



UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE • 3MPL

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

# Méthodologies pour l'étude du fractionnement isotopique photosynthétique et post-photosynthétique par RMN $^{13}\text{C}$ isotopique

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie analytique

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Alexis GILBERT**

*Le 08 juillet 2010, devant le jury ci-dessous :*

*Rapporteurs*

Mlle Isabelle BILLAULT, *Maître de Conférences • Université de Paris XI*  
M. Guillaume TCHERKEZ, *Professeur • Université de Paris XI*

*Examineurs*

Mme Monique MATHE-ALLAINMAT, *Chargé de Recherches au CNRS •*  
*Université de Nantes*

M. Pascal BRUNERIE, *Docteur • Société Pernod Ricard*

*Directeur de thèse*

M. Gérard REMAUD, *Professeur • Université de Nantes*

*Co-Directeur de thèse*

M. Richard ROBINS, *Directeur de Recherches au CNRS • Université de Nantes*

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe EBSI (Elucidation de Biosynthèses et Spectrométries Isotopiques) du laboratoire CEISAM (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation). Je remercie son directeur, M. Bruno BUJOLI, de m'y avoir accueilli.

En premier lieu, je tiens exprimer ma reconnaissance à M. Gérard REMAUD, qui a accepté de diriger mon travail de recherche, pour son enthousiasme communicatif, sa disponibilité et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie également M. Richard ROBINS, qui a accepté de co-diriger cette thèse, pour sa disponibilité et pour le soutien qu'il m'a apporté.

Les résultats présentés dans cette thèse auraient sans doute été moins abondants sans l'apport de Mlle Virginie SILVESTRE. Je tiens à la remercier particulièrement pour son aide précieuse pour la mise au point et l'analyse des échantillons par RMN <sup>13</sup>C, ainsi que pour le soutien qu'elle m'a accordé au cours de la rédaction de cette thèse.

Je remercie vivement Mlle Isabelle BILLAULT et M. Guillaume TCHERKEZ, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs, ainsi que Mme Monique MATHE-ALLAINMAT et M. Pascal BRUNERIE, pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer : Kévin LEMAIRE, Grégory LOAEC, Ugo BUSSY et Anaïs LEFRANCOIS pour leur aide précieuse et le sérieux (mais pas que) dont ils ont fait preuve lors de leur stage.

Merci à Denis LOQUET pour la mise en place de l'HPLC, sa disponibilité et la bonne humeur qu'il a insufflé au bureau 017... rot to be...!

Merci également à Isabelle LOUVET, Illa TEA et Nadia GUIGNARD pour les analyses SMRI.

Un grand merci à Jérémy Lothier de l'Institut de Biologie des Plantes d'Orsay pour la culture de la lampourde (*Xanthium strumarium*) et l'extraction de l'amidon foliaire (alias « le précieux »...).

Un grand merci à Katarzyna Kosieradzka, alias Kasia, pour les soirées passées ensemble, pour m'avoir supporté pendant toute la durée de ma thèse et pour m'avoir donné envie de découvrir la Pologne...Dziękuję bardzo !

Merci à Julie « j'ai plus qu'une carte » pour le soutien qu'elle m'a apporté lors de la conception de mon « bébé », pour les restos du samedi, les « sushi parties » et les shooters gratuits...et j'en passe...à refaire !

Des remerciements chaleureux sont adressés à tous ceux que j'ai pu côtoyer pendant la thèse (ou avant) au laboratoire : Pauline, Vincent, Patrick G., Benoît, Nadia, Ingrid, Estelle, Estelle...et aussi à tous ceux que j'oublie ... Un merci particulier à Eliot, mon confrère « carbone treiziste », et aussi co-fondateur de la confrérie Vivien...

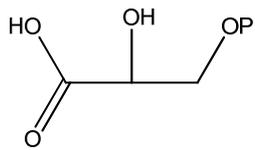
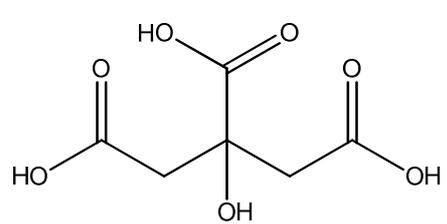
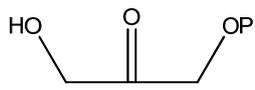
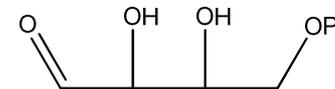
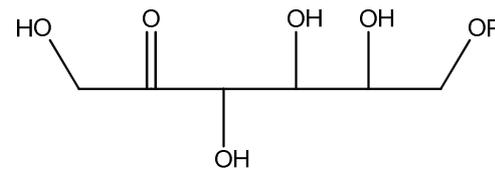
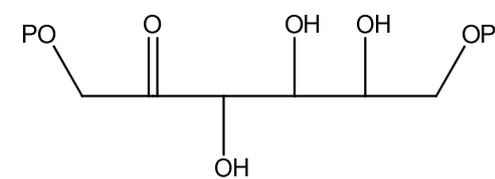
Enfin, je remercie mes parents et beaux-parents sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, pour leur soutien sans faille et leurs encouragements, mes frères et sœurs, et tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien.

## Abréviations – Notations utilisées

A	Abondance isotopique
A	Facteur de fractionnement isotopique
AQ	Durée d'échantillonnage du signal
B <sub>0</sub>	Champ magnétique statique du spectromètre
B <sub>1</sub>	Champ radiofréquence sur le canal F1 ( <sup>13</sup> C)
C3	Métabolisme avec un intermédiaire 3-phosphoglycérate à 3 carbones
C4	Métabolisme avec un intermédiaire oxaloacétate à 4 carbones
CAM	Crassulacean Acid Metabolism ; métabolisme intermédiaire entre C3 et C4
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
Cr(Acac) <sub>3</sub>	Tris-acétylacétonate de chrome III ; agent de relaxation
D1	Délai d'attente entre deux impulsions
EIC	Effet isotopique cinétique
EIE	Effet isotopique d'équilibre
F <sub>i</sub>	Fraction molaire statistique
f <sub>i</sub>	Fraction molaire expérimentale de l'isotopomère substitué sur le site i
FID	Free Induction Decay. Signal de précession libre de l'aimantation après une impulsion d'angle β
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
M	Aimantation
M <sub>0</sub>	Aimantation à l'état initial
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NS	Nombre d'accumulations (nombre de scans)
PERCH	Logiciel de lissage des spectres développé par l'Université de Kuopio (Finlande)
P <sub>i</sub>	Nombre de noyaux équivalents pour le site i
R	Rapport isotopique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SMRI	Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques

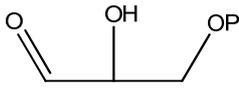
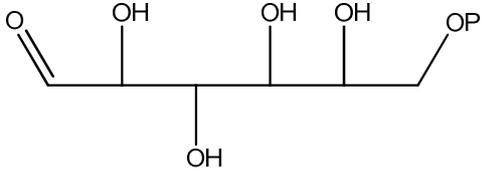
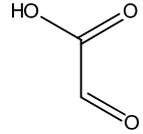
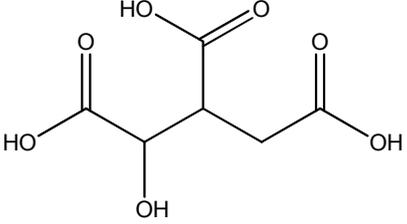
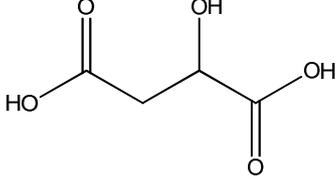
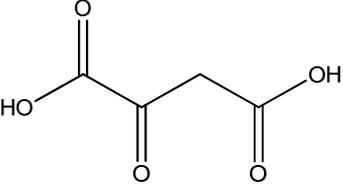
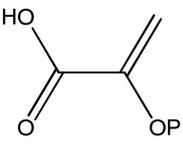
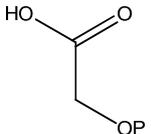
SNIF-NMR	Site-specific Natural Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance
T1	Temps de relaxation longitudinale
T2	Temps de relaxation transversale
TR	Délai de répétition (=AQ + D1)
VPDB	Vienna Pee Dee Belemnite, référence internationale pour l'expression des déviations isotopiques en carbone 13
$\Delta$	Discrimination isotopique (exprimée en ‰)
$\Delta\delta_i^{13}\text{C}$	Ecart entre la déviation isotopique du site i et la moyenne globale de la molécule (exprimé en ‰)
$\Lambda$	Ecart de déviations isotopique entre le site méthylène et le site méthyle dans la molécule d'éthanol (exprimé en ‰)
$\delta$	Déviations isotopique (exprimée en ‰)
$\delta_g^{13}\text{C}$	Déviations isotopique globale d'une molécule
$\delta_i^{13}\text{C}$	Déviations isotopique pour le site i (exprimée en ‰)
$\theta$	Angle de rotation de l'aimantation après une impulsion
v/v	Proportion exprimée en unité de volume par unité de volume
w/v	Proportion exprimée en unité de masse par unité de volume

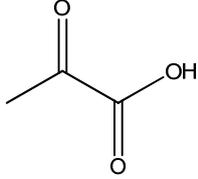
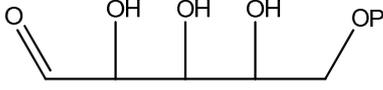
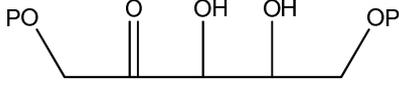
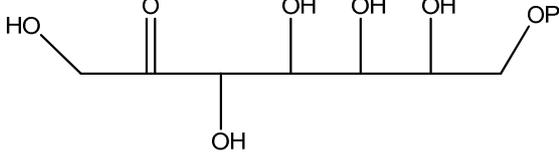
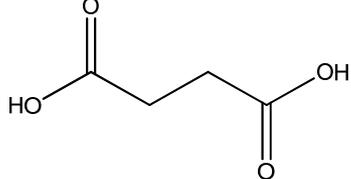
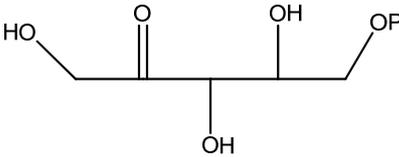
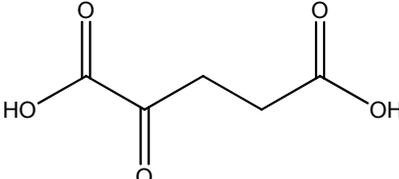
## Abréviations – Produits intervenant dans le métabolisme des glucides

<b>3-PGA</b>	3-phosphoglycérate <sup>a</sup>	
<b>Citrate</b>	Citrate	
<b>DHAP</b>	Dihydroxyacétone phosphate	
<b>E4P</b>	Erythrose-4-phosphate	
<b>F6P</b>	Fructose-6-phosphate	
<b>FBP</b>	Fructose-1,6-bisphosphate	

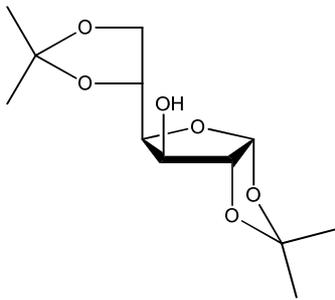
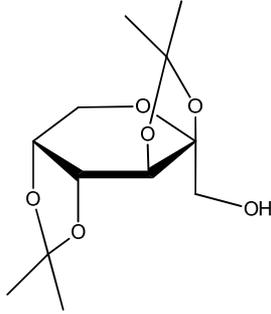
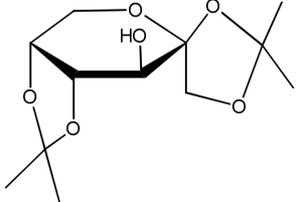
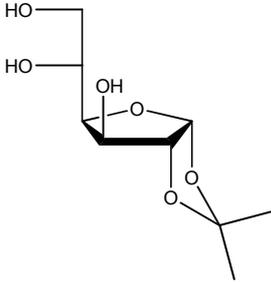
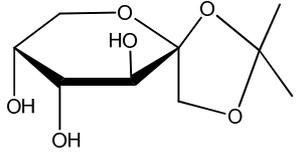
---

<sup>a</sup> Les acides sont présentés sous la forme acide carboxylique bien qu'ils soient aussi présents en réalité sous la forme carboxylate

<b>G3P</b>	Glycéraldéhyde-3-phosphate	
<b>G6P</b>	Glucose-6-phosphate	
<b>glyoxylate</b>	glyoxylate	
<b>Isocitrate</b>	Isocitrate	
<b>Malate</b>	Malate	
<b>OAA</b>	Oxaloacétate	
<b>PEP</b>	Phosphoénolpyruvate	
<b>Phosphoglycolate</b>	Phosphoglycolate	

<b>Pyr</b>	Pyruvate	
<b>R5P</b>	Ribose-5-phosphate	
<b>RuBP</b>	Ribulose-1,5-bisphosphate	
<b>S7P</b>	Sedoheptulose-7-phosphate	
<b>Succinate</b>	Succinate	
<b>X5P</b>	Xylulose-5-phosphate	
<b>α-cétoglutarate</b>	α-cétoglutarate	

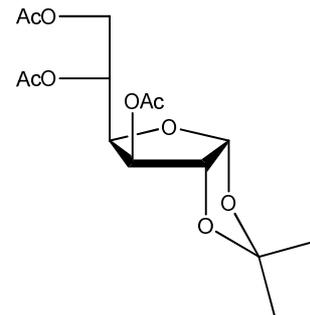
## Abréviations – Produits synthétisés au cours de la thèse

<b>DAGF</b>	1,2;5,6-di- <i>O</i> -isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (DiAcétonide-GlucoFuranose)	
<b>DAFP</b>	2,3;4,5-di- <i>O</i> -isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (DiAcétonide-FructoPyranose)	
<b>DAFP-1,2</b>	1,2;4,5-di- <i>O</i> -isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (1,2 ;4,5-DiAcétonide-FructoPyranose)	
<b>MAGF</b>	1,2- <i>O</i> -isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (MonoAcétonide-GlucoFuranose)	
<b>MAFP-1,2</b>	1,2- <i>O</i> -isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (1,2-MonoAcétonide-FructoPyranose)	

**TAMAGF**

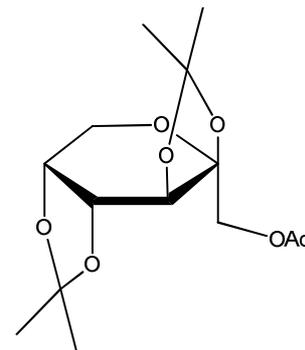
1,2-*O*-isopropylidène-3,5,6-tris-*O*-acétyl- $\alpha$ -D-glucofuranose

(TriAcétylMonoAcétonide-GlucoFuranose)



**MADAFP**

1-*O*-acétyl-2,3 ;4,5-di-*O*-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose



<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE 1 - CONTEXTE DE L'ETUDE : ANALYSES ISOTOPIQUES ET METABOLISME DES GLUCIDES DANS LES PLANTES .....</b>	<b>18</b>
1 INTRODUCTION .....	18
2 ISOTOPES ET ANALYSES ISOTOPIQUES.....	19
2.1 <i>Isotopes : définitions et propriétés</i> .....	19
2.1.1 Isotopes et isotopomères.....	19
2.1.2 Notions et unités .....	19
2.2 <i>Effet isotopique et fractionnement isotopique</i> .....	20
2.2.1 Fractionnement isotopique.....	20
2.2.2 Discrimination isotopique.....	20
2.2.3 Effet isotopique cinétique .....	21
2.2.4 Calcul de l'effet isotopique cinétique au cours d'une réaction .....	22
2.2.5 Effet isotopique d'équilibre .....	22
2.2.6 Estimation de l'effet isotopique à l'équilibre : les $\beta$ -facteurs .....	23
2.3 <i>Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques</i> .....	24
2.4 <i>Résonance Magnétique Nucléaire quantitative</i> .....	24
2.4.1 Principe général .....	24
2.4.2 RMN $^2\text{H}$ quantitative ( $^2\text{H}$ -SNIF-NMR) .....	26
2.4.3 RMN $^{13}\text{C}$ quantitative pour la mesure isotopique .....	27
3 FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE EN $^{13}\text{C}$ LORS DE LA FORMATION ET DE L'UTILISATION DES GLUCIDES DANS LA PLANTE .....	32
3.1 <i>Métabolismes d'assimilation du <math>\text{CO}_2</math></i> .....	33
3.1.1 Métabolisme C3.....	34
3.1.2 Métabolisme C4.....	39
3.1.3 Métabolisme CAM .....	42
3.1.4 Résumé .....	43
3.2 <i>Effets isotopiques au sein du cycle de Calvin</i> .....	44
3.2.1 Distribution intramoléculaire en $^{13}\text{C}$ dans la molécule de glucose .....	44
3.2.2 Cycle de Calvin et effets isotopiques associés.....	47
3.2.3 Modélisation mathématique du fractionnement isotopique au cours de la biosynthèse des glucides.....	51
3.2.4 Indications concernant la différence de distribution isotopique intramoléculaire en $^{13}\text{C}$ du glucose selon le métabolisme d'assimilation du $\text{CO}_2$ .....	52
3.3 <i>Fractionnement isotopique post-photosynthétique</i> .....	55
3.3.1 Transport et distribution du saccharose.....	56
3.3.2 Métabolisme des glucides.....	57

3.3.3	Respiration.....	57
3.3.4	Voie des Pentoses Phosphates .....	59
4	CONCLUSION .....	61
<b>CHAPITRE 2 - CONTRAINTES ET STRATEGIES ASSOCIEES A L'ANALYSE DES SUCRES (GLUCOSE, FRUCTOSE, SACCHAROSE) PAR RMN <sup>13</sup>C ISOTOPIQUE.....</b>		
1	CAHIER DES CHARGES .....	62
1.1	<i>Introduction.....</i>	62
1.2	<i>Rappel des contraintes associées à la mesure RMN <sup>13</sup>C isotopique.....</i>	62
1.3	<i>Exigences associées à la mesure de la distribution isotopique intramoléculaire des sucres (glucose, fructose, saccharose) par RMN <sup>13</sup>C .....</i>	63
1.3.1	Séparation des molécules d'intérêt .....	63
1.3.2	Purification des molécules d'intérêt.....	64
1.3.3	Analyse RMN <sup>13</sup> C des molécules d'intérêt .....	64
1.4	<i>Nécessité de la dérivation des sucres .....</i>	66
2	RESULTATS ET DISCUSSION .....	68
2.1	<i>Analyse directe du saccharose par RMN <sup>13</sup>C .....</i>	68
2.2	<i>Choix de la méthodologie.....</i>	68
2.3	<i>Rendements sur la dérivation.....</i>	69
2.4	<i>Attribution des signaux des dérivés en RMN <sup>13</sup>C.....</i>	70
2.5	<i>Profils d'impuretés.....</i>	71
2.6	<i>Mise au point des conditions d'analyse RMN <sup>13</sup>C et de traitement des spectres.....</i>	73
2.6.1	Temps de relaxation longitudinale T1 <sup>13</sup> C et durée d'expérience pour la mesure RMN <sup>13</sup> C quantitative du MAGF et du DAFP .....	73
2.6.2	Influence du paramètre lb de la fonction d'apodisation de type exponentielle sur l'allure des signaux RMN <sup>13</sup> C .....	74
2.7	<i>Influence des conditions de préparation du MAGF sur l'allure des spectres RMN <sup>13</sup>C.....</i>	75
2.8	<i>Répétabilité .....</i>	76
2.8.1	Répétabilité RMN <sup>13</sup> C.....	76
2.8.2	Répétabilité de synthèse.....	77
3	CONCLUSION .....	78
4	PARTIE EXPERIMENTALE.....	79
4.1	<i>Origine des produits.....</i>	79
4.2	<i>Dérivation .....</i>	79
4.2.1	Première étape : isopropylidénation.....	79
4.2.2	Deuxième étape : hydrolyse.....	79
4.2.3	Purification des produits .....	80
4.3	<i>Analyse RMN <sup>13</sup>C des produits.....</i>	80
4.3.1	Préparation des tubes .....	80

