 806-809.
17. Lipp, J.S., Morono, Y., Inagaki, F., Hinrichs, K.-U., **2008**, Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments, *Nature*, 454, 991-994.
18. Liu, Y., Beer, L.L., Whitman, W.B., **2012**, Minireview: Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes, *Environmental Microbiology*, 14, 2632-2644.
19. Reimer, P.J., Brown, T.A., Reimer, R.W., **2004**, Discussion: Reporting and calibration of post-bomb ¹⁴C data, *Radiocarbon*, 46, 1299-1304.
20. Schouten, S., Hoefs, M.J.L., Koopmans, M.P., Bosch, H.-J., Sinninghe Damsté, J.S., **1998**, Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments, *Organic Geochemistry*, 29, 1305-1319.

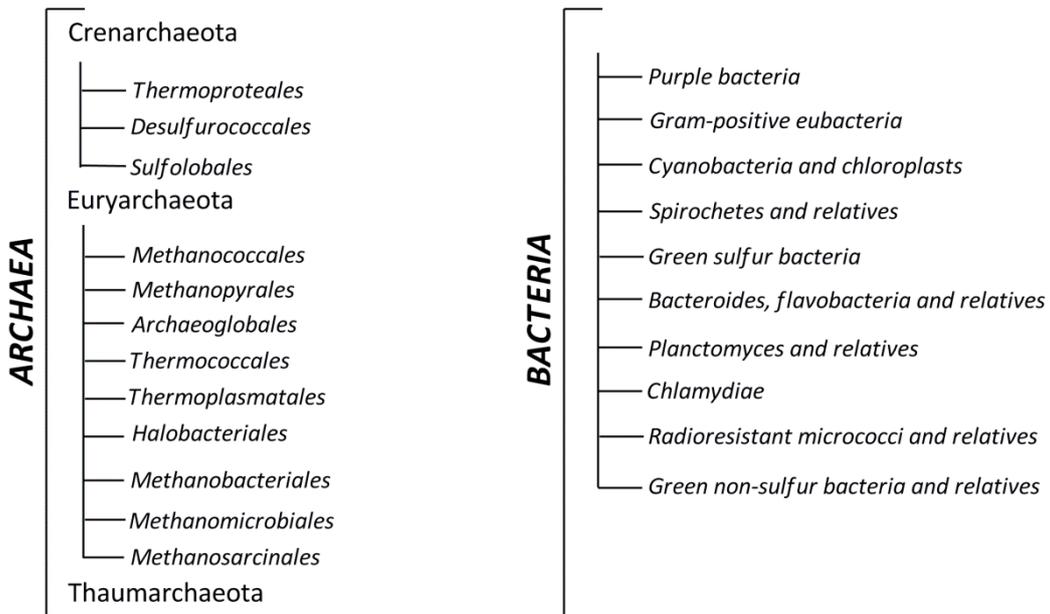
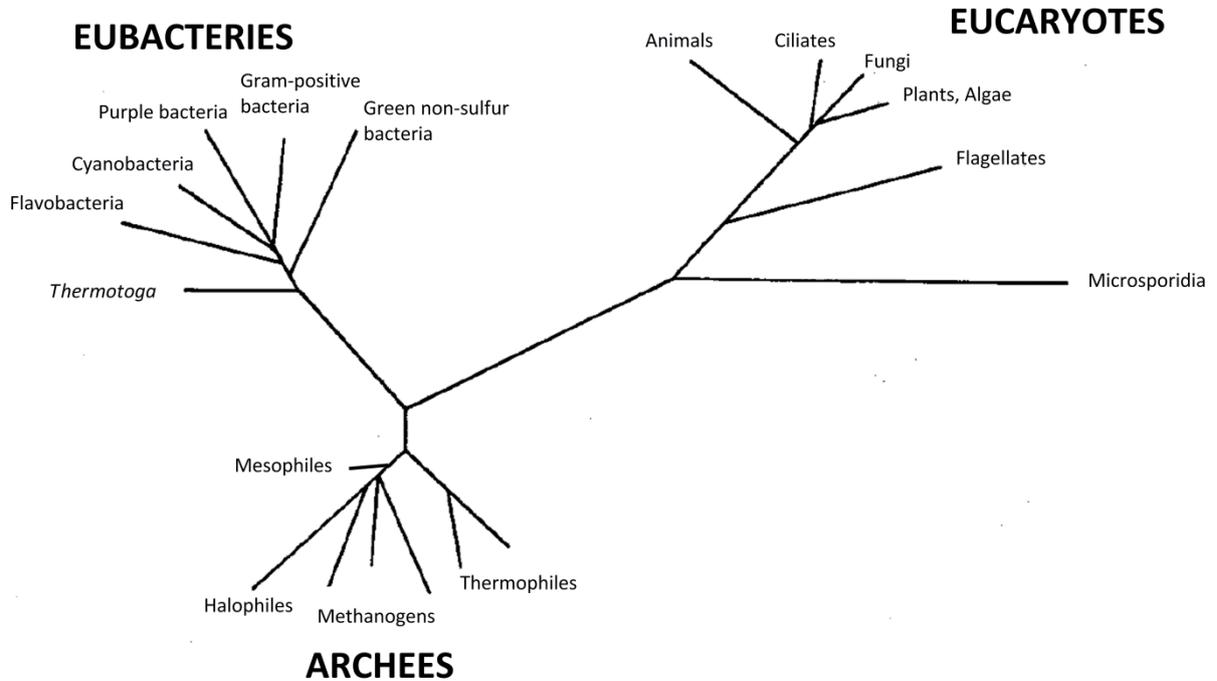
21. Schouten, S., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., Sinninghe Damsté, J.S., **2000**, Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 14421-14426.
22. Schouten, S., Hopmans, E.C., Schefuß, E., Sinninghe Damsté, J.S., **2002**, Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperature?, *Earth and Planetary Science Letters*, 204, 265-274.
23. Schouten, S., Wakeham, S.G., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2003**, Biogeochemical evidence that thermophilic archaea mediate the anaerobic oxidation of methane, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1680-1686.
24. Schouten, S., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2004**, The effect of maturity and depositional redox conditions on archaeal tetraether lipid palaeothermometry, *Organic Geochemistry*, 35, 567-571.
25. Schouten, S., Hopmans E.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2013**, The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: a review, *Organic Geochemistry*, 54, 19-61.