4.3.2	Mesure des temps de relaxation longitudinale .....	80
4.3.3	Paramètres pour l'analyse RMN <sup>13</sup> C.....	81
4.3.4	Traitement des spectres RMN <sup>13</sup> C .....	82
4.3.5	Mesures SMRI.....	82
<b>CHAPITRE 3 -</b>	<b>EFFET ISOTOPIQUE DE DEPLACEMENT CHIMIQUE DU A LA PRESENCE</b>	
<b>D'ATOMES DE DEUTERIUM ECHANGEABLES AU COURS DE L'ANALYSE RMN <sup>13</sup>C DES</b>	<b>PRODUITS .....</b>	<b>84</b>
1	INTRODUCTION .....	84
2	RESULTATS ET DISCUSSION .....	84
2.1	<i>Observations</i> .....	84
2.2	<i>Influence des signaux parasites sur les résultats</i> .....	85
2.3	<i>Mise en évidence d'un effet de substitution isotopique D↔H sur les signaux RMN <sup>13</sup>C des carbones du MAGF portant les fonctions hydroxyles</i> .....	86
3	CONCLUSION .....	90
4	PARTIE EXPERIMENTALE.....	91
4.1	<i>Origine des produits</i> .....	91
4.2	<i>Préparations des échantillons</i> .....	91
4.3	<i>Mesures RMN <sup>13</sup>C</i> .....	91
<b>CHAPITRE 4 -</b>	<b>ANALYSE PAR RMN <sup>13</sup>C SITE-SPECIFIQUE DU GLUCOSE, DU FRUCTOSE ET</b>	
<b>DU SACCHAROSE : MISE EN PLACE ET EVALUATION DU PROTOCOLE ANALYTIQUE.....</b>	<b>92</b>	
1	INTRODUCTION .....	92
2	CHOIX DE LA DERNIERE ETAPE DE DERIVATION .....	93
2.1	<i>Dérivation du MAGF</i> .....	94
2.1.1	Choix de l'agent de dérivation .....	94
2.1.2	Choix des conditions de préparation et des paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup> C.....	95
2.1.3	Répétabilité de la mesure des δ <sub>i</sub> <sup>13</sup> C du TAMAGF par RMN <sup>13</sup> C.....	96
2.1.4	Reproductibilité de la mesure des δ <sub>i</sub> <sup>13</sup> C du TAMAGF par RMN <sup>13</sup> C .....	97
2.2	<i>Dérivation du DAFP</i> .....	99
2.2.1	Choix de l'agent de dérivation .....	99
2.2.2	Choix des conditions de préparation et des paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup> C en fonction des dérivés potentiels .....	100
2.2.3	Répétabilité et reproductibilité RMN <sup>13</sup> C MADAFP .....	102
3	ESTIMATION DU FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE ASSOCIE A LA DERIVATION .....	103
3.1	<i>Répétabilité de synthèse</i> .....	104
3.2	<i>Robustesse de la dérivation en terme de fractionnement isotopique <sup>13</sup>C</i> .....	105
3.2.1	Etape 1 : acétonisation .....	106
3.2.2	Etape 2 : hydrolyse du groupement isopropyldène .....	109

3.2.3	Etape 3 : Acétylation des groupements hydroxyles .....	109
3.2.4	Fractionnement isotopique en <sup>13</sup> C lors de la formation du sous-produit issu du fructose .....	110
4	PREMIERES APPLICATIONS.....	112
5	CONCLUSION .....	114
6	PARTIE EXPERIMENTALE.....	115
6.1	<i>Provenance des produits</i> .....	115
6.2	<i>Dérivation du glucose en DAGF à l'aide de l'acide sulfurique</i> .....	115
6.3	<i>Dérivation du MAGF</i> .....	115
6.3.1	Acétylation du MAGF en TAMAGF (Figure 45).....	115
6.3.2	Acétylation du MAGF en TFAMAGF (Figure 46).....	116
6.3.3	Purification(s) du TAMAGF.....	117
6.4	<i>Dérivations du DAFP</i> .....	117
6.4.1	1- <i>O</i> -Acétyl-2,3,4,5-di- <i>O</i> -isopropylidène-β-D-fructopyranose (Figure 47) .....	117
6.4.2	1- <i>O</i> -TrifluoroAcétyl-2,3,4,5-di- <i>O</i> -isopropylidène-β-D-fructopyranose (Figure 48).....	118
6.4.3	1- <i>O</i> -Propionyl-2,3,4,5-di- <i>O</i> -isopropylidène-β-D-fructopyranose (Figure 49) .....	118
6.5	<i>Analyse RMN <sup>13</sup>C</i> .....	119
6.5.1	Préparation des tubes .....	119
6.5.2	Paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup> C.....	119
6.5.3	Paramètres utilisés pour le lissage .....	120
6.5.4	Mesures SMRI.....	120
<b>CHAPITRE 5 - EVALUATION DE L'IMPACT DES PARAMETRES DU LISSAGE SUR LA JUSTESSE ET LA PRECISION DES MESURES EFFECTUEES PAR RMN <sup>13</sup>C .....</b>		<b>121</b>
1	INTRODUCTION .....	121
2	RESULTATS ET DISCUSSION .....	124
2.1	<i>Critères pour la sélection du mode de lissage</i> .....	124
2.2	<i>Effets de différents paramètres de lissage pour l'obtention des déviations isotopiques sur le MADAFP</i> .....	125
3	CONCLUSION .....	127
<b>CHAPITRE 6 - IMPACTS DE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET METABOLIQUES SUR LA DISTRIBUTION INTRAMOLECULAIRE EN <sup>13</sup>C DU GLUCOSE : UTILISATION DE L'ETHANOL COMME MOLECULE SONDE.....</b>		<b>128</b>
1	INTRODUCTION .....	128
2	RESULTATS ET DISCUSSION .....	129
2.1	<i>L'éthanol comme molécule sonde</i> .....	129
2.1.1	Répétabilité et robustesse associées au processus de fermentation glycolytique .....	130
2.1.2	Correspondance glucose/fructose/saccharose – éthanol.....	133
2.2	<i>Variations intramoléculaires en <sup>13</sup>C de l'éthanol selon l'origine botanique</i> .....	135

2.3	<i>Variations intramoléculaires en <sup>13</sup>C de l'éthanol selon le millésime et l'origine géographique</i>	137
2.3.1	Etude préliminaire qualitative.....	137
2.3.2	Impact de la zone géographique .....	140
2.3.3	Relations entre paramètres isotopiques : $\delta^{13}\text{C}_g$ , $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$ , $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$ de l'éthanol et $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau du vin .....	141
2.3.4	Relations entre paramètres isotopiques et paramètres climatiques .....	144
2.3.5	Discussion sur l'origine des variations observées.....	146
3	CONCLUSION .....	148
4	PARTIE EXPERIMENTALE.....	149
4.1	<i>Produits utilisés</i> .....	149
4.2	<i>Origine des éthanols</i> .....	149
4.3	<i>Analyse RMN <sup>13</sup>C</i> .....	149
4.3.1	Préparation des tubes .....	149
4.3.2	Acquisition .....	149
4.3.3	Traitement.....	150
4.4	<i>Analyse SMRI</i> .....	150

**CHAPITRE 7 - APPLICATION DE LA METHODOLOGIE D'ANALYSE DES SUCRES PAR RMN <sup>13</sup>C ISOTOPIQUE : EVALUATION DE L'OUTIL POUR L'ETUDE DE METABOLISMES ..... 151**

1	INTRODUCTION .....	151
2	ANALYSE D'ÉCHANTILLONS DE GLUCOSES D'AMIDON DE DIVERSES ORIGINES .....	152
2.1	<i>Etude préliminaire : répétabilité associée à l'hydrolyse enzymatique de l'amidon</i> .....	152
2.2	<i>Amidons de plantes à métabolisme C3</i> .....	152
2.3	<i>Amidons de plantes à métabolisme C4</i> .....	154
2.4	<i>Différence de distribution intramoléculaire en <sup>13</sup>C dans le glucose provenant d'amidons C3 et d'amidons C4</i> .....	155
3	ANALYSE D'ÉCHANTILLONS DE SACCHAROSES DE PLANTES A METABOLISME C3 ET C4.....	157
3.1	<i>Mise en évidence d'une différence de distribution isotopique intramoléculaire en carbone 13 entre la partie glucosyle et la partie fructosyle du saccharose</i> .....	158
3.2	<i>Comparaison avec les valeurs obtenues par Rossmann et al . sur un saccharose de betterave .</i>	159
3.3	<i>Influence du métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub> sur la distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C du saccharose</i> .....	160
4	DISCUSSION SUR L'ORIGINE DU FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE EN <sup>13</sup> C OBSERVE SUR LES AMIDONS ET SACCHAROSES DE PLANTES A METABOLISME C3 ET C4 .....	161
4.1	<i>Bilan des échantillons analysés</i> .....	162
4.2	<i>Distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C dans la molécule de saccharose</i> .....	163
4.3	<i>Influence potentielle du métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub></i> .....	163
4.4	<i>Influence potentielle des flux métaboliques et effets isotopiques en <sup>13</sup>C associés</i> .....	164
4.5	<i>Conclusion - perspectives</i> .....	168

5	AMIDON FOLIAIRE .....	168
6	CONCLUSION .....	172
7	PARTIE EXPERIMENTALE.....	173
7.1	<i>Provenance des produits</i> .....	173
7.2	<i>Hydrolyse enzymatique de l'amidon et dérivation du glucose obtenu</i> .....	173
7.3	<i>Analyse RMN <sup>13</sup>C et SMRI</i> .....	173
<b>CHAPITRE 8 - DETERMINATION DES EFFETS ISOTOPIQUES EN <sup>13</sup>C ASSOCIES A LA TRANSFORMATION DU GLUCOSE EN FRUCTOSE PAR LA GLUCOSE ISOMERASE.....</b>		<b>174</b>
1	INTRODUCTION .....	174
2	NECESSITE D'ADAPTATION DE LA METHODE AUX MATRICES ETUDIEES .....	175
2.1	<i>Introduction</i> .....	175
2.2	<i>Choix du protocole pour l'obtention du MAGF pur</i> .....	175
3	RESULTATS : EFFETS ISOTOPIQUES D'EQUILIBRE ET CINETIQUE ASSOCIES A LA GLUCOSE ISOMERASE...	177
3.1	<i>Hypothèse préliminaire</i> .....	177
3.2	<i>Cinétique de la réaction d'isomérisation</i> .....	178
3.3	<i>Détermination de l'effet isotopique à l'équilibre</i> .....	179
3.4	<i>Détermination de l'effet isotopique cinétique lors de la transformation du fructose en glucose</i>	181
4	DISCUSSION ET IMPLICATIONS DES EFFETS ISOTOPIQUES OBSERVES .....	182
5	CONCLUSION .....	184
6	PARTIE EXPERIMENTALE.....	184
6.1	<i>Produits utilisés</i> .....	184
6.2	<i>Expériences Chromatographie Liquide Haute Performance</i> .....	185
6.3	<i>Réaction enzymatique</i> .....	185
6.4	<i>Dérivation – étape de silylation</i> .....	186
6.5	<i>Analyse RMN <sup>13</sup>C</i> .....	187
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>		<b>188</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>191</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>201</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>		<b>207</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>		<b>212</b>
<b>LISTE DES TRAVAUX REALISES PENDANT LA THESE.....</b>		<b>215</b>
	<i>Articles dans des revues disposant d'un comité de lecture</i> .....	215
	<i>Communications dans des congrès</i> .....	215

## INTRODUCTION GENERALE

La teneur en isotopes stables d'un produit renseigne sur son origine. Au niveau de l'étude du métabolisme végétal, l'analyse de la teneur isotopique carbone 13 est utilisée pour comprendre l'allocation du carbone (i) lors du métabolisme primaire d'assimilation du CO<sub>2</sub> pour former les glucides (photosynthèse) [1, 2] et (ii) lors de l'utilisation des glucides dans la plante (processus post-photosynthétiques) [3-5].

La détermination de la teneur isotopique d'un produit est généralement effectuée par Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques (SMRI). Bien que cette technique montre une bonne précision, l'information obtenue est la teneur isotopique globale d'une molécule. La seule technique permettant l'obtention de la teneur isotopique sur chaque site d'une molécule sans dégradation préalable est la Résonance Magnétique Nucléaire quantitative. Cette dernière est utilisée depuis une trentaine d'années pour la détermination du rapport isotopique site-spécifique en deutérium. Depuis quelques années, la RMN du carbone 13 pour la mesure isotopique a été mise au point au laboratoire, permettant d'obtenir la teneur isotopique site-spécifique en <sup>13</sup>C sur une molécule avec une précision satisfaisante.

L'objectif des travaux de la thèse est d'utiliser la RMN <sup>13</sup>C quantitative pour déterminer la teneur isotopique sur chaque site carboné des molécules de glucose, fructose et saccharose, molécules fondamentales dans le métabolisme végétal.

Un premier chapitre bibliographique présente le concept d'analyses isotopiques et le fractionnement isotopique en carbone 13 associé à la formation et à l'utilisation des glucides dans la plante. Ce chapitre décrit le contexte et l'intérêt des travaux de la thèse et sera utile dans l'élaboration d'hypothèses sur les résultats obtenus par RMN <sup>13</sup>C.

Nous aborderons dans un deuxième volet la mise au point d'une méthodologie pour la détermination de la teneur isotopique site-spécifique en carbone 13 dans les molécules de glucose, fructose et saccharose. Cette section comporte en premier lieu un cahier des charges à respecter afin de pouvoir rendre notre analyse possible, et les premiers résultats utilisant la méthodologie (chapitre 2).

Celle-ci a dû être modifiée à cause d'effets de substitution isotopique sur le déplacement chimique en RMN  $^{13}\text{C}$  qui ne permettent pas d'obtenir des valeurs justes et répétables (chapitre 3). La modification de la méthodologie et sa validation sont présentées dans le chapitre 4. La RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique étant une technique relativement récente, une contribution a été apportée à son développement en particulier en terme de traitement du signal pour les molécules étudiées (chapitre 5).

La dernière partie de la thèse (chapitres 6 à 8) porte sur les applications de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique. La première est l'analyse d'éthanol provenant de diverses origines géographiques et botaniques (chapitre 6). Ensuite, la méthodologie mise au point pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  des sucres est employée sur des échantillons d'origines botaniques différentes (chapitre 7). Enfin, la détermination des effets isotopiques en carbone 13 associés à la transformation du glucose en fructose sera présentée (chapitre 8).

# Chapitre 1 - Contexte de l'étude :

## Analyses isotopiques et métabolisme des glucides dans les plantes

### 1 Introduction

L'analyse de la composition isotopique d'un composé permet l'obtention d'informations concernant son origine. En effet, le phénomène de fractionnement isotopique induit une teneur isotopique qui peut être différente selon les processus physiques et/ou chimiques qui ont donné naissance au composé en question, et selon son ou ses précurseurs. L'analyse de la teneur en isotope stable d'un produit, usuellement appelé analyse isotopique, est appliquée dans de nombreux domaines scientifiques : environnement [6], détection de contrefaçons dans l'industrie pharmaceutique [7, 8], détection de fraudes dans l'industrie agro-alimentaire [9, 10], archéologie [11], police scientifique [11, 12].

Dans le domaine du métabolisme végétal, l'étude de la composition isotopique en carbone 13 est utilisée dans des applications telles que la détermination de l'efficacité d'utilisation de l'eau d'une plante (WUE en anglais pour « Water Use Efficiency ») [13], la détermination de certaines propriétés des plantes (conductance du mésophylle au CO<sub>2</sub>, par exemple [14]), ou encore pour étudier le cycle du carbone dans la plante ou au sein d'un écosystème (assimilation du CO<sub>2</sub> atmosphérique et rejet du CO<sub>2</sub> dans le sol *via* la respiration) [3, 15, 16]. Ces études utilisent le fractionnement isotopique en carbone 13 associé à la synthèse et à la dégradation des glucides par les plantes.

Ce chapitre présente (i) les notions essentielles et les techniques utilisées dans le domaine des analyses isotopiques ; (ii) une synthèse des fractionnements isotopiques en carbone 13 associés à la formation des glucides par la photosynthèse et lors des réactions post photosynthétiques impliquant les glucides dans les plantes.

## 2 Isotopes et analyses isotopiques

### 2.1 Isotopes : définitions et propriétés

#### 2.1.1 Isotopes et isotopomères

Deux isotopes d'un même élément chimique possèdent un nombre égal de protons et d'électrons mais diffèrent par leur nombre de neutrons et donc par leur nombre de masse  $A$ . Cette différence de masse leur confère des propriétés réactionnelles différentes qui sont à l'origine du phénomène de fractionnement isotopique.

L'abondance naturelle des éléments lourds est, en général, inférieure ou égale à 1% pour les éléments H, C, N, O et S. Cette abondance naturelle peut varier selon le fractionnement isotopique, un isotopologue<sup>a</sup> donné ( $^{13}\text{CO}_2$  par exemple) réagissant plus ou moins facilement qu'un autre ( $^{12}\text{CO}_2$  par exemple) au cours de processus physicochimiques et/ou enzymatiques.

#### 2.1.2 Notions et unités

L'étude de la répartition isotopique d'une molécule nécessite la définition de certains paramètres. La teneur isotopique s'exprime par :

- Le **rapport isotopique**, qui représente le rapport du nombre de moles de l'élément lourd sur celui de l'élément léger :

$$R = \frac{\text{Lourd}}{\text{léger}} \quad (1)$$

$$\text{exemple : } R(^{13}\text{C}) = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \quad (2)$$

- **L'abondance isotopique** est la fraction molaire de l'élément le plus lourd :

$$A = \frac{\text{Lourd}}{\text{Lourd} + \text{léger}} \quad (3)$$

$$\text{exemple : } A(^{13}\text{C}) = \frac{^{13}\text{C}}{^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}} \quad (4)$$

---

<sup>a</sup> Deux isotopologues diffèrent uniquement par leur composition isotopique (par exemple,  $^{12}\text{CH}_3\text{OH}$  et  $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$  sont des isotopologues du méthanol). Le terme isotopomère définit deux molécules ayant le même nombre d'isotope(s) lourd(s) dans leur structure mais sur des positions différentes (par exemple,  $^{12}\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$  et  $^{13}\text{CH}_3^{12}\text{CH}_2\text{OH}$  sont des isotopomères).

- Les variations de ces deux derniers paramètres étant très faibles, la **composition isotopique  $\delta$**  (exprimée en ‰) est introduite pour étudier ces variations par rapport à un échantillon de référence (pour le  $^{13}\text{C}$ , la référence est le Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) avec  $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$ ) :

$$\delta = \frac{R_{\text{éch}} - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} \times 1000 \quad (5)$$

$$\text{exemple : } \delta(^{13}\text{C}) = \frac{R(^{13}\text{C})_{\text{éch}} - R(^{13}\text{C})_{\text{PDB}}}{R(^{13}\text{C})_{\text{PDB}}} \times 1000 \quad (6)$$

## 2.2 Effet isotopique et fractionnement isotopique

### 2.2.1 Fractionnement isotopique

Le fractionnement isotopique reflète la différence de composition isotopique entre un substrat et le produit qu'il forme. Le fractionnement isotopique lors de la transformation chimique ou physique d'un substrat en produit peut être noté<sup>a</sup> :

$$\alpha = \frac{R_{\text{substrat}}}{R_{\text{produit}}} \quad (7)$$

$R_{\text{substrat}}$  : rapport isotopique du substrat

$R_{\text{produit}}$  : rapport isotopique du produit

Si une réaction favorise un des isotopologues ( $^{12}\text{CO}_2$  par rapport au  $^{13}\text{CO}_2$ , par exemple) mais que cette réaction est totale, le fractionnement isotopique est alors inexistant : le substrat est entièrement transformé en produit et le rapport isotopique du produit formé est celui du substrat utilisé. En revanche, si pour cette même réaction, le substrat n'est pas entièrement consommé, les deux fractions (produit formé et substrat restant) n'auront pas obligatoirement la même teneur isotopique.

### 2.2.2 Discrimination isotopique

Pour des raisons pratiques, un fractionnement isotopique est souvent exprimé à l'aide de la discrimination isotopique ( $\Delta$ , exprimée en ‰). Celle-ci permet une meilleure lisibilité numérique du fractionnement isotopique, celui-ci étant lui-même faible ( $\alpha$  compris entre 0,98

---

<sup>a</sup> Attention : les termes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  peuvent aussi désigner la position du carbone qui subit un effet isotopique (carbone en  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  du centre réactionnel).

et 1,04 environ pour le  $^{13}\text{C}$ ) :

$$\Delta = (\alpha - 1) \times 1000 \quad (8)$$

La discrimination isotopique peut aussi être exprimée comme la différence de déviation isotopique entre un substrat et un produit :

$$\Delta = \frac{\delta_{\text{substrat}} - \delta_{\text{produit}}}{1 + \delta_{\text{produit}}} \quad (9)$$

La grandeur  $\delta_{\text{produit}}$  étant très petite devant 1, la valeur de  $\Delta$  est souvent approximée comme étant égale à :

$$\Delta \approx \delta_{\text{substrat}} - \delta_{\text{produit}} \quad (10)$$

Cette notion peut être utilisée, notamment pour rendre compte du fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  lors du processus de photosynthèse (cf. paragraphe 3).

Le fractionnement isotopique, ou discrimination isotopique, provient de la différence de réactivité entre un isotopologue léger et un isotopologue lourd : ce phénomène est appelé effet isotopique. Il existe des effets isotopiques cinétiques et des effets isotopiques d'équilibre.

### 2.2.3 Effet isotopique cinétique

Lors d'une réaction chimique ou enzymatique, la rupture d'une liaison nécessite un apport d'énergie. Cet apport est dépendant, principalement, de l'énergie de vibration au point zéro de la molécule. Lorsqu'une substitution isotopique est effectuée, la masse de la molécule change, et par là même l'énergie de vibration de la liaison. Lors d'une transformation d'un réactif A en un produit B, impliquant une rupture de liaison C-C, la liaison  $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$  sera plus facile à rompre en terme d'énergie que la liaison  $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ . La constante de vitesse de la rupture de la liaison  $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$  sera donc plus grande que celle de la liaison  $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ . L'effet isotopique cinétique (EIC) est donné par le rapport entre les constantes de vitesse de l'isotopomère léger et de l'isotopomère lourd au cours d'une réaction (rupture de la liaison C-C lors de la transformation de A en B, par exemple). Dans le cas du carbone, l'EIC est donné par :

$$EIC = \frac{k^{12}\text{C}}{k^{13}\text{C}} \quad (11)$$

**k** : constante de vitesse de l'isotopologue considéré

L'effet isotopique EIC peut être assimilé au fractionnement isotopique  $\alpha$  dans le cas où le rapport isotopique du substrat, par exemple, ne varie pas au cours du processus. C'est le cas si l'on considère un réservoir suffisamment grand (exemple : fractionnement isotopique impliquant le  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère pour former les glucides par photosynthèse) [17, 18].

## 2.2.4 Calcul de l'effet isotopique cinétique au cours d'une réaction

En considérant la transformation d'un réactif A en un produit B, et en connaissant (i) le taux d'avancement de cette transformation à un temps t, (ii) le rapport isotopique du réactif au temps t,  $R(A_t)$ , et (iii) le rapport isotopique du réactif de départ  $R(A_0)$ , une extrapolation permet d'obtenir la valeur absolue de l'effet isotopique [19, 20].

$$EIC = \frac{\ln(1-f)}{\ln(1-f) + \ln(R(A_t)/R(A_0))} \quad (12)$$

$R(A_t)$  : Rapport isotopique du réactif A non consommé, à l'instant t

$R(A_0)$  : rapport isotopique du réactif A à l'instant t = 0

EIC : effet isotopique cinétique (=  $^{12}k/^{13}k$ )

f : facteur d'avancement de la réaction ( $f = ([A]_0 - [A]_t)/[A]_0$ )

La relation ci-dessus est l'équation de Rayleigh [19, 20]. Elle est utilisable dans le cas de réactions irréversibles (unidirectionnelles).

## 2.2.5 Effet isotopique d'équilibre

Lors d'un processus physico-chimique réversible, les constantes d'équilibre peuvent être différentes entre deux isotopomères. Le rapport des constantes d'équilibre entre les deux isotopomères lors de ce processus donne la valeur de l'effet isotopique d'équilibre (EIE). Dans le cas du carbone, l'EIE est donné par :

$$EIE = \frac{K^{12}C}{K^{13}C} \quad (13)$$

**K** : constante d'équilibre de l'isotopomère considéré

En règle générale, l'isotope lourd se concentre dans la forme où le nombre de liaisons est élevé [18]. Par exemple lors de l'hydrogénation du dioxyde de carbone en  $\text{HCO}_3^-$ , un effet isotopique inverse<sup>a</sup> de 0,9921 est observé à 25°C [21]. Le carbonate est plus enrichi en carbone 13 que le dioxyde de carbone à l'équilibre. Pour un système à l'équilibre, le facteur de fractionnement isotopique est égal à l'effet isotopique d'équilibre EIE.

---

<sup>a</sup> Un effet isotopique est dit « normal » si  $EI > 1$  et « inverse » si  $EI < 1$

## 2.2.6 Estimation de l'effet isotopique à l'équilibre : les $\beta$ -facteurs

Une estimation de la valeur d'un effet isotopique, au cours d'un processus à l'équilibre, peut être obtenue en utilisant les  $\beta$ -facteurs [22, 23]. Sans rentrer dans les détails, les  $\beta$ -facteurs représentent les propriétés thermodynamiques des noyaux considérés et permettent donc de prévoir l'affinité de l'isotope lourd ( $^{13}\text{C}$  par exemple) pour une molécule ou un site carboné dans cette molécule. Pour un site  $i$  donné dans une molécule, le  $\beta$ -facteur,  $\beta_i$ , est donné par :

$$\beta_i = 1 + \sum_j L_j^n + \sum_k l_k \quad (14)$$

$L_j$  : nombre caractérisant la  $j^{\text{ème}}$  des  $n$  liaisons de l'atome considéré

$L_k$  : nombre caractérisant les liaisons des atomes voisins

Cette relation est une approximation faite par Galimov des équations de Urey et Bigeleisen [24, 25]. Les coefficients  $L_i$  et  $l_k$  ont été calculés pour les liaisons les plus courantes. Les valeurs des coefficients  $L_i$  et  $l_k$  pour les liaisons les plus courantes impliquant les atomes de carbone sont regroupées dans l'Annexe 1. L'effet isotopique à l'équilibre est alors le rapport du  $\beta_i$  de deux composés (A et B, par exemple) à l'équilibre. Le composé ayant le plus grand  $\beta_i$  sera le plus enrichi en  $^{13}\text{C}$  à l'équilibre.

$$EIE = \frac{\beta_{i,A}}{\beta_{i,B}} \quad (15)$$

L'effet isotopique pour la transformation du  $\text{CO}_2$  en carbonate  $\text{HCO}_3^-$  en utilisant cette méthode est de 0,9884 (Annexe 1), ce qui donne une discrimination isotopique de -11,6‰ (le carbonate est enrichi en  $^{13}\text{C}$  de 11,6‰ par rapport au  $\text{CO}_2$ , à l'équilibre). Cette valeur est cohérente avec les données expérimentales (discrimination isotopique de -7,9‰ observée) [21].

Les variations sur le rapport isotopique, dues au phénomène de fractionnement isotopique entre deux composés, sont très faibles (de l'ordre de 50‰ sur l'échelle des déviations isotopiques pour le carbone 13). Dès lors, la détermination des effets isotopiques au cours de processus biochimiques (réactions enzymatiques, par exemple) ou de processus physiques (diffusion, évaporation), implique une précision suffisante sur la détermination de  $R(^{13}\text{C})$ . Cette précision peut être atteinte à l'aide des techniques actuelles qui sont présentées dans les paragraphes suivants.

## 2.3 Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques

La technique la plus couramment utilisée pour la détermination des rapports isotopiques est la Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques (SMRI). Le principe de la SMRI est basé sur l'oxydation d'un échantillon organique ( $C_xH_yO_zN_n$ ) en un gaz ( $CO_2$  pour l'analyse  $^{13}C$ ). Ce gaz subit ensuite une ionisation dans la source et est analysé à l'aide de collecteurs spécifiques. Le rapport des différents isotopomères présents dans ce gaz ( $^{12}C^{16}O^{16}O$  m/z=44 ;  $^{13}C^{16}O^{16}O + ^{12}C^{17}O^{16}O$  m/z = 45 ;  $^{12}C^{18}O^{16}O + ^{13}C^{17}O^{16}O + ^{12}C^{17}O^{17}O$  m/z=46) peut alors être déterminé.

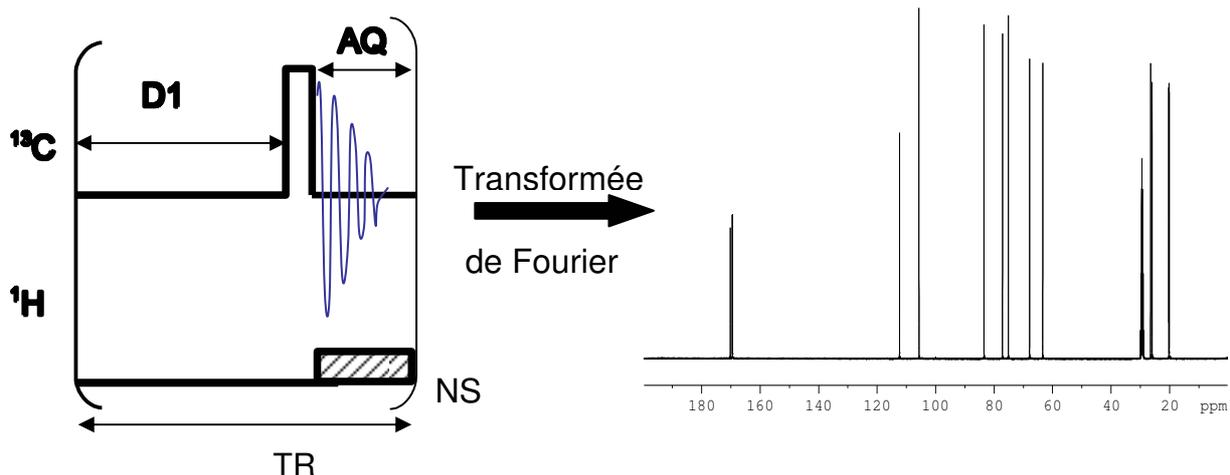
Le principal avantage de cette technique est la faible quantité de produit nécessaire à l'analyse (de l'ordre de 1mg pour une analyse  $^{13}C/^{12}C$ ) et sa précision (0,2‰ sur l'échelle des déviations isotopiques  $\delta$  pour une analyse  $^{13}C/^{12}C$ ). Cependant, l'information obtenue est une information moyenne sur tous les carbones de la molécule étudiée. Sans dégradation préalable et analyse des fragments formés, l'information sur chaque site d'une molécule n'est pas accessible.

## 2.4 Résonance Magnétique Nucléaire quantitative

Depuis les années 1980, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a été développée à des fins de mesure de rapports isotopiques [26, 27]. Cette approche a dans un premier temps été développée sur le deutérium pour s'étendre, beaucoup plus tard, à la détermination du rapport isotopique  $^{13}C/^{12}C$ . L'avantage de cette technique est la possibilité de déterminer les rapports isotopiques sur chaque site d'une molécule.

### 2.4.1 Principe général

Lors d'une expérience RMN mono-impulsionnelle simple, le champ  $B_0$  appliqué à l'échantillon induit l'alignement des spins des noyaux selon  $B_0$  (conventionnellement noté axe z dans un espace xyz). Une impulsion bascule ensuite tous les spins que l'on souhaite observer d'un angle  $\theta$ , et le signal est ensuite recueilli. Le spectre est obtenu après transformation de Fourier du FID (Figure 1). Pour qu'une expérience RMN soit quantitative, il faut que les aires des pics observés après transformation de Fourier soient proportionnelles au nombre de noyaux qui résonnent à la même fréquence.



**Figure 1. Principe de fonctionnement de la RMN quantitative.**

Le spectre est obtenu après transformée de Fourier du signal de précession libre (FID). Il s'agit d'un spectre  $^{13}\text{C}$  découplé du proton avec découplage seulement pendant la durée d'acquisition. D1 : délai de retour à l'équilibre ; AQ : temps d'acquisition pendant lequel le signal est recueilli ; TR : temps de répétition (=AQ + D1) ; NS : nombre d'accumulations.

Selon les équations de Bloch, l'aimantation après un angle de bascule  $\theta$  et un délai de retour à l'équilibre TR est donnée par :

$$\frac{M_{\text{éq.}}}{M_0} = \frac{1 - E_1}{1 - E_1 \cdot \cos \theta} \quad (16)$$

$$\text{et } E_1 = e^{-\frac{TR}{T_1}} \quad (17)$$

$T_1$  : temps de relaxation longitudinal du site concerné

$TR$  : temps de répétition ( $TR = AQ + D1$ )

$M_{\text{éq.}}$  : valeur de l'aimantation après un angle de bascule  $\theta$  et un délai de retour à l'équilibre TR

$M_0$  : valeur de l'aimantation à l'équilibre

$\theta$  : angle de bascule de l'aimantation

L'erreur commise sur la mesure est donnée par  $\varepsilon = 1 - (M_z/M_0) = 1 - E_1$  pour un angle de bascule de  $\pi/2$ . Les différentes valeurs des précisions obtenues pour un angle de bascule de  $\pi/2$  et un rapport TR/T1 donné sont présentées dans le Tableau 1.

**Tableau 1. Erreur sur les mesures en RMN quantitative en fonction du rapport TR/T1 et pour un angle de bascule de l'aimantation de  $\pi/2$ .**

TR/T1	Erreur
3	5%
<b>4,6</b>	<b>1%</b>
5	0,7%
<b>7</b>	<b>0,1%</b>
9	0,01%

Pour une erreur de 1%, le rapport TR/T1 doit être de 4,6. Pour une erreur de 0,1%, le temps de répétition TR doit être égal à 7\*T1 avec T1 le temps de relaxation longitudinale le plus long de la molécule.

#### 2.4.2 RMN $^2\text{H}$ quantitative ( $^2\text{H}$ -SNIF-NMR)

La méthode SNIF-NMR (Site-specific Natural Isotope Fractionation measured by Nuclear Magnetic Resonance) est une méthode basée sur la mesure de l'aire du signal correspondant aux isotopologues monodeutérés d'une molécule. Cette méthode a été mise au point sur la molécule d'éthanol pour la détermination du degré de chaptalisation du vin [28, 29]. Les aires obtenues par RMN dans des conditions quantitatives sont directement proportionnelles à la concentration de l'isotopomère considéré. Le principe de la méthode repose sur la comparaison des aires du produit d'intérêt mesurées en RMN- $^2\text{H}$  avec celles d'une référence interne de D/H connu (déterminé par ailleurs par SMRI) présente dans le tube. La référence utilisée pour la mesure des rapports D/H par RMN est la tétraméthyl urée (TMU). La formule utilisée pour obtenir les rapports D/H d'un site  $i$  dans la molécule d'intérêt est la suivante :

$$\left(\frac{D}{H}\right)_i = \left(\frac{D}{H}\right)_{ref} \cdot \frac{S_i}{S_{ref}} \cdot \frac{P_i}{P_{ref}} \cdot \frac{m_{ref}}{m} \cdot \frac{M}{M_{ref}} \cdot \frac{t_{ref}}{t} \quad (18)$$

$S_i, S_{ref}$  : surface des signaux correspondant au site  $i$  et à la référence

$P_i, P_{ref}$  : nombre de protons équivalents sur le site  $i$  et sur la référence

$m, m_{ref}$  : masses du composé étudié et de la référence introduites dans le tube

$M, M_{ref}$  : masses molaires du composé étudié et de la référence

$t, t_{ref}$  : puretés du composé étudié et de la référence

$(D/H)_i, (D/H)_{ref}$  : rapport D/H du site  $i$  et de la référence

Cette méthode est utilisée pour la détermination du rapport D/H de nombreux composés [30]. Depuis quelques années, le développement de la RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative a été entrepris pour la détermination des rapports  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  sur chaque site d'une molécule. Ce développement nécessite la prise en compte de contraintes spécifiques développées dans le paragraphe suivant.

### 2.4.3 RMN $^{13}\text{C}$ quantitative pour la mesure isotopique

Pour rendre la RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative applicable à la mesure de teneurs isotopiques, il faut s'affranchir de certaines contraintes, différentes de celles connues pour l'analyse par RMN  $^2\text{H}$ . Les différences principales sur ces contraintes sont liées (i) à la gamme de déviations isotopiques en abondance naturelle, induisant des contraintes sur la précision et la justesse requises (ii) aux propriétés intrinsèques des noyaux en RMN (temps de relaxation, largeur spectrale, présence d'effet Overhauser nucléaire, ...) [31, 32].

#### 2.4.3.1 Précision et justesse à atteindre

Avant de mettre en place la RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative, la question de la précision sur la quantité mesurée par cette technique doit être soulevée. La précision souhaitée est régie par la variation des déviations isotopiques en abondance naturelle en  $^{13}\text{C}$ .

Pour le  $^2\text{H}$ , cette gamme est de l'ordre de 500‰ sur l'échelle des déviations isotopiques. De ce fait, la précision désirée sur la technique  $^2\text{H}$ -SNIF-NMR est de l'ordre de 1%. Cette précision est suffisante pour observer les variations en D/H d'une même molécule.

En revanche, pour le  $^{13}\text{C}$ , la gamme de déviations isotopiques en abondance naturelle est de l'ordre de 50‰. Pour observer des variations significatives, une précision et une justesse (ces deux termes seront regroupés par la suite par le terme « exactitude » [33]) de 1‰ est donc requise. Ceci implique des conditions particulières de mesure et de préparation de l'échantillon. La première repose sur le délai de retour à l'équilibre TR. En théorie, une erreur de 1‰ est atteinte avec un TR de  $7 \cdot T_1(^{13}\text{C})$  avec  $T_1(^{13}\text{C})$  le temps de relaxation le plus long de la molécule, pour un angle de bascule de  $\pi/2$  (Tableau 1).

- **Absence de référence interne**

En plus de la contrainte sur le TR citée précédemment, la précision de 1‰ à atteindre rend contraignante l'utilisation d'une référence interne. En effet, pour respecter la condition sur la précision et pour pouvoir utiliser une référence interne (équation 16), les puretés du composé étudié et de la référence doivent être connues avec une exactitude de l'ordre de 0,1%.

De plus, les pesées du composé et de la référence doivent être effectuées dans des conditions permettant une précision de 0,1%. Ces critères sont difficiles à réunir en routine. La stratégie retenue consiste donc en l'utilisation des fractions molaires réduites de la molécule,  $f_i/F_i$ , associées à la teneur globale de la molécule donnée par la SMRI (rappelons que la teneur isotopique globale peut être déterminée par SMRI avec une précision de l'ordre de 0,2‰ sur l'échelle des déviations isotopiques pour une analyse  $^{13}\text{C}$ ). Dans un premier temps, les fractions molaires  $f_i$  sont calculées à partir des surfaces  $S_i$  obtenues par RMN  $^{13}\text{C}$ , puis les fractions molaires statistiques  $F_i$  sont calculées pour chaque site de la molécule :

$$f_i = \frac{S_i}{\sum_n S_i} \quad (19)$$

$$F_i = \frac{P_i}{\sum_n P_i} \quad (20)$$

$S_i$  : surface du site i

$P_i$  : nombre de noyaux résonnant à la fréquence du site i

L'abondance isotopique sur chaque site carboné ( $A_i$ ) peut alors être déterminée en utilisant les fractions molaires réduites, données par la RMN  $^{13}\text{C}$ , et la valeur de l'abondance globale ( $A_g$ ), donnée par la SMRI :

$$A_i = A_g \cdot \frac{f_i}{F_i} \quad (21)$$

A l'aide des équations (2), (4) et (6), l'abondance isotopique permet de déterminer le rapport isotopique  $R_i$  et la déviation isotopique  $\delta_i$  (exprimée en ‰ par rapport au standard international) sur chaque site carboné d'intérêt.

$$R_i = \frac{A_i}{1 - A_i} \quad (22)$$

$$\delta_i = \left( \frac{R_i}{R_{PDB}} - 1 \right) \times 1000$$

- **Influence d'une impureté éventuelle sur les résultats**

Le fait d'effectuer les mesures sans utiliser de référence interne permet de s'affranchir d'une détermination précise de la pureté de l'échantillon analysé et de la masse introduite

dans le tube, car ces deux paramètres ne font pas partie du calcul des déviations isotopiques site-spécifique (cf. paragraphe 2.4.3.1). Cependant, la présence d'une impureté sous un des signaux d'intérêt peut fausser les mesures sur tous les autres sites de cette molécule. En effet, cela provoque une augmentation de l'aire du signal observé et donc une augmentation de l'aire totale (somme des  $S_i$ ). Comme ce paramètre rentre en compte pour le calcul des  $f_i/F_i$ , toutes les autres abondances isotopiques calculées seront affectées par la présence de cette impureté. Il est donc impératif d'établir un profil d'impuretés, en terme de déplacements chimiques RMN  $^{13}\text{C}$ , afin de s'assurer que les éventuelles impuretés présentes dans l'échantillon n'ont pas le même déplacement chimique que les signaux d'intérêt.

- **Rapport signal sur bruit (S/B)**

Une fois les conditions mises au point pour l'analyse d'un produit par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique, le nombre d'accumulations NS (ou nombre de scans) doit être ajusté de manière à obtenir le rapport signal sur bruit (S/B) adapté pour atteindre la précision souhaitée. Le rapport signal sur bruit est proportionnel à la racine du nombre de scans accumulés NS. En théorie, l'erreur relative sur la mesure est donnée par :

$$\frac{\Delta S}{S} \geq \frac{1}{2 \cdot (S/B)} \quad (23)$$

**S** : Surface du pic considéré

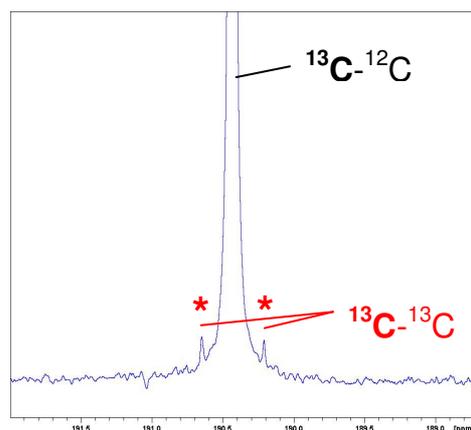
**$\Delta S$**  : erreur maximale sur la détermination de la surface S

**(S/B)** : rapport signal sur bruit

Pour atteindre une précision de 1‰ sur les mesures, un rapport S/B d'au moins 500 doit être obtenu [34].

- **Expression des résultats : influence des raies satellites**

Les isotopologues comportant deux atomes de carbone 13 voisins dans leur structure apparaissent sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  sous la forme d'un doublet, dû à la constante de couplage  $^1J(^{13}\text{C}-^{13}\text{C})$  entre les deux noyaux  $^{13}\text{C}$  voisins (Figure 2). Les deux pics de ce doublet sont situés de part et d'autre du pic central (signal de l'isotopomère ne comportant qu'un seul atome de carbone 13).



**Figure 2. Pics satellites (\*) correspondant au couplage  $^1J(^{13}\text{C}-^{13}\text{C})$  associés à un pic central.**  
Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  est découplé du proton.

Dès lors que la justesse à atteindre est de 1‰, la présence de ces satellites causés par les composés  $^{13}\text{C}_2$  isotopologues (d'environ 1,1‰ par rapport aux composés ne comportant qu'un atome de carbone 13) doit être prise en compte. En effet, négliger ces espèces reviendrait à commettre une erreur de 1,1‰, soit 11‰, sur la valeur de la déviation isotopique obtenue.