26. Sinninghe Damsté, J.S., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., Schouten, S., Geenevasen, J.A.J., **2000**, Newly discovered non-isoprenoid glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in sediments, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1683-1684.
27. Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Prah, F.G., Wakeham, S.G., Schouten, S., **2002**, Distribution of membrane lipids of planktonic crenarchaeota in the Arabian sea, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2997-3002.
28. Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Foesel, B.U., Overmann, J., Dedysh, S.N., **2011**, 13,16-dimethyl octacosanedioic acid (iso-diabolic acid), a common membrane-spanning lipid of acidobacteria subdivisions 1 and 3, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4147-4154.
29. Weijers, J.W.H., Schouten, S., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., David, O.R.P., Coleman, J.M., Pancost, R.D., Sinninghe Damsté, J.S., **2006**, Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits, *Environmental Microbiology*, 8, 648-657.
30. Weijers, J.W.H., Schouten, S., Van den Donker, J.C., Hopmans E.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2007**, Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 703-713.
31. Weijers, J.W.H., Wiesenberg, G.L.B., Bol, R., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., **2010**, Carbon isotopic composition of branched tetraether membrane lipids in soils suggest a rapid turnover and a heterotrophic life style of their source organism(s), *Biogeosciences*, 7, 2959-2973.
32. Woese, C.R., **1987**, Bacterial evolution, *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.
33. Yang, H., Ding, W., Wang, J., Jin, C., He, G., Qin, Y., Xie, S, **2012**, Soil pH impact on microbial tetraether lipids and terrestrial input index (BIT) in China, *Science China Earth Sciences*, 55, 236-245.