La procédure à suivre pour prendre en compte la présence de ces composés consiste à ne pas intégrer les pics satellites lors du lissage mais à les incorporer lors du calcul des fractions molaires réduites pour chaque site. L'aire du signal d'intérêt est multipliée par un facteur  $(1+n \cdot 0,011)$ ,  $n$  étant le nombre de carbones directement liés au carbone d'intérêt. L'intégration de ces satellites par le calcul implique donc une bonne séparation entre le signal d'intérêt et ses satellites, pour que ces derniers ne contribuent pas à l'aire du signal principal.

#### 2.4.3.2 Propriétés intrinsèques du carbone 13 en RMN

L'exactitude sur la mesure requise en RMN  $^{13}\text{C}$  est de l'ordre de 1‰. Les temps de relaxation en  $^{13}\text{C}$  étant plus longs que ceux en  $^2\text{H}$ , le temps d'expérience s'en trouve considérablement augmenté. Cependant, les largeurs de raies à mi-hauteur ( $\Delta\nu_{1/2}$ ) étant inversement proportionnelles au temps de relaxation transversale pour un signal donné (en négligeant les inhomogénéités du champ  $B_0$  appliqué à l'échantillon), les raies observées en  $^{13}\text{C}$  sont généralement plus fines que celle observées en RMN  $^2\text{H}$ . De plus, la gamme de déplacements chimiques est plus grande pour le  $^{13}\text{C}$  (250 ppm pour le  $^{13}\text{C}$  contre 12 ppm pour le  $^2\text{H}$ ). La résolution des signaux sera, *a priori*, plus aisée en RMN  $^{13}\text{C}$ .

Une autre différence fondamentale entre le  $^{13}\text{C}$  et le  $^2\text{H}$  est l'absence d'Effet Overhauser Nucléaire (NOE) pour ce dernier. Cet effet provient d'un transfert de polarisation entre deux noyaux de spin  $\frac{1}{2}$  couplés dipolairement lors de l'irradiation de l'un d'eux (découplage des protons, par exemple). Le noyau de deutérium possède un nombre de spin égal à 1 et n'est donc pas soumis au NOE. En revanche, quand un spectre  $^{13}\text{C}$  (spin  $\frac{1}{2}$ ) est découplé  $^1\text{H}$  (spin  $\frac{1}{2}$ ), les aires des signaux  $^{13}\text{C}$  peuvent être modifiées par cet effet. La modification apportée par le NOE n'étant pas la même pour tous les signaux, la mesure effectuée dans ces conditions n'est donc plus quantitative. Dans la séquence classique utilisée en RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique, pour s'affranchir du NOE mis en place lors de l'irradiation des protons, le découplage n'est effectué que pendant la durée d'acquisition AQ. Pour une mesure quantitative, le délai AQ ne devra donc pas être trop long afin de limiter l'apparition du NOE ( $\text{AQ} < \text{T}_1(^{13}\text{C})$  le plus court de la molécule).

En théorie, le délai TR à respecter doit être de l'ordre de  $7 \cdot \text{T}_1(^{13}\text{C})$  pour obtenir une précision de 1‰ sur les mesures (Tableau 1). Cependant, le NOE mis en place pendant l'acquisition doit être dissipé avant la prochaine bascule de l'aimantation, c'est-à-dire à la fin du délai D1. Le délai TR choisi doit prendre en compte cet aspect et devra donc être de  $10 \cdot \text{T}_1(^{13}\text{C})$  avec  $\text{T}_1(^{13}\text{C})$  le temps de relaxation longitudinale le plus long de la molécule.

Pour être dans des conditions quantitatives, le découplage réalisé pendant l'acquisition doit être le plus homogène et efficace possible sur toute la gamme de protons irradiée. Ces deux critères (homogénéité et efficacité du découplage  $^1\text{H}$ ) ont été un des points les plus délicats lors de la mise en place de la RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative à des fins de mesure isotopique. Une séquence d'impulsions adiabatiques pour le découplage a été développée afin répondre à ces deux critères [35].

La RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique a été mise en place au laboratoire et est actuellement utilisée sur diverses molécules (vanilline [36], paracétamol [8], ...). La répétabilité à long terme de cette technique a été évaluée sur les molécules d'éthanol et de vanilline [37]. L'écart type est de 1‰ sur la vanilline et de 0,2‰ sur l'éthanol (sur l'échelle des déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$ ). Les écarts types sont en accord avec les exigences requises sur la précision (cf. paragraphe 2.3.3.1).

Cette technique apporte une information supplémentaire par rapport à la SMRI puisque le rapport isotopique peut être déterminé sur tous les sites carbonés d'une molécule, à condition que les signaux soient suffisamment séparés pour être quantifiés. Elle constitue

donc un outil puissant que ce soit pour l'authentification de molécules naturelles [34, 36], l'étude de métabolismes [38], ou encore la détection de contrefaçons dans l'industrie pharmaceutique [8].

### **3 Fractionnement isotopique en $^{13}\text{C}$ lors de la formation et de l'utilisation des glucides dans la plante**

Ce paragraphe présente une synthèse des effets isotopiques associés à la formation et à l'utilisation des glucides chez les végétaux.

Les glucides sont formés dans la plante grâce à la photosynthèse. Ce processus se déroule dans le chloroplaste des feuilles et peut se diviser en deux phases :

- La phase dite claire permet de régénérer de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) et du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous forme réduite (NADPH) à partir d'eau et d'énergie lumineuse ;
- La phase dite sombre utilise l'ATP et le NADPH formés lors de la phase claire pour réduire le  $\text{CO}_2$  en glucides.

Les glucides formés lors de la photosynthèse sont ensuite exportés vers les autres organes pour servir de réserves d'énergie ou pour être transformés en métabolites nécessaires au développement de la plante (acides aminés, lipides, protéines, ...).

La phase claire ne sera pas traitée ici. En revanche, les points importants concernant le fractionnement isotopique associé aux processus de formation des glucides (phase sombre) et de leur utilisation (réactions post-photosynthétiques) seront abordés.

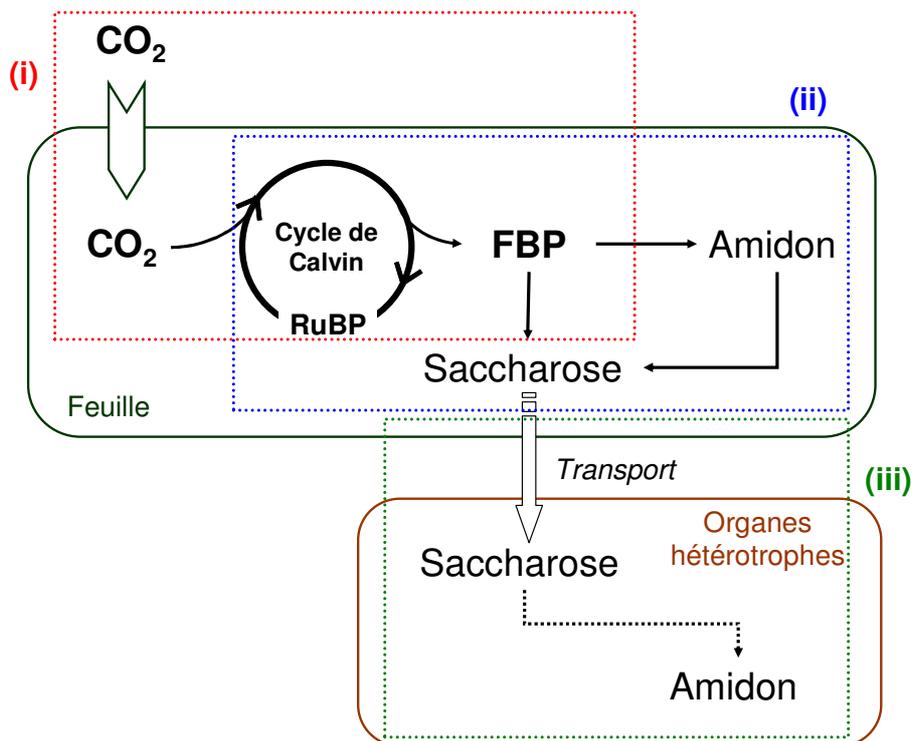
Nous traiterons le fractionnement isotopique associé à la formation et à l'utilisation des glucides dans la plante en trois parties (Figure 3).

(i) Dans un premier temps, le  $\text{CO}_2$  est assimilé par la feuille puis carboxylé par une enzyme, la Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygénase (Rubisco). Les trois types d'assimilation ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  et CAM) et leurs différents fractionnements isotopiques conduisent à des glucides ayant des signatures isotopiques caractéristiques en carbone 13.

(ii) Le  $\text{CO}_2$  assimilé à l'étape précédente sert ensuite à la carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) pour former le fructose-1,6-bisphosphate (FBP) *via* le 3-phosphoglycérate (3-PGA). Sur six molécules de FBP formées, une seule servira à la synthèse des glucides (glucose, amidon, saccharose, ...), les cinq autres servant à la régénération du

substrat RuBP pour son utilisation dans un nouveau cycle. Ce cycle, impliquant à la fois la formation du FBP et la régénération du RuBP est appelé cycle de Calvin-Benson-Bassham ou cycle de Calvin.

(iii) Enfin, dans un troisième temps, les glucides formés sont exportés à travers la sève vers les organes hétérotrophes<sup>a</sup> (racines, tiges, par exemple) pour leur servir (i) de réserve glucidique, et donc d'énergie, (ii) de métabolites de structure comme la cellulose, (iii) de matière première pour la formation des acides aminés, des protéines et des lipides.



**Figure 3. Schéma très simplifié de la formation des glucides et de leur utilisation et transport dans la plante.**

FBP : Fructose-1,6-BisPhosphate. Les chiffres entre parenthèses indiquent les différentes parties abordées dans ce chapitre.

### 3.1 Métabolismes d'assimilation du CO<sub>2</sub>

Il existe trois types de fixation du CO<sub>2</sub> chez les plantes terrestres : le métabolisme C3 (parmi les plantes utilisant ce métabolisme figurent le blé, la pomme de terre, la betterave), le métabolisme C4 (maïs, canne à sucre, sorgho...) et le Métabolisme Acide Crassulacéen, CAM (ananas, vanillier, agave...). Quelque soit le métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub>, les

<sup>a</sup> Les organes hétérotrophes ne sont pas capables de synthétiser des glucides à partir du CO<sub>2</sub> par photosynthèse ; ils utilisent les glucides formés par les organes autotrophes (feuilles).

glucides formés par photosynthèse sont appauvris en  $^{13}\text{C}$  par rapport au  $\text{CO}_2$  atmosphérique ( $\delta^{13}\text{C}$  de  $-10\text{‰}$  à  $-30\text{‰}$  pour les glucides contre  $-8\text{‰}$  pour le  $\text{CO}_2$  atmosphérique). Ce fractionnement est lié aux enzymes qui catalysent l'assimilation du  $\text{CO}_2$  atmosphérique et peut être différent selon le métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  utilisé par la plante (C3, C4 ou CAM). Les glucides formés auront alors une signature isotopique globale en carbone 13 caractéristique du métabolisme d'assimilation [1, 39]. Les mesures du fractionnement isotopique lors de la photosynthèse sont effectuées par SMRI soit sur la matière organique formée par ce processus (discrimination à long terme), soit par mesure du rapport isotopique du  $\text{CO}_2$  restant dans une atmosphère contrôlée (mesure instantanée, dite « en ligne »).

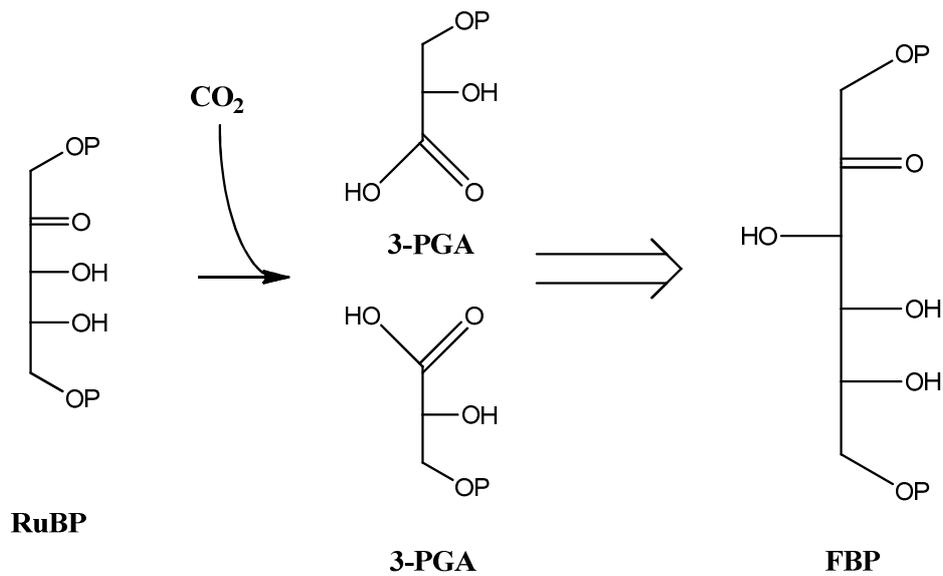
### 3.1.1 Métabolisme C3

Les plantes à métabolisme C3 sont les premières apparues sur Terre. Elles représentent aujourd'hui environ 90% de la flore terrestre totale. La discrimination isotopique moyenne  $\Delta^{13}\text{C}$  lors de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  *via* le métabolisme C3 est de l'ordre de 20‰ environ. La déviation isotopique du  $\text{CO}_2$  atmosphérique étant de  $-8\text{‰}$ , la photosynthèse, chez les plantes à métabolisme C3 conduit une déviation isotopique  $\delta^{13}\text{C}$  de  $-28\text{‰}$  sur les glucides formés.

- **Assimilation du  $\text{CO}_2$**

La fixation du  $\text{CO}_2$ , chez les plantes à métabolisme C3, se fait dans un premier temps par diffusion du  $\text{CO}_2$  atmosphérique à travers les stomates, orifices qui permettent de réguler les échanges gazeux entre la feuille et l'atmosphère. La diffusion du  $\text{CO}_2$  à travers les stomates est associée à un effet isotopique de 1,0044 (discrimination isotopique de 4,4‰) [40]. Le RuBP est ensuite carboxylé par la Rubisco qui utilise le  $\text{CO}_2$  acheminé à l'étape précédente pour former deux molécules de 3-phosphoglycérate, 3-PGA, premier composé du cycle de Calvin (Figure 4). La carboxylation du  $\text{CO}_2$  par la Rubisco s'accompagne d'un effet isotopique de 1,029 (discrimination isotopique de 29‰) [41]. C'est du composé à 3 carbones (le 3-PGA), formé après assimilation du  $\text{CO}_2$  atmosphérique, que provient le terme de plantes en C3. Les molécules de 3-PGA formées sont les précurseurs du fructose-1,6-bisphosphate FBP dans le cycle de Calvin qui sera abordé dans le paragraphe 3.2.

Les discriminations isotopiques associées à la diffusion et à la carboxylation du  $\text{CO}_2$  atmosphérique sont toutes deux positives (4,4‰ et 29‰, respectivement). La matière organique produite par les plantes C3 lors de la photosynthèse sera donc appauvrie en carbone 13 par rapport au  $\text{CO}_2$  de l'air. Cet appauvrissement dépend de l'implication du  $\text{CO}_2$  dans chacun des processus (diffusion et carboxylation).



**Figure 4. Carboxylation du CO<sub>2</sub> sur le Ribulose-1,5-bisphosphate catalysée par la Rubisco.**

Les 2 molécules de 3-PGA formées sont transformées en FBP dans le cycle de Calvin.

Farquhar *et al.* (1982) [2] ont élaboré un modèle mathématique permettant de prévoir la discrimination isotopique associée à l'assimilation du CO<sub>2</sub> pour les plantes en C3 en fonction des paramètres C<sub>i</sub> et C<sub>a</sub>, représentant la fraction molaire en CO<sub>2</sub> dans les espaces intercellulaires de la feuille et dans l'atmosphère respectivement (Figure 5) :

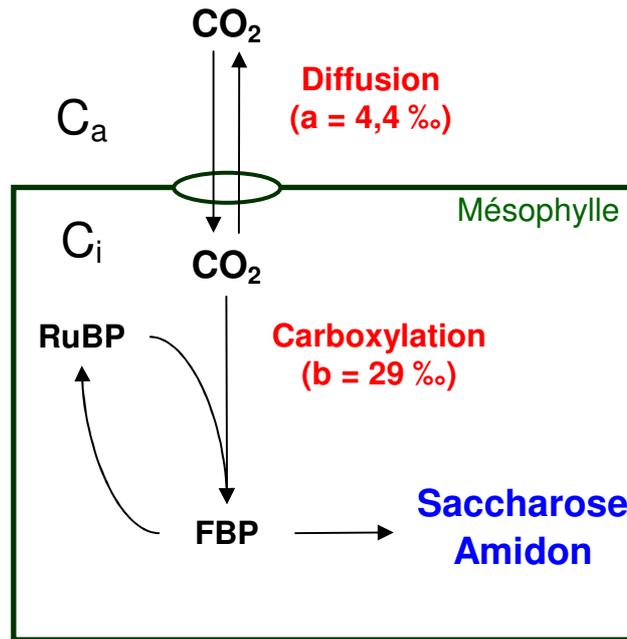
$$\Delta^{13}\text{C} = a + (b - a) \frac{C_i}{C_a} \quad (24)$$

$$\text{avec } \Delta^{13}\text{C} \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} - \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_{\text{assimilé}}} \quad (25)$$

$\Delta^{13}\text{C}$  : discrimination isotopique en carbone 13 entre le CO<sub>2</sub> atmosphérique et les composés synthétisés suite à la fixation de ce CO<sub>2</sub> par la plante ;

**a** : discrimination isotopique lors de la diffusion du CO<sub>2</sub> de l'atmosphère vers les espaces intercellulaires de la feuille (4,4 ‰) ;

**b** : discrimination isotopique associée à la carboxylation du RuBP par le CO<sub>2</sub> catalysée par la Rubisco (29 ‰).



**Figure 5. Schéma simplifié de la discrimination isotopique en carbone 13 au cours de la fixation du CO<sub>2</sub> chez les plantes en C<sub>3</sub>.**

RuBP : Ribulose-1,5-bisphosphate ; FBP : Fructose-1,6-bisphosphate ; a : discrimination isotopique due à la diffusion du CO<sub>2</sub> atmosphérique vers les cellules du mésophylle (4,4‰) ; b : discrimination isotopique due à carboxylation par la Rubisco (29‰) ; C<sub>i</sub>, C<sub>a</sub> : fractions molaires en CO<sub>2</sub> à l'intérieur des cellules et dans l'atmosphère, respectivement.

Les termes a et b étant des constantes, les fractions molaires interne et externe en CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub> et C<sub>a</sub>) sont les seuls paramètres à jouer un rôle significatif sur la discrimination isotopique des plantes C<sub>3</sub> pendant la photosynthèse. Le rapport C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> augmente avec l'ouverture des stomates et la diminution de l'activité enzymatique de la Rubisco.

A titre d'exemple, lorsque la plante subit un stress hydrique, les stomates ont tendance à se fermer ce qui permet de limiter l'évaporation de l'eau, diminuant ainsi la concentration en CO<sub>2</sub> dans les espaces intercellulaires de la feuille (C<sub>i</sub>). La discrimination isotopique Δ<sup>13</sup>C attendue pour les deux valeurs extrêmes de C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> lors d'un stress hydrique inexistant (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> = 1, correspondant à une ouverture totale des stomates) ou lors d'un stress hydrique maximum (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> tend vers 0, correspondant à la fermeture totale des stomates) est de 29‰ et 4,4‰, conduisant à des valeurs de déviations isotopiques δ<sup>13</sup>C sur les glucides formés de -37‰ et -12,4‰, respectivement (Tableau 2).

**Tableau 2. Valeurs de la discrimination isotopique  $\Delta^{13}\text{C}$  et de la déviation isotopique  $\delta^{13}\text{C}$  chez les plantes en C3 en fonction du rapport des fractions molaires en  $\text{CO}_2$  à l'intérieur de la feuille ( $\text{C}_i$ ) et dans l'atmosphère ( $\text{C}_a$ ).**

$\text{C}_i/\text{C}_a^a$	Discrimination isotopique <sup>b</sup>	Déviation isotopique
	$\Delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
0	4,4	-12,4
0,4	14	-22
0,7	22	-30
1	29	-37

<sup>a</sup> Les valeurs des déviations isotopiques mesurées chez les plantes en C3 correspondent à un rapport  $\text{C}_i/\text{C}_a$  compris entre 0,4 et 0,7.

<sup>b</sup> Différence de déviation isotopique entre le  $\text{CO}_2$  atmosphérique (dont la composition isotopique en  $^{13}\text{C}$  est de -8‰) et le carbone assimilé par la plante (sous forme de glucides).

*In vivo*, ces valeurs de  $\text{C}_i/\text{C}_a$  ne sont jamais réellement atteintes, et les valeurs des  $\delta^{13}\text{C}$  de la matière organique des plantes en C3 s'échelonnent de -22 ‰ à -30 ‰, ce qui correspond à des valeurs de  $\text{C}_i/\text{C}_a$  égales à 0,4 et 0,7, respectivement (Tableau 2).