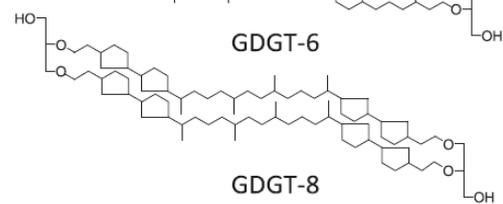
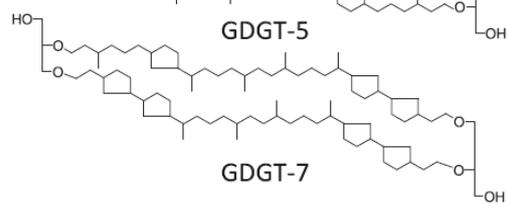
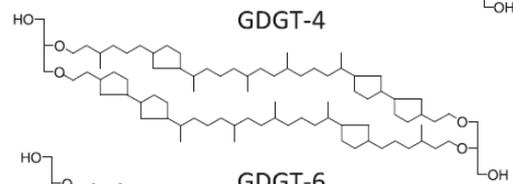
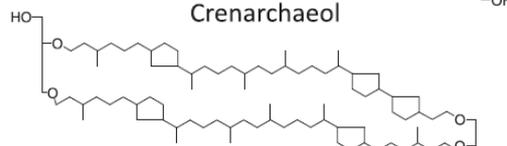
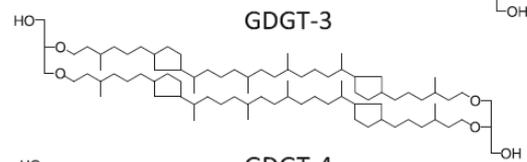
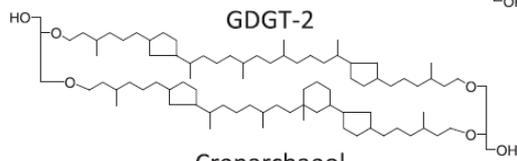
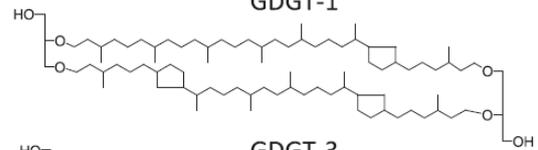
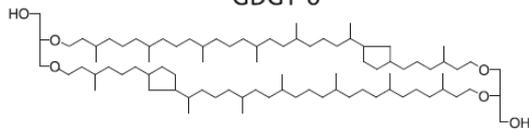
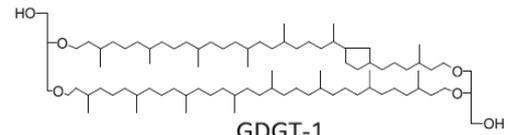
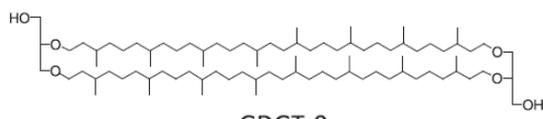
Annexes

Annexe 1

Classification du monde du Vivant - Arbre phylogénétique

(cf. paragraphe III.1.)



Annexe 2**Structures des GDGTs isoprénoïdes****(cf. paragraphe III.2.)**

Annexe 3

Indices paléo environnementaux BIT, MBT/CBT et TEX₈₆

(cf. paragraphe III.3.)

Indice BIT

L'indice BIT (Branched Isoprenoid Tetraether index) permet de retracer l'origine de la matière organique dans les sédiments. Cet indice correspond au rapport entre la concentration en GDGT ramifiés et la concentration en GDGTs ramifiés (composés VI-VIII, cf. Fig.4) plus crénarchéol (Hopmans et al., 2004).

$$\text{indice BIT} = \frac{[\text{GDGT VI}] + [\text{GDGT VII}] + [\text{GDGT VIII}]}{[\text{Crenarchaeol}] + [\text{GDGT VI}] + [\text{GDGT VII}] + [\text{GDGT VIII}]}$$

Or, les sols contiennent principalement des GDGTs ramifiés du fait de la présence de bactéries anaérobies qui les synthétisent, alors que les sédiments de milieu marin ouvert, c'est-à-dire qui se trouvent éloignés des côtes terrestres, présentent majoritairement des *i*-GDGTs dont le GDGT-0 et du crénarchaeol, montrant ainsi la contribution non négligeable de ces Thaumarchaeotes dans ces environnements. C'est la raison pour laquelle un indice BIT proche de 0 caractérise des sédiments d'origine marine contrairement à un indice de BIT avoisinant 1 qui témoigne d'échantillons d'origine terrestre. Il est alors possible d'étudier l'apport de matière organique d'origine terrestre dans les océans de part le transport fluvial. Les sédiments marins en provenance des régions côtières et les sédiments lacustres, à l'interface donc entre le milieu terrestre et marin, présentent un indice de BIT variable (Hopmans et al., 2004). Même si la faible abondance en crénarchéol dans les sols n'influence pas la mesure en BIT (Weijers et al., 2006b), d'autres études, cependant, ont mis en évidence une mauvaise corrélation et des contradictions dans les résultats obtenus avec cet indice BIT et d'autres indicateurs géochimiques comme la mesure de la composition isotopique en carbone $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$ (Huguet et al. 2007). La prise en compte de la matière organique provenant de la végétation en plus de la matière organique du sol (l'indice BIT tenant compte uniquement de la matière organique du sol) pour les mesures isotopiques en carbone peut expliquer en partie ces résultats. Le pH du sol peut également être un facteur important influençant la mesure de BIT. Ces exemples illustrent le fait que certains paramètres externes peuvent affecter les mesures de certains indices ayant pour conséquence des résultats contradictoires. Il s'agit donc de manier avec précaution les résultats obtenus lors de l'interprétation des données.

Indice MBT/CBT

Les indices MBT (Methylation of Branched Tetraether) et CBT (Cyclization of Branched Tetraether), définis par Weijers (2007), peuvent être corrélés au pH du sol ainsi qu'à la température annuelle moyenne de l'air ou MAT (Mean Annual Air Temperature).

$$\text{indice MBT} = \frac{[\text{GDGTs ramifiés sans méthyl en position 5 et 5'}]}{\sum[\text{GDGTs ramifiés}]}$$

$$\text{indice CBT} = -\log\left(\frac{[\text{GDGT - IX}] + [\text{GDGT - X}]}{[\text{GDGT - VIII}] + [\text{GDGT - VII}]}\right)$$

L'indice MBT représente le degré de méthylation de la chaîne carbonée où une valeur de MBT élevée signifie un faible degré de méthylation. Cet indice est corrélé négativement avec la température de l'air, c'est-à-dire qu'une augmentation du nombre de méthyle est observée lors d'une diminution de température. Cet indice est également à mettre en lien avec le taux de précipitation et le pH. Quant à l'indice CBT, celui-ci est étroitement lié au pH du sol. Plus le pH du sol est élevé, plus CBT est grand, traduisant un nombre important de cycles introduit au sein de la chaîne carbonée. Ces différences de structures de GDGTs ont alors un impact sur le fonctionnement de la membrane cellulaire des micro-organismes. En effet, afin d'assurer ses besoins énergétique, la cellule doit assurer le transport des protons au sein de la membrane. Cette perméabilité de la membrane aux protons permet alors de maintenir le gradient de pH nécessaire et cela en piégeant les molécules d'eau dans la couche lipidique membranaire (Schouten et al., 2013). L'ajout de cycles dans la chaîne carbonée induit une diminution de la densité de la couche lipidique permettant alors à plus de molécule d'eau de pénétrer dans la membrane, ayant pour conséquence une augmentation de la perméabilité aux protons. C'est ainsi que certains micro-organismes peuvent s'adapter à des conditions de températures et de pH particuliers par un changement de structure de leur membrane cellulaire.

De la même façon que pour l'indice BIT, certains facteurs externes peuvent fausser les calculs. Par exemple, la provenance de la matière organique est un paramètre à prendre en compte car les *br*-GDGTs sont susceptibles d'être entraînés par des rivières et des fleuves. Certaines valeurs de MBT ou CBT peuvent également être affectées par le phénomène de maturation des sols et sédiments du fait de la dégradation sélective de certains GDGTs, les GDGTs ne contenant pas de cycle étant plus stables thermiquement (Schouten et al., 2004).

Indice TEX₈₆

L'indice TEX₈₆ (TetraEther indeX pour des molécules à 86 carbones), notamment étudié par Schouten (2002), est un indicateur géochimique utilisé afin de remonter à la température du passé à la surface de l'océan. Cet indice est calculé à partir des GDGTs isoprénoides présents en milieu marins et au sein desquels le nombre de cyclopentanes est fortement dépendant de la température du milieu et de la température comme expliqué précédemment.

$$TEX_{86} = \frac{[GDGT - III] + [GDGT - IV] + [GDGT - \text{isomère de VI}]}{[GDGT - II] + [GDGT - III] + [GDGT - IV] + [GDGT - \text{isomère de VI}]}$$