Le modèle présenté dans ce paragraphe est très utilisé en physiologie végétale, notamment pour évaluer l'efficacité de l'utilisation de l'eau (WUE pour *Water Use Efficiency*, c'est-à-dire le rapport *biomasse produite/eau consommée*) mais aussi la conductance du mésophylle au  $\text{CO}_2$  des plantes en C3[13]. Cependant, c'est un modèle simplifié qui ne prend pas en compte le fractionnement isotopique associé aux phénomènes de respiration et photorespiration.

- **Utilisation du dioxygène par la Rubisco : la photorespiration**

La photorespiration est liée à l'activité Oxygénase de la Rubisco. Cette enzyme peut en effet fixer une molécule de  $\text{O}_2$  à la place du  $\text{CO}_2$  sur le RuBP. Une fois cette molécule fixée, une molécule de 3-phosphoglycerate (3-PGA) et une molécule de 2-phosphoglycolate sont formées (Figure 6). La première est métabolisée dans le cycle de Calvin directement alors que la seconde subit plusieurs transformations avant de réintégrer le cycle de Calvin sous forme de 3-PGA.

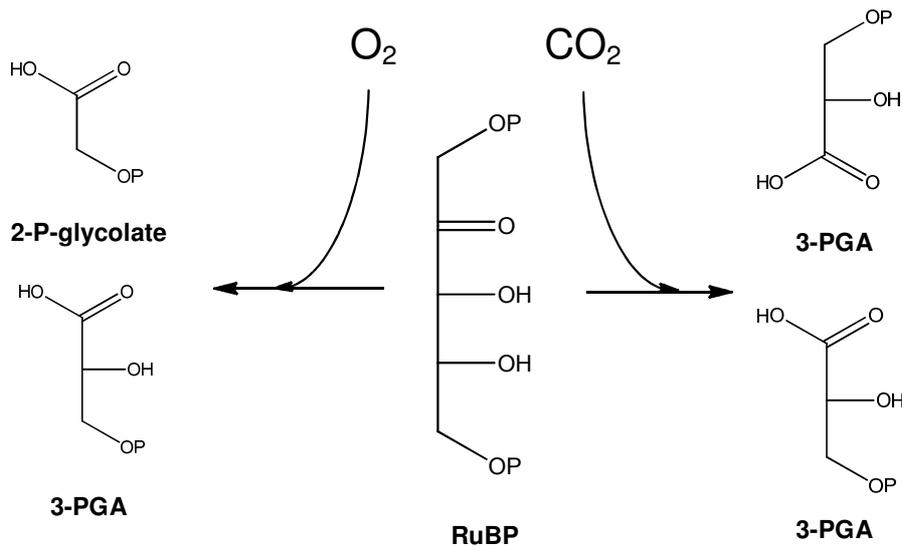


Figure 6. Schéma des deux modes d'action possibles de la Rubisco : oxygénase (à gauche) et carboxylase (à droite).

3-PGA : 3-phosphoglycérate; RuBP : ribulose-1,5-bisphosphate.

Une fois formée, la molécule de 2-phosphoglycolate est transportée dans le peroxisome pour être transformée en glycine. Cette dernière est alors transportée dans la mitochondrie puis transformée en sérine avec une perte d'ammoniac et de  $CO_2$  (Figure 7). Ce phénomène nécessite de l'énergie lumineuse et du dioxygène pour former du  $CO_2$ , d'où le nom de photorespiration.

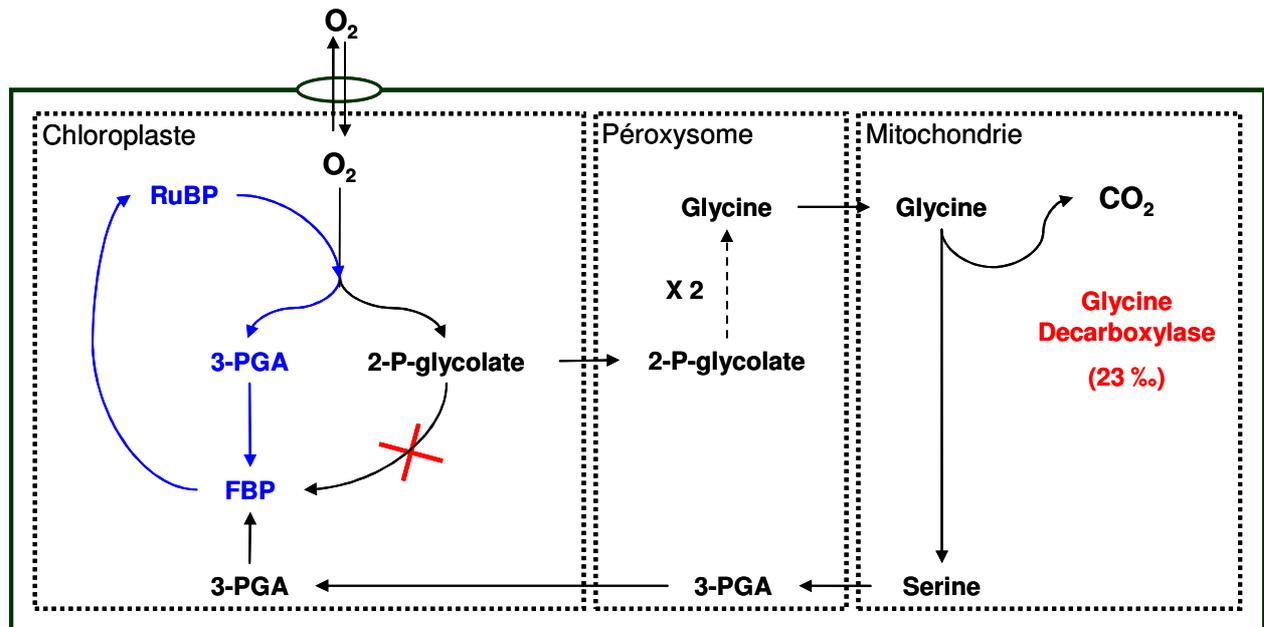


Figure 7. Utilisation du dioxygène par la Rubisco (photorespiration).

3-PGA : 3-phosphoglycérate ; FBP : fructose-1,6-bisphosphate ; RuBP : ribulose-1,5-bisphosphate.

Le principal fractionnement isotopique associé à la photorespiration est la décarboxylation de la glycine par la glycine décarboxylase. Les mesures effectuées *in vivo* par des échanges gazeux indiquent un effet isotopique normal de 1.023 [3]. Récemment, une étude théorique a permis de mettre en évidence le fait que l'effet isotopique de la glycine décarboxylase est la cause principale de la discrimination isotopique associée à la photorespiration et que cet effet isotopique devrait être de l'ordre de 1.022 [42] : le CO<sub>2</sub> dégagé par photorespiration est donc appauvri par rapport à la glycine. En d'autres termes, plus le taux de photorespiration augmente, plus la glycine, et par là même la matière organique de la plante, s'enrichit en <sup>13</sup>C.

La respiration, utilisation de dioxygène et de glucides pour former du CO<sub>2</sub> et de l'énergie, se passe quant à elle dans les mitochondries et ne nécessite pas de lumière. Elle sera abordée dans la partie concernant le fractionnement isotopique post-photosynthétique (paragraphe 3.3).

### 3.1.2 Métabolisme C4

Les plantes en C4 sont en général appauvries en <sup>13</sup>C par rapport au CO<sub>2</sub> atmosphérique mais d'une manière moindre que les plantes en C3 (discrimination isotopique  $\Delta^{13}\text{C}$  de 3‰ en moyenne contre 20‰ pour les plantes en C3). La fixation du gaz carbonique chez les plantes en C4 s'effectue en deux étapes, chacune se déroulant dans deux compartiments différents de la feuille. La première est la fixation du CO<sub>2</sub> sur un composé à trois carbones, le phosphoénolpyruvate (PEP), réaction catalysée par la phosphoénolpyruvate Carboxylase (PEPCase ou PEPC) dans les cellules du mésophylle (Annexe 2 ; Figure 8). Cette première étape permet la formation de malate (composé à 4 carbones, d'où le nom de C4) qui est transporté dans les cellules de la gaine périvasculaire.

La deuxième étape a lieu dans les cellules de la gaine périvasculaire et comprend la décarboxylation du malate en pyruvate et CO<sub>2</sub> puis la fixation de ce CO<sub>2</sub> par la Rubisco sur le RuBP (première étape du cycle de Calvin).

Ce type de plantes est apparu il y a 25 à 30 millions d'années, quand la teneur en CO<sub>2</sub> de l'atmosphère a diminué. Un rapport [O<sub>2</sub>]/[CO<sub>2</sub>] élevé amène les plantes C3 à un taux de photorespiration élevé et donc à une perte du rendement de la photosynthèse. La séparation spatiale entre fixation du CO<sub>2</sub> par la PEPC (mésophylle) et carboxylation du RuBP par la Rubisco (gaine périvasculaire) est un avantage pour ce type de plantes puisqu'elle permet de limiter, voire annuler la photorespiration. En effet, la première enzyme qui va fixer le CO<sub>2</sub> de

l'air, la PEPCase, ne possède pas d'activité oxygénase et la forte concentration en CO<sub>2</sub> dans la gaine périvasculaire favorise l'activité carboxylase de la Rubisco par rapport à l'activité oxygénase [43].

### 3.1.2.1 Discrimination dans les cellules du mésophylle (1ère étape)

La réaction formation du malate par carboxylation du PEP chez les plantes en C4 nécessite :

- (i) la solubilisation du CO<sub>2</sub> gazeux en CO<sub>2</sub> aqueux (discrimination isotopique de 1,1‰) ;
- (ii) l'hydratation du CO<sub>2</sub> aqueux en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, substrat pour la PEPCase (discrimination isotopique de -9‰ : le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est enrichi de 9‰ par rapport au CO<sub>2</sub> à l'équilibre). La discrimination Δ sur les deux premières étapes est donc de -7,9‰ ;
- (iii) la transformation du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en Acide Oxaloacétique OAA, catalysée par la PEPCase, induisant une discrimination de 2,2‰ environ.

La discrimination isotopique globale lors de la fixation du CO<sub>2</sub> dans les cellules du mésophylle est donc de -5,7‰. Cette réaction correspond à CO<sub>2, atmosphérique</sub> → OAA (C4). La valeur négative de la discrimination indique que le produit final au cours de la carboxylation dans les cellules du mésophylle est enrichi en <sup>13</sup>C par rapport au CO<sub>2</sub> atmosphérique.

### 3.1.2.2 Discrimination dans les cellules de la gaine fasciculaire (2ème étape)

Le malate formé pendant la première étape est transporté dans la gaine périvasculaire puis décarboxylé pour former du pyruvate et une molécule de CO<sub>2</sub>. La deuxième étape consiste en la fixation de cette molécule de CO<sub>2</sub> sur le RuBP par la Rubisco. Si la gaine périvasculaire était parfaitement étanche, le CO<sub>2</sub> contenu dans celle-ci serait entièrement fixé par la Rubisco : il n'y aurait alors pas de fractionnement isotopique et le FBP formé serait enrichi de 5,7‰ par rapport au CO<sub>2</sub> atmosphérique. Cependant, les cellules de la gaine périvasculaire ne sont pas complètement imperméables au CO<sub>2</sub> et une certaine quantité peut s'échapper pour rejoindre le mésophylle, permettant alors à la Rubisco de discriminer entre les isotopologues <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> et <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> [44, 45].

De même que pour les plantes à métabolisme C3, une équation a été proposée permettant de modéliser la discrimination isotopique globale chez les plantes C4 au cours de la photosynthèse [45] (Figure 8) :

$$\Delta = a + (b + \Phi(b_3 - s) - a) \frac{C_i}{C_a} \quad (26)$$

$$\text{avec } \Delta^{13}C \approx \delta^{13}C_{CO_2} - \delta^{13}C_{C_{\text{assimilé}}} \quad (27)$$

**a** : discrimination due à la diffusion du CO<sub>2</sub> de l'air vers l'espace intercellulaire des cellules

**b** : discrimination due à la fixation du CO<sub>2</sub> sur le PEP pour former le malate (-5,7 ‰)

**Φ** : proportion de CO<sub>2</sub> perdu dans les cellules de la gaine périvasculaire

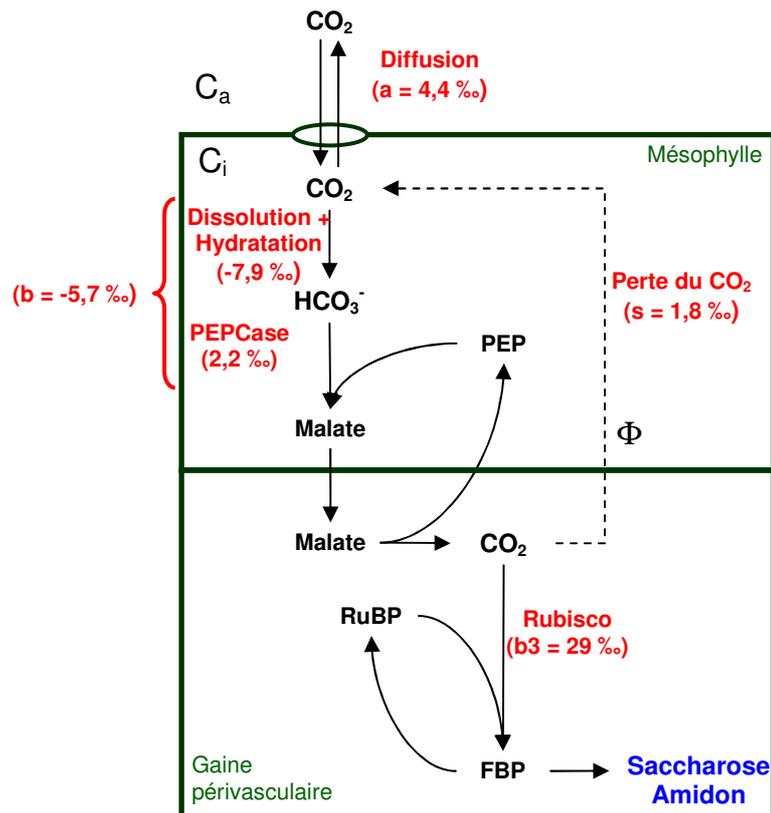
**b<sub>3</sub>** : fractionnement dû à la carboxylation par la Rubisco (29 ‰)

**s** : fractionnement pendant la perte de CO<sub>2</sub> dans la gaine périvasculaire (1,8 ‰)

**C<sub>i</sub>** : fraction molaire en CO<sub>2</sub> dans les espaces intercellulaires

**C<sub>a</sub>** : fraction molaire en CO<sub>2</sub> à l'endroit de la carboxylation

La discrimination isotopique en fonction de C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> est, dans ce cas, dépendante de la proportion de perte de CO<sub>2</sub>, Φ, et du fractionnement lors de cette étape, s.



**Figure 8. Schéma simplifié de la discrimination isotopique au cours de la fixation du CO<sub>2</sub> par les plantes en C4.**

PEPCase : phosphoénolpyruvate carboxylase ; PEP : phosphénolpyruvate ; RuBP : Ribulose-1,5-bisphosphate ; FBP : Fructose-1,6-bisphosphate ; a : discrimination isotopique due à la diffusion du CO<sub>2</sub> atmosphérique vers les cellules du mésophylle (4,4‰) ; b3 : discrimination isotopique due à la carboxylation par la Rubisco (29 ‰) ; b discrimination due à l'hydratation du CO<sub>2</sub> et à la fixation par la PEPCase (-5,7 ‰) ; s : discrimination isotopique due à la perte de CO<sub>2</sub> de la gaine périvasculaire (1,8 ‰) ; Φ proportion de CO<sub>2</sub> perdu dans la gaine périvasculaire ; C<sub>i</sub>, C<sub>a</sub> : fractions molaires en CO<sub>2</sub> à l'intérieur des cellules et dans l'atmosphère, respectivement.

### 3.1.3 Métabolisme CAM

Les plantes CAM sont les mieux adaptées aux environnements secs et chauds. Là où les plantes C4 effectuent une séparation spatiale entre les deux types de fixation (PEPCase dans les cellules du mésophylle et Rubisco dans les cellules de la gaine périvasculaire), les plantes CAM effectuent cette séparation, mais d'une manière temporelle. Une première approximation permet de dire que les plantes CAM fonctionnent comme les plantes C4 la nuit et comme les C3 le jour. Les valeurs de déviations isotopiques de la matière organique des plantes CAM sont intermédiaires entre celles des plantes en C4 et celles des plantes en C3 ( $\delta^{13}\text{C}(\text{CAM}) = -15\text{‰}$  environ) [46, 47]. Le mécanisme CAM peut se diviser en quatre phases [47].

La première phase (phase I) se déroule pendant la nuit. Les stomates sont alors ouverts, permettant au  $\text{CO}_2$  de diffuser jusqu'aux sites de carboxylation où il va être transformé en  $\text{HCO}_3^-$  puis en oxaloacétate par la PEPCase (cycle C4). Le malate formé est alors stocké dans la vacuole, compartiment de stockage du malate présent dans la cellule. Au lever du jour (phase II), les stomates se ferment et le malate est décarboxylé en pyruvate après avoir été exporté de la vacuole. Le  $\text{CO}_2$  formé par la décarboxylation du malate est fixé sur le RuBP par la Rubisco dans le cycle de Calvin (phase III). En fin de journée (phase IV), le  $\text{CO}_2$  provenant de la décarboxylation du malate est totalement transformé. Lors de ce processus, le PEP est régénéré. Pendant les phases II et IV, les stomates peuvent être ouverts et laisser diffuser le  $\text{CO}_2$  dans la feuille ; la Rubisco peut être active et l'énergie lumineuse suffisante pour pouvoir le fixer sur le RuBP afin de former le FBP (cycle de Calvin), ce qui explique en partie l'appauvrissement plus marqué chez certaines plantes de type CAM par rapport aux plantes de type C4.

Des études ont montré que la déviation isotopique de la matière organique formée par les plantes CAM était dépendante de la disponibilité du  $\text{CO}_2$  : lorsque celui-ci est disponible uniquement le jour, la déviation isotopique est de  $-26\text{‰}$ , alors que quand il est disponible uniquement la nuit, celle-ci est de  $-11\text{‰}$ . La discrimination isotopique des plantes CAM peut donc varier en fonction de la durée du jour et de la nuit [47].

### 3.1.4 Résumé

En résumé, l'assimilation du  $\text{CO}_2$  se fait :

- Avec une enzyme (fixation par la Rubisco dans les cellules du mésophylle) chez les **plantes en C3** ;
- Avec deux enzymes (fixation par la PEPCase dans les cellules du mésophylle puis par la Rubisco dans les cellules de la gaine périvasculaire) chez les **plantes en C4** ;
- Avec deux enzymes (fixation par la PEPCase la nuit puis par la Rubisco le jour, dans les cellules du mésophylle) chez les **plantes CAM**.

La discrimination isotopique en carbone 13 lors de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  régit la teneur isotopique globale des molécules formées par photosynthèse. Au sein d'une même molécule, comme le glucose par exemple, l'existence d'effets isotopiques associés aux réactions permettant sa formation peuvent conduire à une répartition non statistique des isotopes dans

cette molécule. L'objet du paragraphe suivant est de répertorier les effets isotopiques associés aux réactions du cycle de Calvin responsables de la répartition non statistique en  $^{13}\text{C}$  dans la molécule de glucose.

### 3.2 Effets isotopiques au sein du cycle de Calvin

Quelque soit le métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  mentionné dans le paragraphe précédent, le fructose-1,6-bisphosphate (FBP) est synthétisé dans la feuille à partir du  $\text{CO}_2$  *via* le cycle de Calvin. Les deux substrats mis en jeu lors de ce cycle sont le  $\text{CO}_2$  (acheminé différemment selon le métabolisme C3, C4 ou CAM) et le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). Pour 6 molécules de  $\text{CO}_2$  et 6 molécules de RuBP métabolisées, 6 molécules de FBP sont synthétisées. Une seule sert à la formation de saccharose ou d'amidon, les cinq autres servant à la régénération du RuBP. La détermination des effets isotopiques au sein du cycle de Calvin *in vivo* s'avère difficile pour plusieurs raisons : (i) les produits intermédiaires sont présents en très faible quantité dans le chloroplaste et sont donc difficilement isolables (ii) leur isolement peut être source de contamination par la substance (solvant) utilisée pour le traitement et l'obtention de ces produits [48]. Un des moyens pour mettre en évidence la présence d'effets isotopiques associés aux réactions du cycle de Calvin est d'analyser la teneur en  $^{13}\text{C}$  de chaque carbone du glucose formé par ce dernier.

Les réactions associées à la formation et à l'utilisation des glucides dans la plante sont regroupées en Annexe 3, ainsi que les principaux effets isotopiques associés à ces réactions.

#### 3.2.1 Distribution intramoléculaire en $^{13}\text{C}$ dans la molécule de glucose

La seule détermination complète de la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  de la molécule de glucose naturel est attribuée à Rossmann *et al.* en 1991 [49]. L'objectif étant de mesurer la déviation isotopique sur chaque site carboné du glucose par SMRI, les auteurs ont proposé une dégradation de la molécule en plusieurs fragments et l'analyse de chaque fragment par SMRI afin de pouvoir reconstruire le profil isotopique du glucose.

Deux dégradations ont été effectuées, une première chimiquement (Annexe 4) et une deuxième à l'aide de plusieurs organismes qui fermentent le glucose pour donner du lactate et/ou de l'éthanol (Figure 9).