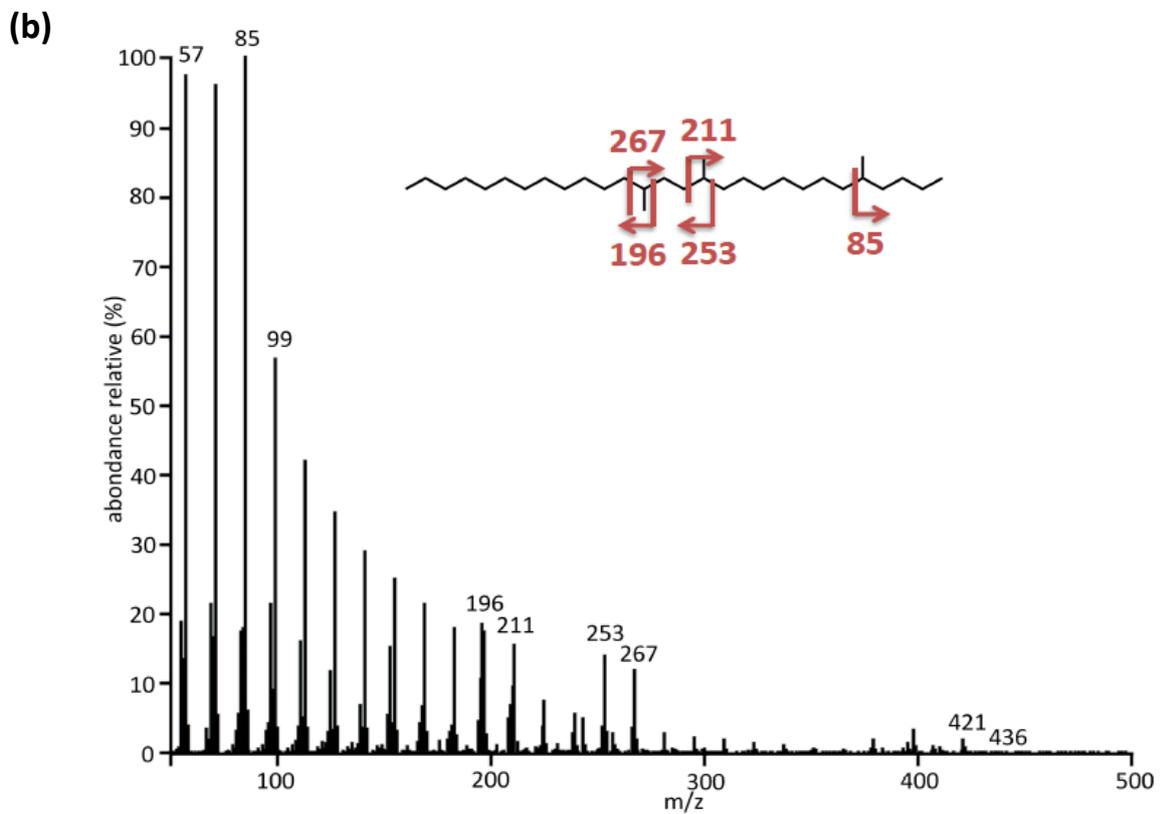
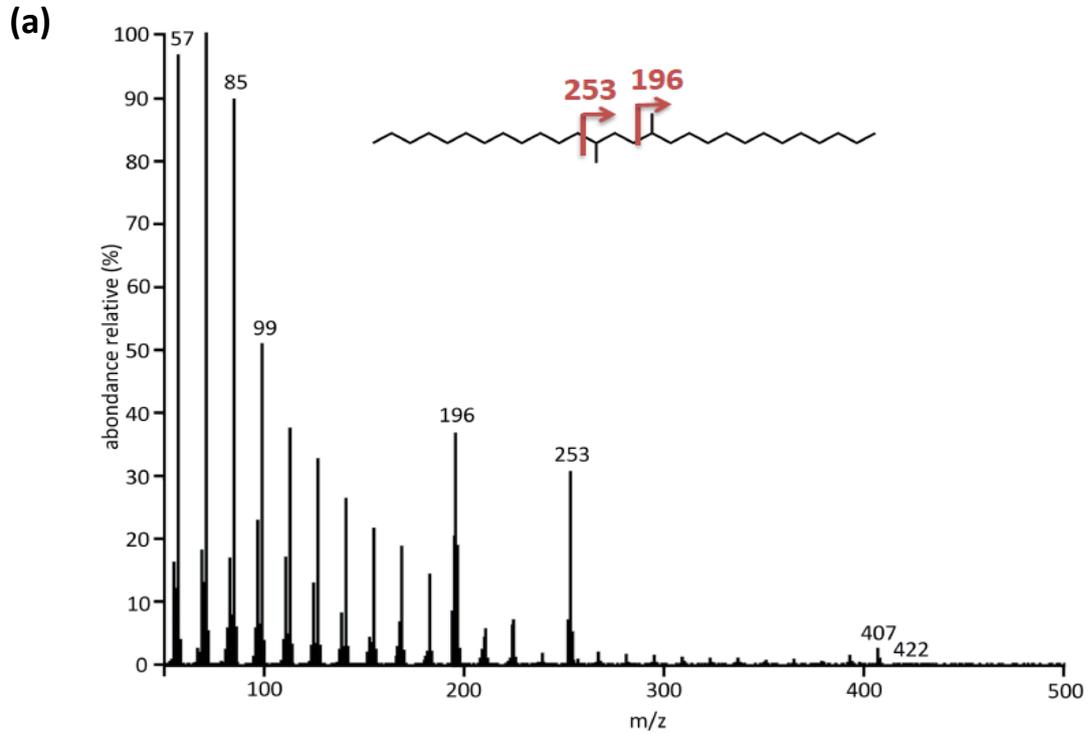
Toutefois, l'utilisation de cet indice est justifiée pour des milieux dont la température est supérieure à 15°C et des facteurs tels que les saisons et la profondeur des sédiments marins (Schouten et al., 2013).

Annexe 4**Principe des mesures isotopiques par GC-IRMS****(cf. paragraphe IV.3.2.)**

Le spectromètre de masse isotopique mesure le rapport $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ aux masses respectives de m/z 44 et 45 correspondant aux isotopes $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ pour m/z 44 et $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ et $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ pour m/z 45. Cette contribution de l'isotope stable de l'oxygène ^{17}O pour la masse 45 n'est pas négligeable, entraînant la prise en compte de l'isotope ^{12}C dans la masse 45. Il s'agit alors d'effectuer une correction par une mesure de la masse m/z 46 ($^{11}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, les autres isotopes étant négligeables) indiquant la proportion en ^{18}O à partir de laquelle on peut déduire l'abondance en ^{17}O grâce à une relation linéaire. Connaissant ainsi la part de l'isotope ^{17}O , il est possible de remonter à la contribution de $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ dans le calcul de la masse m/z 45. Ensuite, à partir de la mesure de l'abondance relative isotopique des atomes stables du carbone, la valeur de $\delta^{13}\text{C}$ peut être mesurée. Cette valeur indique une déviation par rapport à un carbonate de référence du nom de PeeDee Belemnite (PDB) dont le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ est égal à 0,01112372. Étant donné que les composés organiques naturels fixent préférentiellement le CO_2 contenant le carbone « léger » (^{12}C), les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont négatives. Plus cette valeur est négative, plus il y a un appauvrissement en ^{13}C (ou enrichissement en ^{12}C), ce que l'on appelle une signature isotopique « légère ».