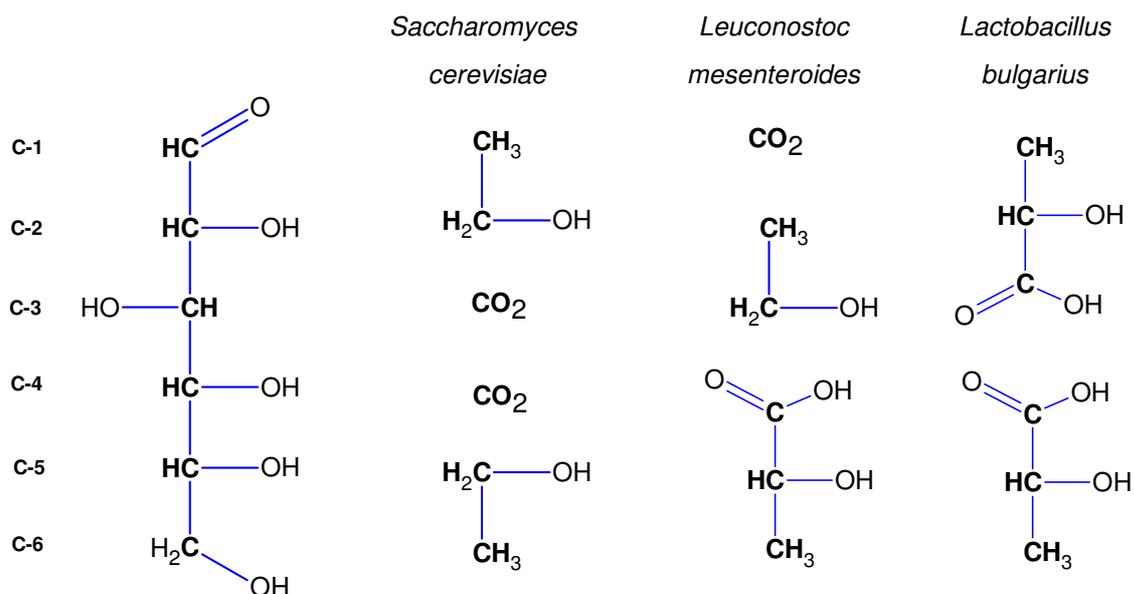


Figure 9. Transformations du glucose par des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou par des bactéries (*Lactobacillus bulgarius* et *Leuconostoc mesenteroides*) pour la détermination de la teneur isotopique sur chaque site carboné du glucose. (D'après Rossmann *et al.*, 1991 [49]).

Lors de la dégradation chimique, l'information est accessible pour les carbones 1, 2, 3, et 6 et une moyenne est obtenue pour les carbones 4 et 5. Lors de la dégradation enzymatique, l'information est accessible pour tous les carbones de la molécule de glucose. Un glucose provenant de l'hydrolyse d'amidon de maïs (plante à métabolisme C4) et un glucose provenant de saccharose de betterave (plante à métabolisme C3) ont été analysés par cette méthode (Tableau 3). Les valeurs sont données en écart à la valeur moyenne  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ .

$$\Delta\delta_i^{13}\text{C} = \delta_i^{13}\text{C} - \delta_g^{13}\text{C} \quad (\text{en } \text{‰}) \quad (28)$$

$\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  : écart de la déviation isotopique du site  $i$  à la déviation isotopique globale de la molécule (exprimé en ‰)

$\delta_i^{13}\text{C}$  : déviation isotopique en  $^{13}\text{C}$  du site  $i$  (exprimée en ‰)

$\delta_g^{13}\text{C}$  : déviation isotopique globale de la molécule (=moyenne des déviations isotopiques sur tous les sites  $i$  de la molécule) (exprimée en ‰)

**Tableau 3. Valeurs des écarts à la déviation isotopique globale en carbone 13  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  obtenues par Rossmann *et al.* (1991)[49] selon une dégradation chimique ou enzymatique sur du glucose de maïs (C4) et un saccharose de betterave (C3).**

	Glucose de Maïs (C4)		Saccharose de Betterave (C3)	
	Fermentation	Dégradation chimique	Fermentation	Dégradation chimique
<b>C-1</b>	+ 0,9	- 1,6	- 1,3	- 1,3
<b>C-2</b>	- 0,1	- 0,2	- 0,9	- 0,8
<b>C-3</b>	- 0,7	+ 1,2	+ 1,9	+ 2,2
<b>C-4</b>	+ 5,2	+ 1,9	+ 6,3	+ 2,4
<b>C-5</b>	- 0,1		- 1,1	
<b>C-6</b>	- 4,8	- 4,0	- 4,9	- 5,2

Globalement, il apparaît clairement que le site C-6 est plus pauvre (par rapport à la moyenne en  $^{13}\text{C}$  sur la molécule) et que les sites C-3 et C-4 sont plus riches et ce, quelque soit le métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  (C3 ou C4).

En négligeant les effets isotopiques associés aux réactions post-photosynthétiques, l'absence d'effets isotopiques associés aux réactions du cycle de Calvin produirait une molécule de glucose pour laquelle les valeurs des déviations isotopiques en carbone 13 seraient les mêmes pour chaque site carboné (c'est-à-dire une répartition statistique en carbone 13 sur la molécule de glucose).

Les résultats de Rossmann *et al.* (1991) [49] mettent donc en évidence la présence d'effets isotopiques au sein du cycle de Calvin. Plusieurs hypothèses ont été proposées par les auteurs concernant les enzymes du cycle de Calvin responsables du fractionnement isotopique observé sur le glucose. D'une part, l'aldolase pourrait expliquer la forte teneur en  $^{13}\text{C}$  des sites C-3 et C-4, cette enzyme catalysant l'aldolisation des trioses phosphates, dihydroxyacetone phosphate (DHAP) et glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), en une molécule de fructose-1,6-bisphosphate (FBP), réaction impliquant les carbones C-3 et C-4 du FBP.

D'autre part, les enzymes impliquées dans la régénération du RuBP pourraient être responsables, en partie, de la distribution isotopique mesurée sur le glucose. Ces différentes réactions seront abordées dans le paragraphe 3.2.2.

L'appauvrissement de la position C-6 par rapport à C-1 n'a pas encore d'explication définie. Théoriquement, ces deux positions devraient avoir la même teneur isotopique puisqu'elles sont échangées *via* l'équilibre entre les trioses phosphates. Les valeurs mesurées par Rossmann *et al.* (1991) [49] amènent à penser à un phénomène extérieur au cycle de Calvin conduisant soit à l'appauvrissement de la position C-6, soit à l'enrichissement de la position C-1.

Ces travaux permettent la mise en évidence de variations isotopiques intramoléculaires en carbone 13 sur la molécule de glucose. Ils sont de première importance puisque, étant donné le rôle central du glucose dans le métabolisme, les teneurs isotopiques des différents produits synthétisés dans la plante seront reliées à la distribution isotopique intramoléculaire de cette molécule [49-51].

### 3.2.2 Cycle de Calvin et effets isotopiques associés

Pour répertorier les différents effets isotopiques associés au cycle de Calvin, celui-ci va être présenté en trois phases distinctes (Figure 10) :

- 1 - **Fixation du CO<sub>2</sub>** et réduction des composés intermédiaires pour former les **trioses phosphates** (cette étape s'accompagne de l'export des trioses phosphates du chloroplaste vers le cytoplasme)

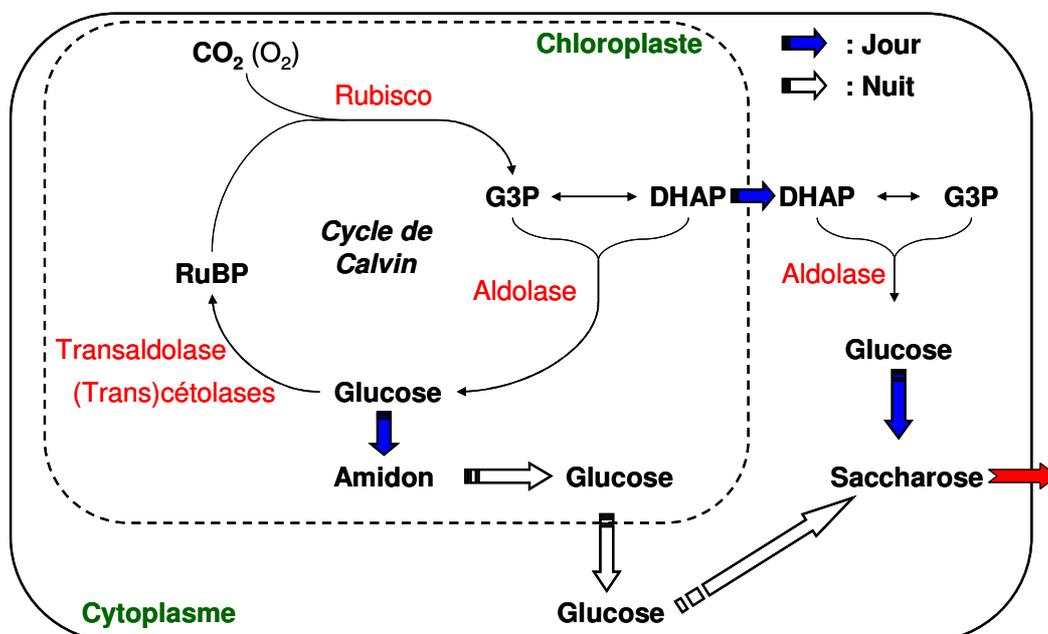


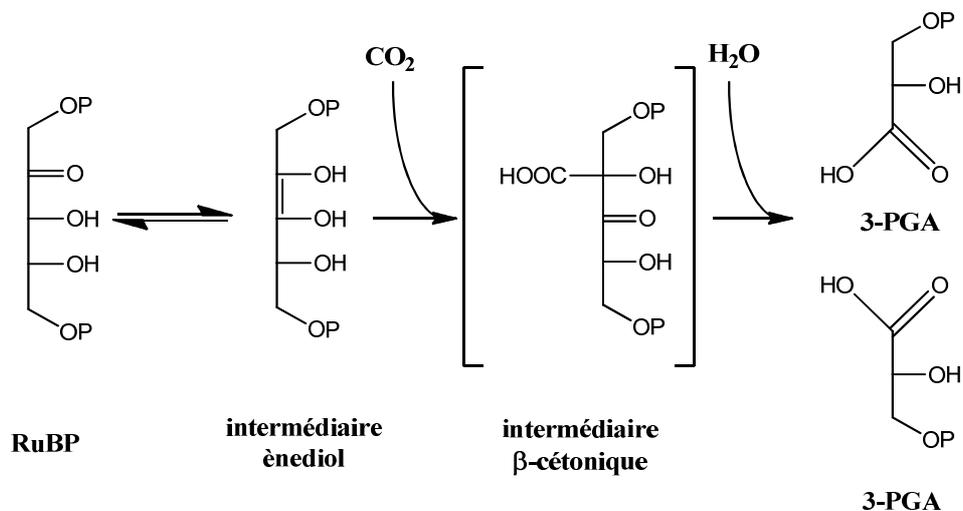
Figure 10. Schéma représentant la formation des trioses phosphates, de l'amidon et du saccharose dans la feuille.

Le saccharose exporté peut être formé soit à partir des trioses phosphates dans le cytoplasme de la cellule, soit à partir de la dégradation de l'amidon transitoire.

- 2 - **Transformation de deux molécules de triose phosphate en une molécule de FBP**  
servant à former l'amidon dans le chloroplaste, le saccharose dans le cytoplasme ou le RuBP qui sera métabolisé dans un nouveau cycle.
- 3 - **Régénération du RuBP** à partir du FBP

### 3.2.2.1 Formation des trioses phosphates

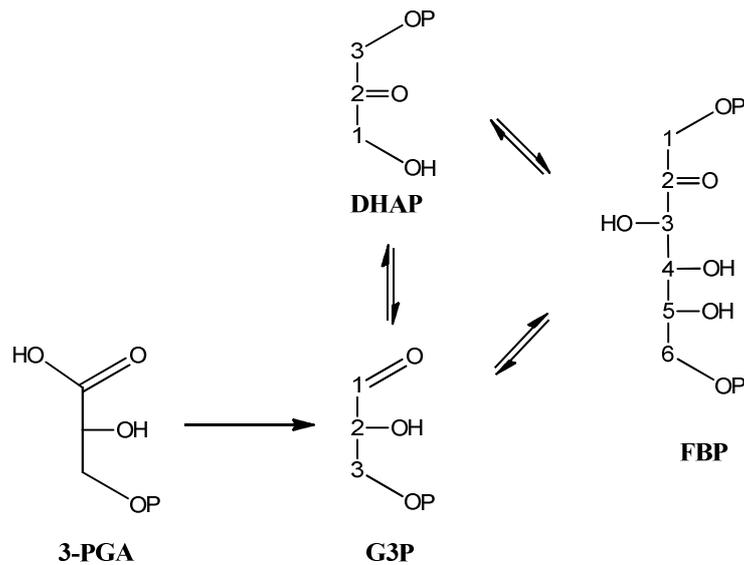
Lors de la fixation du  $\text{CO}_2$  sur le RuBP, il y a isomérisation de ce dernier en une forme ènediolate puis fixation du  $\text{CO}_2$  sur cette molécule pour donner un composé instable qui va se scinder en deux molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA) (Figure 11).



**Figure 11. Formation de deux molécules de 3-PGA catalysée par la Rubisco à partir d'une molécule de  $\text{CO}_2$  et d'une molécule de RuBP.**

Le  $\text{CO}_2$  est fixé par la Rubisco sur l'intermédiaire ènediol du RuBP. L'intermédiaire β-cétonique formé demeure attaché à l'enzyme puis est très rapidement hydrolysé en 2 molécules de 3-PGA.

Les deux molécules de 3-PGA formées à l'étape précédente sont réduites en un triose phosphate : le glyceraldéhyde-3-phosphate, G3P. La triose phosphate isomérase transforme ensuite le G3P en dihydroxyacétone phosphate DHAP. Ces deux trioses phosphates (DHAP et G3P) vont subir ensuite une aldolisation (catalysée par l'aldolase) pour former le FBP (Figure 12).



**Figure 12. Formation du Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à partir du 3-phosphoglycérate (3-PGA).**

Cette transformation implique le passage par les trioses phosphates : glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et dihydroxyacétone-phosphate (DHAP).

Bien que l'étape de réduction puisse discriminer contre le  $^{13}\text{C}$ , le fait que le taux de conversion du 3-PGA vers le G3P soit élevé implique un fractionnement nécessairement faible. En revanche, un effet isotopique lors de l'isomérisation du G3P en DHAP est théoriquement envisageable, puisque le carbone 1 du G3P subit une réduction et le carbone 2 une oxydation. Les  $\beta$ -facteurs permettent de prévoir un enrichissement de 10‰ sur le C-2 et un appauvrissement de 10‰ sur le C-1 du DHAP (Annexe 3 et ref. [48]). A notre connaissance, aucune expérience n'a montré d'effets isotopiques *in vitro* ou *in vivo* lors de cette transformation malgré l'importance de celle-ci dans les processus biochimiques (cycle de Calvin, glycolyse, ...). La difficulté dans la détermination de l'effet isotopique dû à l'isomérase réside dans le fait que les carbones 1 et 2 vont subir des effets, *a priori*, du même ordre de grandeur mais inversés. Par conséquent, la mesure par SMRI de l'enrichissement du DHAP sur le C-2, par exemple, sera compensée, ou au moins atténuée, par l'appauvrissement sur l'autre carbone impliqué, le C-1.

### 3.2.2.2 Formation du FBP à partir des trioses phosphates

- **Aldolase**

La formation du fructose-1,6-bisphosphate à partir des trioses phosphates est catalysée par une aldolase. Les effets isotopiques ont été mesurés sur l'aldolase du muscle de lapin par

Gleixner et Schmidt (1997) [52]. Un effet isotopique cinétique de 1,016 et 0,997 a été mesuré pour les carbones 3 et 4 du FBP respectivement, dans le sens  $\text{FBP} \rightarrow \text{G3P} + \text{DHAP}$ . Lors de la transformation du FBP en G3P et DHAP, le FBP restant est donc enrichi en position 3 et appauvri en position 4. L'effet isotopique cinétique en C-4 ne semble pas corroborer l'enrichissement observé par Rossmann *et al.* (1991) [49] sur le glucose de maïs et le saccharose de betterave (enrichissement sur le C-4 de 6,3 ‰ et de 5,2 ‰, respectivement ; cf. Tableau 3 p. 46).

L'effet isotopique d'équilibre associé à cette réaction a aussi été mesuré par les auteurs sur ces deux sites carbonés, avec une valeur de 1,0036 et 1,0049 sur le C-3 et C-4, respectivement (le FBP est enrichi à l'équilibre de 3,6‰ et 4,9‰ sur les positions C-3 et C-4, respectivement). L'effet isotopique d'équilibre semble mieux expliquer l'enrichissement observé par Rossmann *et al.* (1991) [49] sur les positions C-3 et C-4 du glucose [52].

#### • **Formation du saccharose et de l'amidon dans la feuille**

Lors de l'étape d'isomérisation du G3P en DHAP, deux voies sont possibles (Figure 10 p. 47) :

- Le DHAP est exporté vers le cytoplasme pour être transformé en FBP, puis en saccharose qui sera exporté vers les organes hétérotrophes. Cette voie s'effectue pendant la journée, lorsque la photosynthèse permet une production importante de trioses phosphates ;
- Le DHAP est transformé en FBP dans le chloroplaste (par l'aldolase en utilisant une molécule de G3P) puis en amidon. L'amidon formé est stocké pendant la journée dans le chloroplaste. La nuit, l'amidon est hydrolysé en glucose, qui est transporté dans le cytoplasme pour être transformé en saccharose, lui-même exporté vers les organes hétérotrophes. Ainsi, l'amidon sert de réserve pour subvenir aux besoins de la plante en glucides quand la photosynthèse ne peut pas en produire.

Il existe donc deux types de saccharose exporté : le saccharose cytoplasmique (exporté le jour) et le saccharose provenant de l'hydrolyse de l'amidon chloroplastique (exporté la nuit).

Il a été montré que le saccharose exporté le jour était plus pauvre que celui exporté la nuit à partir de l'amidon transitoire [53]. Ce phénomène peut s'expliquer par l'effet isotopique associé à la réaction catalysée par l'aldolase. Comme celle-ci favorise la formation de FBP enrichi en  $^{13}\text{C}$  sur les carbones 3 et 4, le DHAP exporté vers le chloroplaste est appauvri en

$^{13}\text{C}$  et le saccharose cytoplasmique est appauvri par rapport à l'amidon chloroplastique [48, 53].

### 3.2.2.3 Régénération du ribulose-1,5-bisphosphate

La régénération du substrat pour la fixation du  $\text{CO}_2$  se fait, à partir du FBP par un ensemble de réactions biochimiques impliquant des transcétolases et des aldolases. L'ensemble des réactions conduit globalement à la formation de six molécules de RuBP à partir de cinq molécules de FBP (Figure 13).

Bien qu'il soit probable que ces enzymes discriminent entre les isotopologues, les effets isotopiques lors de ces étapes n'ont jamais été mesurés *in vitro*. Cependant, une estimation peut être obtenue à partir de modèles mathématiques (paragraphe 3.2.3).

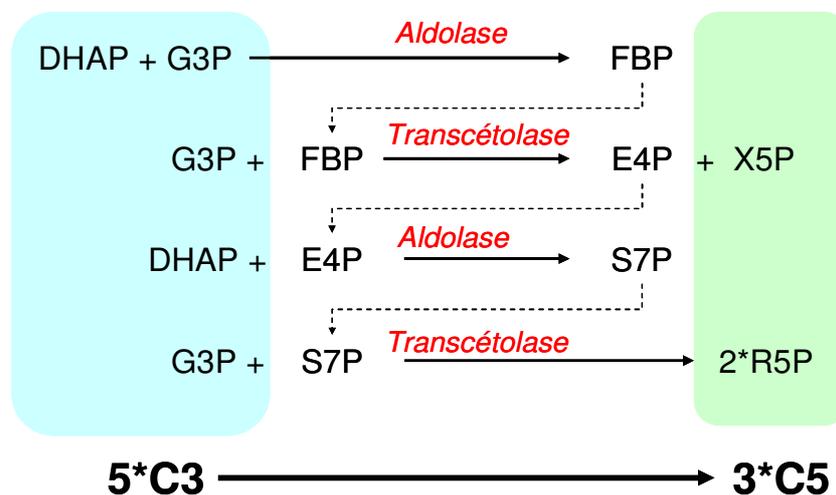


Figure 13. Régénération du Ribulose-1,5-bisphosphate RuBP (substrat pour la fixation du  $\text{CO}_2$  par la Rubisco) à partir du fructose-1,6-bisphosphate FBP.

Les enzymes catalysant les différentes réactions sont indiquées en rouge. DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; FBP : fructose-1,6-bisphosphate ; E4P : erythrose-4-phosphate ; X5P : xylose-5-phosphate ; S7P : sedoheptulose-7-phosphate ; R5P : ribulose-5-phosphate.

### 3.2.3 Modélisation mathématique du fractionnement isotopique au cours de la biosynthèse des glucides

Mis à part les effets isotopiques liés à l'aldolase et à la Rubisco, aucun effet isotopique n'a été étudié concernant les enzymes impliquées dans le cycle de Calvin. Un modèle mathématique mis au point par Tcherkez *et al.* (2004) [48], basé sur les flux mesurés au sein des plantes C3 dans le cycle de Calvin, permet de calculer les effets isotopiques théoriques des différentes réactions impliquées dans la biosynthèse du FBP.

Les auteurs se basent sur les valeurs obtenues par Rossmann *et al.* (1991) [49] sur le glucose de saccharose de betterave. Le concept de ce modèle est basé sur le fait qu'un rapport isotopique sur une molécule est lié au rapport isotopique de son ou ses précurseurs et des produits qu'il forme par la suite, en incluant le fractionnement isotopique induit par ces réactions. En intégrant les flux de formation d'amidon et de photorespiration standard des plantes en C3, et en estimant l'état stationnaire du système atteint, le fractionnement isotopique associé aux réactions impliquant une rupture ou une formation de liaison C-C (aldolisation, transacétolisation) peut être déterminé (Tableau 4).

**Tableau 4. Discriminations isotopiques déterminées à partir du modèle mathématique mis au point par Tcherkez *et al.* (2004)[48].**

Enzyme	Réactions catalysées <sup>a</sup>	Site carboné	Discrimination isotopique Δ (‰)
Transcétolase	$G3P + FBP \rightarrow E4P + X5P$	C-1	+7,6
	$G3P + S7P \rightarrow 2 R5P$		
Aldolase	$DHAP + G3P \rightarrow FBP$	C-3	-5,8
	$DHAP + E4P \rightarrow S7P$	C-4	-16,1

<sup>a</sup> Voir légende de la Figure 13 pour les abréviations

Les valeurs obtenues par Tcherkez *et al.*(2004)[48] suggèrent que la réaction d'aldolisation est bien responsable de l'enrichissement relatif des sites C-3 et C-4 du glucose de betterave. De plus, le modèle permet la détermination de l'effet isotopique associé aux transformations catalysées par la transcétolase (7,6‰ sur le C-1 du E4P et X5P).

### 3.2.4 Indications concernant la différence de distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C du glucose selon le métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub>

La fixation du CO<sub>2</sub> en elle-même se fait, quelque soit le type d'assimilation de ce CO<sub>2</sub>, par la Rubisco. Même si cette enzyme discrimine contre le carbone 13 différemment selon le métabolisme C3, C4 ou CAM, les réactions permettant de former le FBP (cycle de Calvin) sont les mêmes quel que soit le métabolisme.

La discrimination isotopique des plantes C3 et C4 a été expliquée depuis les années 70 par de nombreuses études, visant notamment à mettre au point des modèles prédictifs permettant de déterminer cette discrimination dans des conditions données (paragraphe 3.1). En revanche, l'impact du métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub> sur la distribution isotopique intramoléculaire de la molécule de glucose n'est pas clairement connu. Pour évaluer cet impact, Hobbie et Werner (2004) [54] ont rassemblé les données de travaux concernant la teneur isotopique en <sup>13</sup>C d'éthanol obtenu par fermentation de sucres de composition isotopique connue (Figure 9 p. 45).

Cette approche est la même que celle développée par Rossmann *et al.* (1991) [49] pour la détermination de la distribution intramoléculaire en <sup>13</sup>C dans la molécule de glucose. Lors de la fermentation par la voie glycolytique, une molécule de glucose forme deux molécules d'éthanol et deux molécules de dioxyde de carbone. Le CO<sub>2</sub> dégagé pendant la fermentation a donc une teneur en <sup>13</sup>C qui sera la moyenne des carbones 3 et 4 du glucose. La teneur en <sup>13</sup>C du site méthyle résulte de la moyenne des carbones 1 et 6 du glucose et pour le site méthylène celle des carbones 2 et 5 [54].

Les teneurs isotopiques en <sup>13</sup>C de l'éthanol et/ou du CO<sub>2</sub> formés, comparées à celles du sucre utilisé pour la fermentation, permettent l'obtention d'informations concernant la répartition intramoléculaire en <sup>13</sup>C dans ce sucre. Le Tableau 5 montre les données de quatre articles concernant la détermination des teneurs isotopiques sur les sucres de départ (glucose et saccharose) et sur la molécule d'éthanol ou de CO<sub>2</sub> (d'après Hobbie et Werner (2004) [54]). Les valeurs reportées dans ce tableau sont la différence entre le substrat (saccharose, glucose, amidon) et le produit (éthanol ou CO<sub>2</sub>). Quelque soit le métabolisme (C3 ou C4), le CO<sub>2</sub> est enrichi par rapport au glucose et l'éthanol est appauvri par rapport au saccharose ou à l'amidon. Ces résultats suggèrent, globalement, un enrichissement relatif sur les sites C-3 et C-4 du glucose et un appauvrissement relatif sur les autres sites. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus par Rossmann *et al.* (1991) [49].

Cependant, certaines différences suggèrent une distribution isotopique intramoléculaire différente pour les plantes C3 et C4. Chez les espèces de type C4, l'écart entre la teneur en <sup>13</sup>C du glucose de départ et les produits de fermentation (éthanol et CO<sub>2</sub>) est moins grand que celui des sucres issus de plantes en C3. Ces résultats suggèrent que les carbones C-3 et C-4 sont plus enrichis en <sup>13</sup>C chez les glucides synthétisés par les plantes en C3.

**Tableau 5. Différences de déviations isotopiques entre substrats (saccharose, amidon, glucose) et produits (éthanol, CO<sub>2</sub>) lors de la fermentation glycolytique (d'après Hobbie & Werner, 2004, ref. [54]).**

Composés	Différence (‰) <sup>a</sup>		Référence	Référence
	C3	C4		
Saccharose - éthanol	1,8	0,8	Weber <i>et al.</i> (1997)	[50]
Saccharose - éthanol	2	1,2	Zhang <i>et al.</i> (1998)	[55]
Amidon-éthanol	1,7	0,3	Rauschenbach <i>et al.</i> (1979)	[56]
Glucose-CO <sub>2</sub>	-7,4	-5,1	Scrimgeour <i>et al.</i> (1988)	[57]

<sup>a</sup> Différence de déviation isotopique globale  $\delta^{13}\text{C}$  entre les substrats (saccharose, amidon, glucose) et les produits de fermentation alcoolique (éthanol, CO<sub>2</sub>).

La principale explication mentionnée par les auteurs concernant la différence de distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C des sucres selon le métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub> est la photorespiration, importante chez les plantes en C3 (le taux d'oxygénation peut représenter jusqu'à 50% du taux de carboxylation) et très faible chez les plantes en C4. Celle-ci peut altérer la distribution intramoléculaire en <sup>13</sup>C sur le FBP, donc potentiellement sur le glucose et le saccharose mais aussi sur le substrat (RuBP) qui est régénéré à partir du FBP.

D'après les résultats obtenus par Rossmann *et al.* (1991)[49], il apparaît clairement que le cycle de Calvin et ses enzymes jouent un rôle non négligeable dans la distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C du glucose. Certains points restent cependant à élucider, notamment :

- l'impact de la photorespiration sur la distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C du glucose ;
- les effets isotopiques associés à l'isomérisation des trioses phosphates ;
- Le fractionnement isotopique post-photosynthétique dans les organes hétérotrophes, organes d'où sont extraits les sucres analysés. Ce dernier point fait l'objet du paragraphe suivant.

### 3.3 Fractionnement isotopique post-photosynthétique

Les données sur les teneurs isotopiques obtenues par Rossmann *et al.* (1991) [49] ou rassemblées par Hobbie et Werner (2004) [54] proviennent des glucides de réserve des plantes considérées (ex. : saccharose de betterave et glucose d'amidon de maïs). L'analyse de ces données doit donc prendre en compte le fractionnement isotopique post-photosynthétique, c'est-à-dire le fractionnement isotopique associé au transport du saccharose dans la plante et au stockage des glucides sous forme d'amidon ou de saccharose.

Une fois formé dans le cytoplasme des cellules de la feuille, le saccharose est exporté dans le phloème, vaisseau conducteur de la sève élaborée<sup>a</sup>, puis métabolisé dans les différents organes hétérotrophes (tiges, racines, tubercules,...). Le saccharose sert alors de métabolite carboné nécessaire à la formation de composés vitaux pour ces organes : acides aminés, protéines, lipides, cellulose, ... (Figure 14). Ces transformations s'effectuent *via* la respiration (qui s'effectue dans la mitochondrie), incluant le processus de glycolyse et le cycle de Krebs, et par la voie des pentoses phosphates (qui s'effectue dans le cytoplasme). Le fractionnement isotopique associé aux processus post-photosynthétiques est un sujet d'étude relativement récent [5]. Nous tenterons ici de résumer les principales sources de fractionnement isotopique affectant les glucides après l'export du saccharose à travers le phloème.

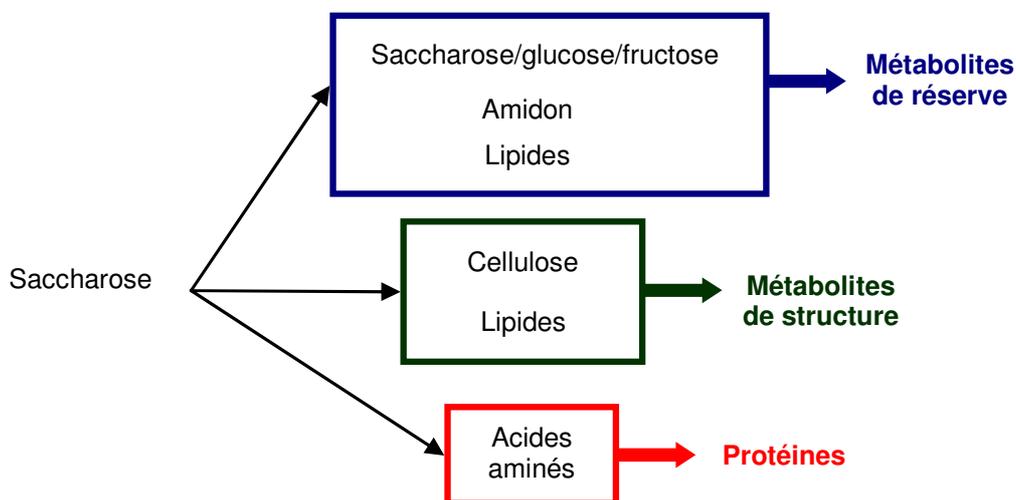


Figure 14. Utilisation du saccharose dans les organes hétérotrophes.

<sup>a</sup> La sève élaborée est un liquide chargé principalement de sucres et d'acides aminés, permettant d'alimenter les différents organes de la plante. Elle circule des feuilles aux racines, contrairement à la sève brute, qui circule des racines aux feuilles et qui contient principalement de l'eau et des sels minéraux.

### 3.3.1 Transport et distribution du saccharose

Le phloème est le tissu végétal qui permet de conduire la sève élaborée des organes autotrophes aux organes hétérotrophes.

Le saccharose n'est pas utilisable directement dans les cellules : une fois parvenu aux organes hétérotrophes, il doit être hydrolysé en glucose et fructose par une invertase. L'hydrolyse du saccharose peut s'effectuer avant l'entrée dans la cellule en question (par une invertase pariétale), ou dans la cellule (par une invertase cytoplasmique) [58] (Figure 15).

Un effet isotopique  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  de 1,001 a été mesuré *in vitro* par Mauve *et al.* (2009) [59] lors de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase. Au niveau post-photosynthétique, la présence d'invertases pariétales pourrait impliquer un enrichissement du saccharose au fur et à mesure de sa distribution dans les différents organes. L'invertase pariétale laisserait en effet du glucose et du fructose appauvris en  $^{13}\text{C}$  entrer dans la cellule, et donc un saccharose riche dans le phloème. Cet aspect pourrait expliquer l'observation selon laquelle les organes secondaires des plantes en C3 sont généralement plus riches que les feuilles [4, 59].

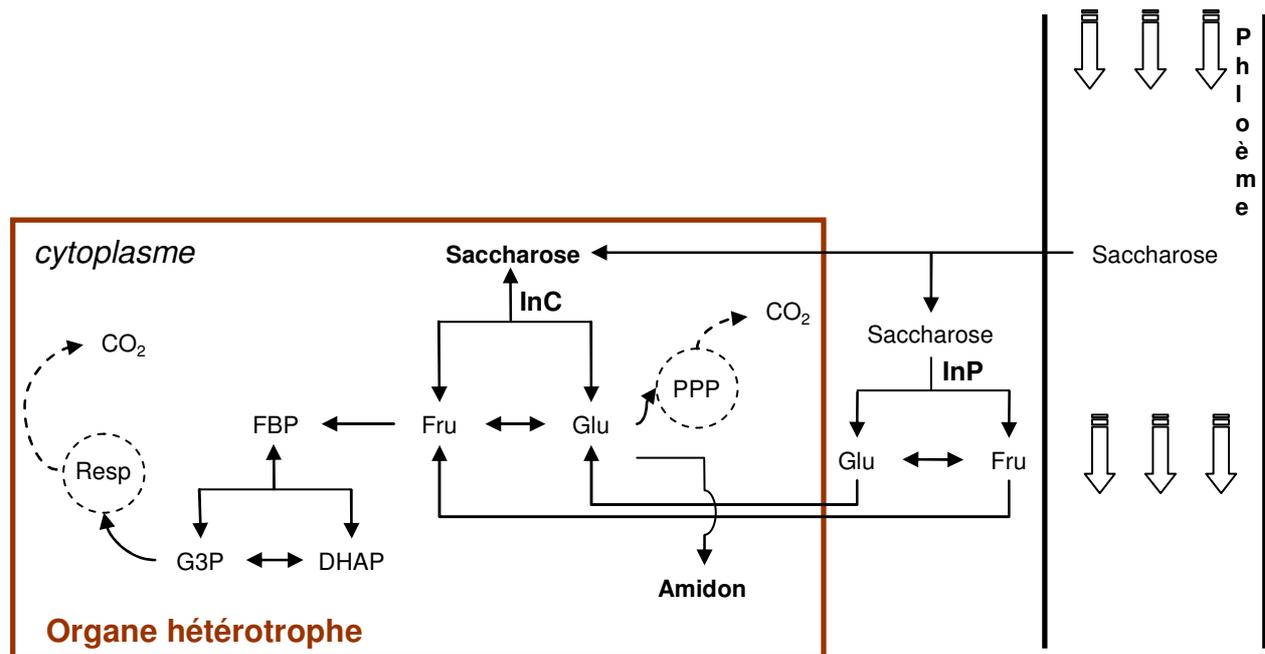


Figure 15. Utilisation du saccharose dans les cellules des organes hétérotrophes après transport à travers le phloème.

PPP : voie des pentoses phosphates ; Resp : respiration. Glu : Glucose ; Fru : Fructose ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; DHAP : Dihydroxyacétone-phosphate ; FBP : Fructose-1,6-bisphosphate ; InP : invertase pariétale ; InC : invertase cytoplasmique.

### 3.3.2 Métabolisme des glucides

Les principaux métabolites de stockage glucidique dans les organes hétérotrophes sont le saccharose (canne à sucre, betterave, ...) l'amidon (blé, pomme de terre, maïs, ...) et les lipides (contenus dans les graines de certains fruits). La formation de l'amidon à partir du saccharose nécessite d'une part l'hydrolyse de ce dernier en glucose et fructose (catalysée par l'invertase ou la sucrose synthase (SuSy)), la transformation du fructose en glucose (catalysée par la phosphoglucose isomérase) et la formation de l'amidon en lui-même (catalysée par la starch synthase) *via* l'Uridine DiPhosphate Glucose, UDP-Glucose.

De même que l'équilibre entre les trioses phosphates, l'équilibre entre le glucose et le fructose dans les organes hétérotrophes pourrait conduire, *a priori*, à un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$ , notamment sur les positions C-1 et C-2, toutes deux impliquées dans un passage d'un état hybridé  $sp_2$  à un état  $sp_3$  (passage d'un aldose à un cétose). Le calcul à l'aide des  $\beta$ -facteurs (effet isotopique à l'équilibre) indique un enrichissement de 21‰ sur le C-1 et un appauvrissement de 20‰ sur le C-2 du glucose à l'équilibre (Annexe 3). Ces effets n'ont cependant jamais été mesurés *in vitro*.

Le glucose et le fructose peuvent aussi être métabolisés par la voie de la glycolyse *via* les trioses phosphates (première étape de la respiration), et par la voie des pentoses phosphates (Figure 15).

### 3.3.3 Respiration

#### 3.3.3.1 Principe

La respiration permet aux organes d'utiliser les réserves glucidiques comme source d'énergie. Celle-ci se déroule en trois étapes distinctes (Figure 16) :

- **La glycolyse**

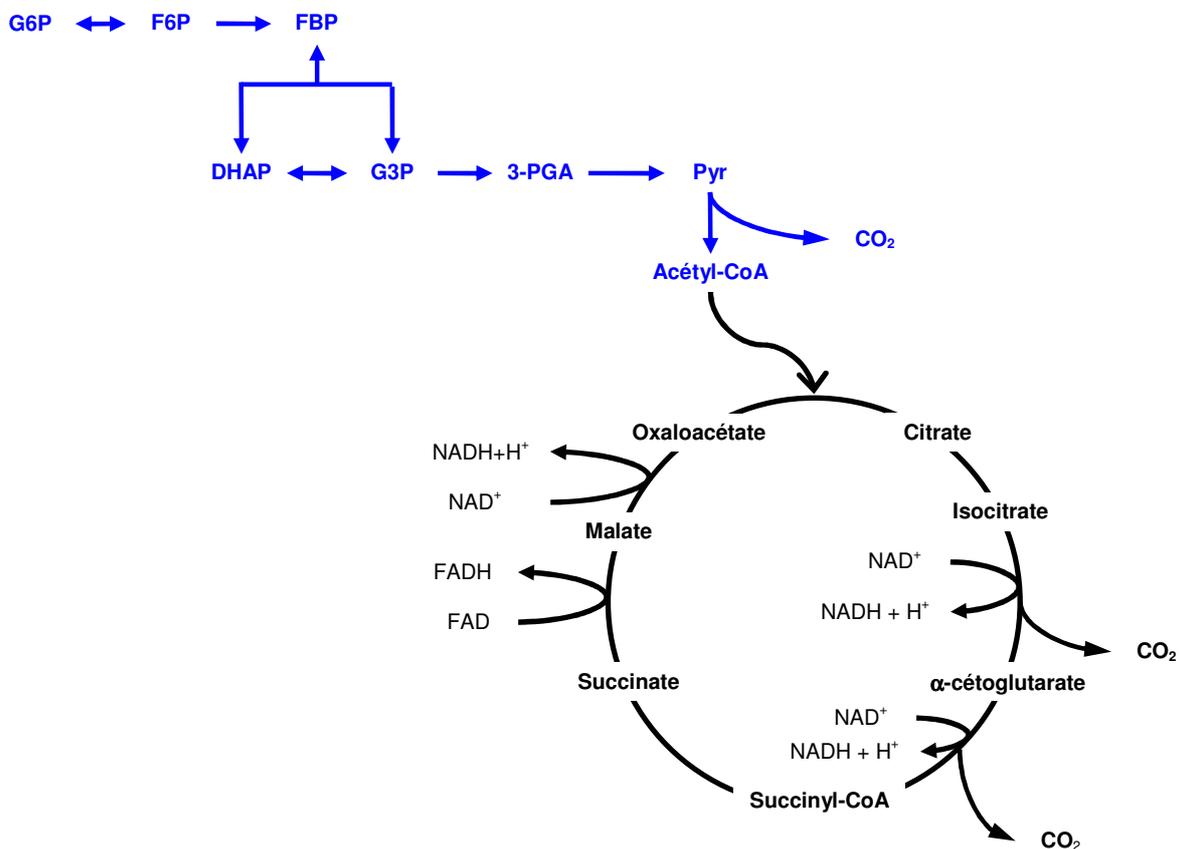
L'étape de la glycolyse se déroule dans le cytoplasme de la cellule. Cette étape se décompose en deux phases à partir du fructose-1,6-bisphosphate (provenant de la phosphorylation du fructose-6-phosphate) : (i) le FBP est scindé en deux molécules de trioses phosphates (G3P et DHAP) par l'aldolase ; (ii) le G3P est ensuite métabolisé en pyruvate. En conditions aérobies, le pyruvate est transformé en Acétyl-CoA par le complexe de la pyruvate déshydrogénase. Ce dernier composé sert de substrat au cycle de Krebs. En conditions anaérobies, le pyruvate est décarboxylé puis réduit en éthanol (fermentation alcoolique).

- **Le cycle de Krebs**

Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) permet la transformation de l'acétyl-CoA en acides organiques (acides citrique et malique) et aminés. Il y a tout d'abord fixation d'Acétyl-CoA sur une molécule d'oxaloacétate (précurseur dans le cycle) pour donner l'acide citrique. L'acide citrique subit dès lors plusieurs transformations qui vont conduire à la formation de deux molécules de CO<sub>2</sub> et deux molécules de NADH.

- **La phosphorylation oxydative**

La phosphorylation est un processus complexe permettant, à partir du NADH formé dans le cycle de Krebs et d'une molécule d'ADP de former une molécule d'ATP. Elle ne sera pas abordée ici.



**Figure 16. Schéma simplifié du processus de respiration.**

Seules deux étapes sont représentées : la glycolyse (en bleu) et le cycle de Krebs (en noir).

### 3.3.3.2 Fractionnement isotopique associé à la respiration

La compréhension du fractionnement isotopique lié au processus de respiration représente un enjeu de taille au niveau environnemental puisqu'il permettrait d'étendre l'étude des flux carbonés au sein d'un écosystème et notamment au cycle du carbone dans le sol,

incluant la respiration des plantes [60].