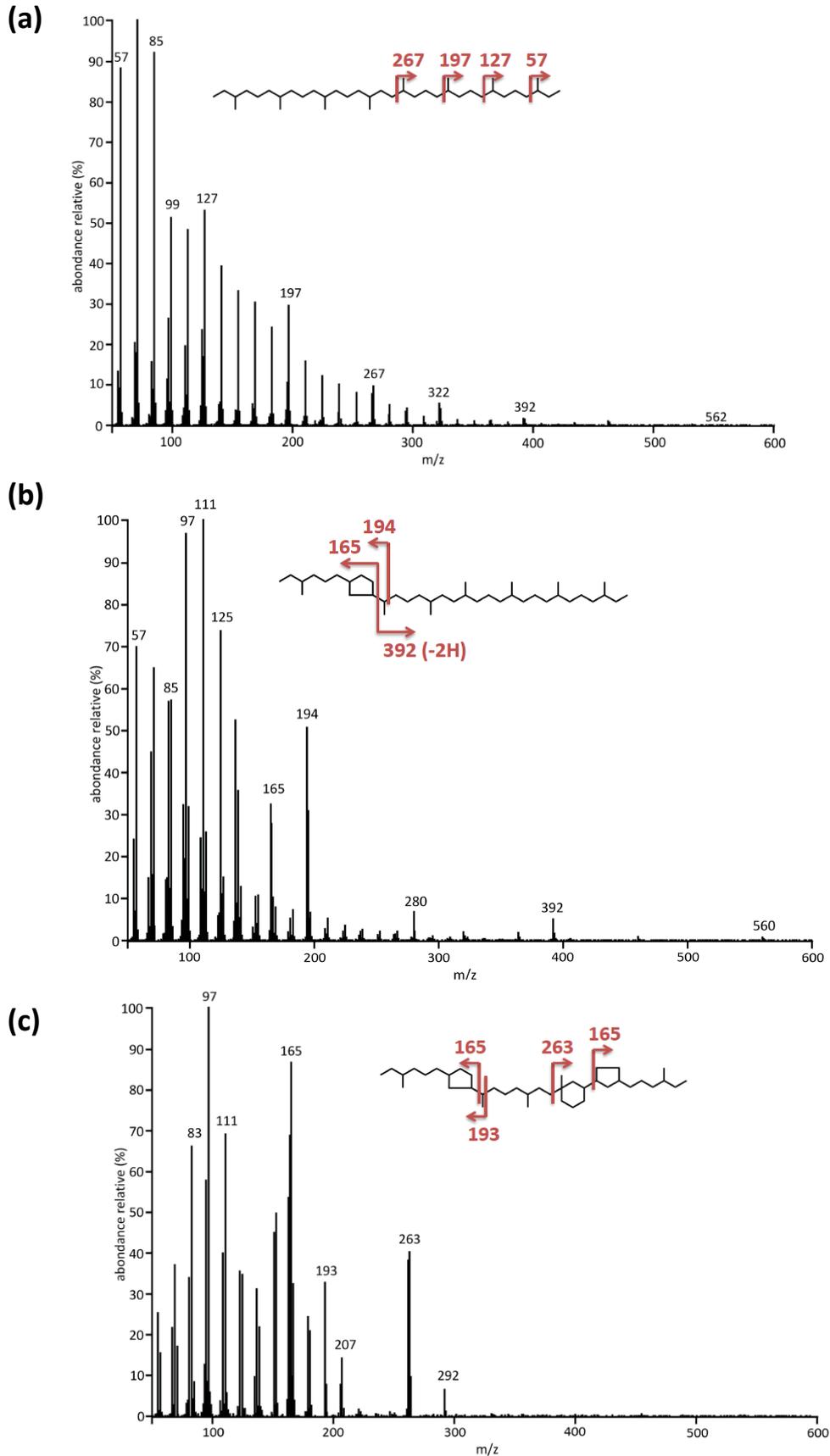
$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{échantillon}} - ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}}} \times 1000$$

Annexe 5.1.

Spectres de masse des chaînes alkyles libérées par coupure d'éther à partir des *i*-GDGTs

Annexe 5.2.

Spectres de masse des chaînes alkyles libérées par coupure d'éther à partir des br-GDGTs



Bibliographie des annexes :

1. Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Schefuß, E., Herfort, L., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., **2004**, A novel proxy for terrestrial organic matter in sediments based on branched and isoprenoid tetraether lipids, *Earth and Planetary Science Letters*, 224, 107-116.
2. Huguët, C., Smittenberg, R.H., Boer, W., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., **2007**, Twentieth century proxy records of temperature and soil organic matter input in the Drammensfjord, southern Norway, *Organic Geochemistry*, 38, 1838-1849.
3. Schouten, S., Hopmans, E.C., Schefuß, E., Sinninghe Damsté, J.S., **2002**, Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperature?, *Earth and Planetary Science Letters*, 204, 265-274.
4. Schouten, S., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2004**, The effect of maturity and depositional redox conditions on archaeal tetraether lipid palaeothermometry, *Organic Geochemistry*, 35, 567-571.
5. Schouten, S., Hopmans E.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2013**, The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: a review, *Organic Geochemistry*, 54, 19-61.
6. Weijers, J.W.H., Schouten, S., Spaargaren, O.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2006**, Occurrence and distribution of tetraether membrane lipids in soils: Implication for the use of the TEX₈₆ proxy and the BIT index, *Organic Geochemistry*, 37, 1680-1693.
7. Weijers, J.W.H., Schouten, S., Van den Donker, J.C., Hopmans E.C., Sinninghe Damsté, J.S., **2007**, Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 703-713.