Le principal effet isotopique associé au processus de respiration provient de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA (c'est-à-dire la décarboxylation du pyruvate). Des effets isotopiques cinétiques de 1,023 et 1,025 ont été mesurés sur le C-1 et C-2 du pyruvate, respectivement, avec *Saccharomyces cerevisiae* et de 1,009 et 1,021 avec *Escherichia coli*. L'acétyl-CoA et le CO<sub>2</sub> formés sont alors appauvris par rapport au pyruvate de départ [61].

Lors de la formation de l'acétyl-CoA, les teneurs isotopiques sont la moyenne de celles des sites C-1 et C-6 du glucose pour le groupement méthyle et C-2 et C-5 pour le groupement carbonyle. La distribution isotopique intramoléculaire obtenue par Rossmann *et al.* (1991) [49] est inégale sur la molécule de glucose, les sites C-3 et C-4 étant relativement enrichis en <sup>13</sup>C par rapport à la teneur isotopique globale du glucose. Les carbones C-3 et C-4 formant le CO<sub>2</sub>, les carbones restant (et par là même l'acétyl-CoA formé) sont alors appauvris en <sup>13</sup>C par rapport au glucose de départ. Ce fait, associé aux effets isotopiques de la pyruvate déshydrogénase est à l'origine de l'appauvrissement des lipides (formés à partir de l'acétyl-CoA) par rapport au glucose dans les plantes [61, 62]. Cet exemple montre particulièrement l'impact que peut avoir la distribution isotopique *intramoléculaire* d'un substrat (le glucose) sur la teneur isotopique *globale* d'une molécule ou d'une classe de molécules (lipides).

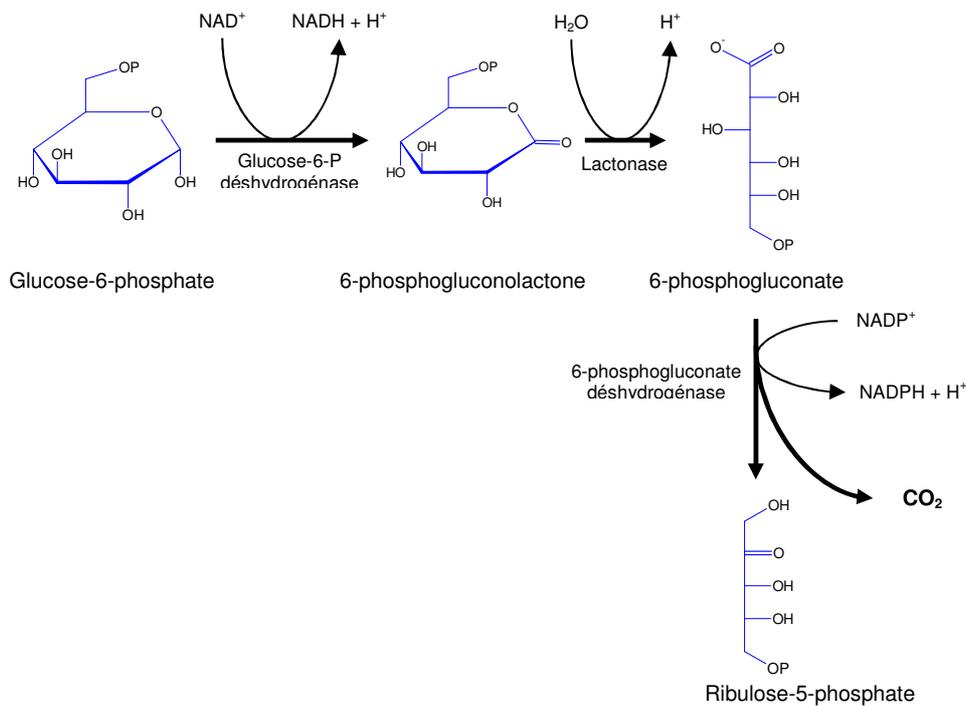
Une fois formé, l'acétyl-CoA rejoint ensuite le cycle de Krebs. Les effets isotopiques associés au cycle de Krebs sont encore mal connus et ne seront pas abordés ici.

Plusieurs études ont été menées récemment pour comprendre les processus régissant le fractionnement isotopique lors de la respiration. Celles-ci ont permis de montrer qu'un fractionnement isotopique existait lors de ce processus [63] et qu'il est opposé entre organes autotrophes et hétérotrophes : le CO<sub>2</sub> produit par respiration des feuilles est plus enrichi que la matière organique totale, alors que la tendance inverse est observée pour les racines [64]. Cette différence de fractionnement isotopique entre feuilles et racines pourrait être à l'origine de la différence de teneur en carbone 13 entre les organes, les organes hétérotrophes étant, chez les plantes en C3, généralement plus enrichis que les organes autotrophes [4].

### 3.3.4 Voie des Pentoses Phosphates

La voie des pentoses phosphates permet, à partir d'une molécule de glucose-6-phosphate de générer une molécule de NADPH, et une molécule de NADH, celles-ci étant nécessaires au déroulement du processus de respiration (paragraphe 3.3.3). Lors de cette voie métabolique,

le glucose-6-phosphate est oxydé en 6-phosphogluconolactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, puis en 6-phosphogluconate par la lactonase, générant une mole de NADH par mole de glucose-6-phosphate engagée (Figure 17). Le 6-phosphogluconate est ensuite décarboxylé en ribulose-5-phosphate par la 6-phosphogluconate déshydrogénase, libérant une mole de CO<sub>2</sub>. Le ribulose-5-phosphate est ensuite métabolisé pour fournir des nucléotides, des acides aminés et les trioses phosphates.



**Figure 17. Voie des pentoses phosphates à partir du glucose-6-phosphate.**

Lors de la transformation du glucose-6-phosphate en gluconate (réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase) l'effet isotopique cinétique est de 1,016 et l'effet isotopique à l'équilibre de 0,9920 sur le C-1 du glucose-6-phosphate [65]. De plus, des effets isotopiques cinétique de 1,0096 et d'équilibre de 0,996 ont été mesurés lors de la décarboxylation du 6-phosphogluconate en ribulose-5-phosphate[66]. Ces effets isotopiques permettraient d'expliquer l'enrichissement relatif du C-1 par rapport au C-6 du glucose mesuré par Rossmann *et al.* (1991) [49], si ces réactions ne sont pas à l'équilibre.

## 4 Conclusion

Les différents points concernant le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  des glucides abordés dans ce chapitre sont d'actualité puisqu'ils s'appliquent dans le domaine de la physiologie végétale mais aussi, indirectement, à l'échelle de l'environnement. Les études menées jusqu'ici utilisent la SMRI pour mesurer les rapports isotopiques sur les molécules d'intérêt.

Dans la plupart des cas, la variation en teneur isotopique globale au cours d'un processus physico-chimique ou enzymatique n'est que le reflet de variations isotopiques intramoléculaires au sein des molécules impliquées dans ce processus [67]. Cette variation peut être atténuée par l'effet de moyenne lors de la mesure. Par exemple, lors de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase, un effet isotopique de 1,001 a été mesuré. Cet effet isotopique est *a priori* « dilué » par le nombre de carbones de la molécule et il est probable qu'un seul site soit sensible à cette réaction en terme de fractionnement isotopique [59]. L'effet sur ce site serait de 1,012 et de 1,000 sur tous les autres (la molécule de saccharose possédant 12 carbones). Dans d'autres cas, des effets inverses et normaux peuvent se compenser lors d'un processus et conduire à un produit ayant la même teneur isotopique moyenne que le substrat. En réalité, la teneur isotopique peut être différente sur deux sites carbonés (effet inverse sur l'un et effet normal sur l'autre), conduisant à une valeur globale identique mais des valeurs sur chaque site carboné différentes.

De plus, la distribution isotopique intramoléculaire au sein de la molécule de glucose régit celle des produits formés au cours du métabolisme. L'analyse de la teneur en  $^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné des sucres (glucose, fructose, saccharose) permettrait donc une meilleure compréhension des effets isotopiques associés au métabolisme et d'apporter des éléments de réponses aux questions abordées dans ce chapitre.

# Chapitre 2 - Contraintes et stratégies associées à l'analyse des sucres (glucose, fructose, saccharose) par RMN $^{13}\text{C}$ isotopique

## 1 Cahier des charges

### 1.1 Introduction

Les molécules de glucose, fructose et saccharose présentent un intérêt certain du point de vue de l'étude de métabolismes. D'une part, elles font partie intégrante du métabolisme, en tant que composés primordiaux formés lors du processus de la photosynthèse. D'autre part, elles sont présentes en grande quantité dans les matrices naturelles (jus de fruits, miels, ...) et dans les plantes sous forme de métabolites de stockage (amidon et saccharose principalement) et de structure (cellulose). Depuis les travaux de Rossmann *et al.* [49, 68], aucune méthode n'a été mise au point pour la détermination de la teneur site-spécifique en  $^{13}\text{C}$  des sucres, malgré leur rôle primordial dans le processus de photosynthèse et comme réserve d'énergie chez les plantes. La RMN  $^{13}\text{C}$ , combinée à la spectrométrie de masse de rapports isotopiques, permet l'obtention de cette information (cf. Chapitre 1; paragraphe 2.4.3).

Ce chapitre présente une étude de faisabilité pour la détermination des déviations isotopiques intramoléculaires dans les molécules de glucose, fructose et saccharose par RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative. Dans un premier temps nous rappellerons les contraintes liées à l'analyse de composés par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique. Nous aborderons ensuite les critères essentiels permettant de rendre possible l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du glucose, du fructose et du saccharose. Enfin, les premiers résultats seront présentés et une étude de répétabilité sera effectuée.

### 1.2 Rappel des contraintes associées à la mesure RMN $^{13}\text{C}$ isotopique

Les contraintes associées à la détermination des déviations isotopiques site-spécifique  $\delta_i^{13}\text{C}$  par RMN  $^{13}\text{C}$  sont les suivantes (cf. chapitre 1 ; paragraphe 2.4.3):

- Le délai de retour à l'équilibre (TR) doit être de  $10.T_1^{13}\text{C}$  avec  $T_1^{13}\text{C}$  le temps de relaxation longitudinale  $^{13}\text{C}$  le plus long de la molécule.

- La durée d'échantillonnage du signal (AQ) ne doit pas excéder le  $T1^{13C}$  le plus court de la molécule.
- Le profil d'impureté(s) en terme de déplacements chimiques RMN  $^{13}C$  doit être défini. Si les signaux RMN  $^{13}C$  d'une impureté présente dans l'échantillon sont suffisamment éloignés de ceux du produit d'intérêt, la présence de cette impureté n'aura d'effet que sur le rapport signal sur bruit (donc sur la sensibilité) et potentiellement sur les temps de relaxation longitudinale  $T1^{13C}$  de la molécule d'intérêt. En revanche, si un des signaux de cette impureté se trouve au même déplacement chimique RMN  $^{13}C$  qu'un des signaux du produit d'intérêt, la mesure est fautive, non seulement sur le signal en question mais potentiellement sur tous les autres (utilisation des fractions molaires réduites).
- Les satellites doivent être suffisamment séparés du signal d'intérêt.
- Le rapport signal sur bruit S/B est lié à la précision de la technique : plus le S/B est élevé, plus grande est la précision.

### **1.3 Exigences associées à la mesure de la distribution isotopique intramoléculaire des sucres (glucose, fructose, saccharose) par RMN $^{13}C$**

Nous allons dans ce paragraphe établir le cahier des charges à respecter afin de rendre possible l'analyse RMN  $^{13}C$  de ces sucres. Trois objectifs concomitants ont été retenus lors de la mise en place de cette méthode :

- Séparation des molécules d'intérêt (glucose – fructose- saccharose), l'analyse de ces trois composés sans séparation préalable n'étant pas envisageable ;
- Purification de ces molécules, la pureté des produits à analyser par RMN  $^{13}C$  étant primordiale ;
- Analyse RMN  $^{13}C$  quantitative des molécules après séparation et purification

La prise en compte et la résolution de problèmes liés à chacune de ces contraintes est nécessaire pour respecter l'aspect quantitatif de l'analyse RMN  $^{13}C$  du glucose, fructose et saccharose.

#### **1.3.1 Séparation des molécules d'intérêt**

Deux techniques sont envisageables pour la séparation du saccharose à partir d'un mélange fructose/glucose/saccharose. La première est la Chromatographie en phase Liquide

Haute Performance, HPLC, sur phase  $\text{NH}_2$  par exemple [69]. Cette dernière permet la séparation des trois sucres, glucose, fructose et saccharose. En utilisant cette technique dans des conditions semi-préparative ou préparative, le produit peut être obtenu par fractions de quelques dizaines de milligrammes à 100 milligrammes. Cette séparation s'avèrerait donc longue et coûteuse à mettre en place. Une colonne chromatographique de charbon actif et de célite peut être utilisée pour séparer le saccharose d'un tel mélange [70, 71]. Dans ce cas, la masse de produit séparé peut atteindre plusieurs grammes. Cependant, cette technique ne permet pas la séparation du glucose et du fructose quand ceux-ci sont présents dans un mélange. L'utilisation de l'HPLC peut être envisagée pour effectuer cette séparation mais, là encore, celle-ci s'avèrerait coûteuse.

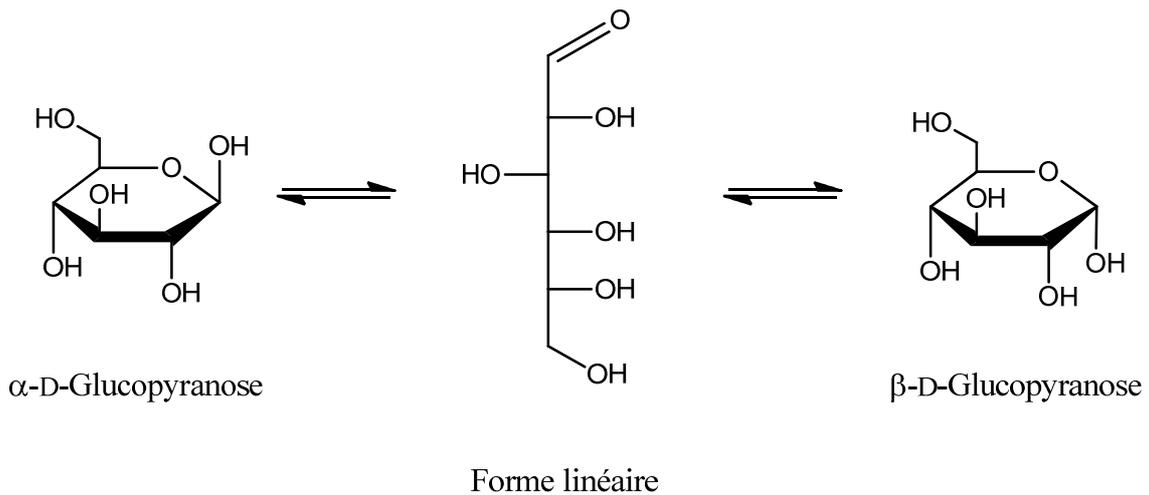
### 1.3.2 Purification des molécules d'intérêt

La pureté est un critère essentiel lors de la détermination des déviations isotopiques sur chaque site d'une molécule par RMN  $^{13}\text{C}$ . Une fois les sucres d'intérêt séparés, la pureté des composés à analyser doit être élevée, comme mentionné dans le chapitre 1 (paragraphe 2.4.3.1) et dans le paragraphe 1.2 de ce chapitre.

Dans le cadre de notre étude, nous pourrions être amenés à travailler sur des sucres (glucose, fructose, saccharose) issus de matrices naturelles (jus de fruits, miels, etc). Leur purification apparaît donc primordiale. L'obtention du saccharose pur peut s'effectuer par recristallisation, comme effectué dans l'industrie. Dans le cas du glucose et du fructose, même si leur séparation est envisagée par Chromatographie Liquide Haute Performance, la recristallisation peut s'avérer longue et fastidieuse [72, 73]. De plus, leur analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique est impossible du fait du phénomène de mutarotation. C'est l'objet du paragraphe suivant.

### 1.3.3 Analyse RMN $^{13}\text{C}$ des molécules d'intérêt

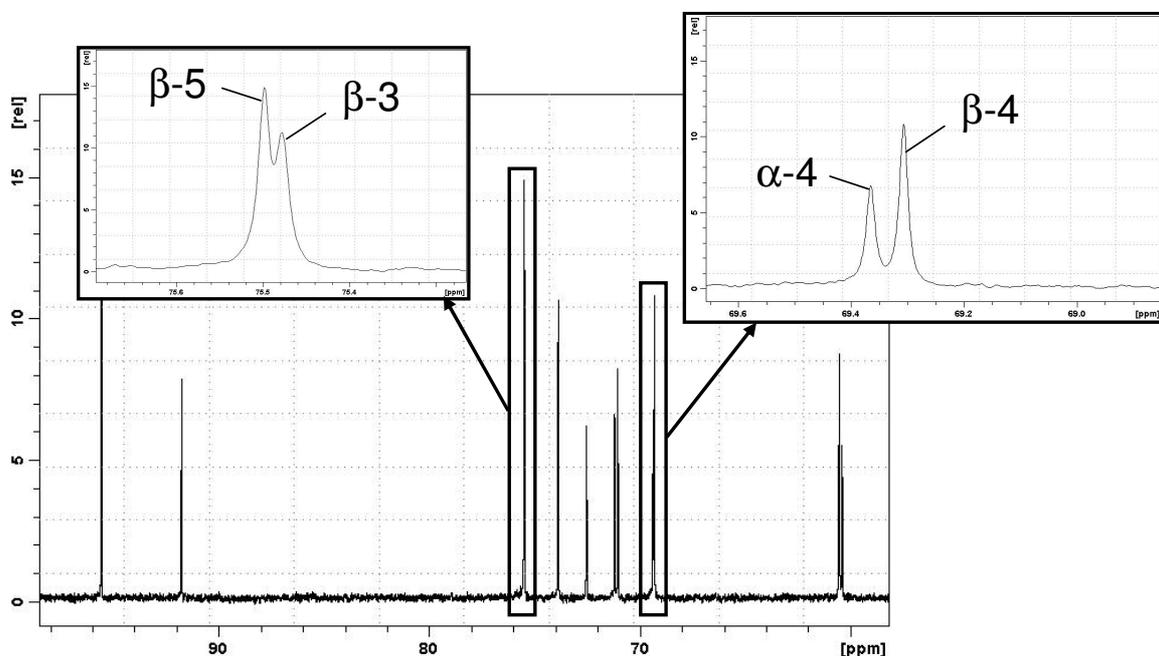
Lorsqu'un sucre réducteur est solubilisé, il se produit un phénomène d'équilibre entre la forme  $\alpha$ -pyranose et la forme  $\beta$ -pyranose, pour le glucose. La transformation de la forme  $\alpha$ -pyranose à la forme  $\beta$ -pyranose inclut un passage par la forme acyclique (Figure 18) [74, 75]. Ce phénomène porte le nom de mutarotation. La proportion des formes  $\alpha$  et  $\beta$  peut varier selon le solvant (eau [76], DMSO [77]) et la température. Quoi qu'il en soit, aucun solvant ne permet d'obtenir une seule forme en solution pour le glucose. Le fructose, sucre réducteur, est lui aussi soumis au phénomène de mutarotation [75].



**Figure 18. Equilibre mutarotationnel du glucose en solution.**

L'équilibre entre les formes  $\alpha$  et  $\beta$ -pyranose nécessite un passage par la forme acyclique (linéaire) du glucose.

Le phénomène de la mutarotation induit donc l'apparition de 12 signaux sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du glucose en solution, correspondant aux 6 pics des formes  $\alpha$ -glucopyranose et  $\beta$ -glucopyranose. La quantification des 12 signaux présents simultanément est impossible car un recouvrement trop important est observé sur certains signaux (Figure 19).



**Figure 19. Spectre RMN $^{13}\text{C}$  découplé du proton du D-glucose dans  $\text{D}_2\text{O}$  à 303K.**

Le zoom représente les signaux RMN  $^{13}\text{C}$  correspondant aux carbones C-3, C-4 et C-5 de la forme  $\beta$ -D-glucopyranose et au carbone C-4 de la forme  $\alpha$ -D-glucopyranose.

Le saccharose ne possédant pas d'extrémité réductrice, il est potentiellement analysable par RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative, à condition de choisir un solvant pour lequel les raies soient suffisamment séparées et suffisamment fines pour pouvoir être quantifiées dans des conditions permettant une précision adéquate.

## 1.4 Nécessité de la dérivation des sucres

L'analyse des sucres sans modification préalable s'avère donc impossible au vu des trois contraintes évoquées dans le paragraphe précédent : séparation, purification, et analyse RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative. Il a donc fallu envisager un moyen de préparer ces échantillons qui permette de lever ces contraintes. Une étude similaire ayant été effectuée pour l'analyse du glucose et du fructose par RMN  $^2\text{H}$ , notre travail s'appuie dans un premier temps sur la stratégie développée dans cette étude. Cette approche, développée au départ par Schleucher *et al.* (1999) [78] pour la mesure RMN  $^2\text{H}$  du glucose d'amidon et de saccharose, utilise la transformation du glucose en un dérivé acétonide, en trois étapes (Figure 20) [78]. Ce protocole ayant pour but d'analyser uniquement le glucose contenu dans l'amidon ou le saccharose, les auteurs ne traitent pas de l'obtention d'un dérivé issu du fructose dans un premier temps.

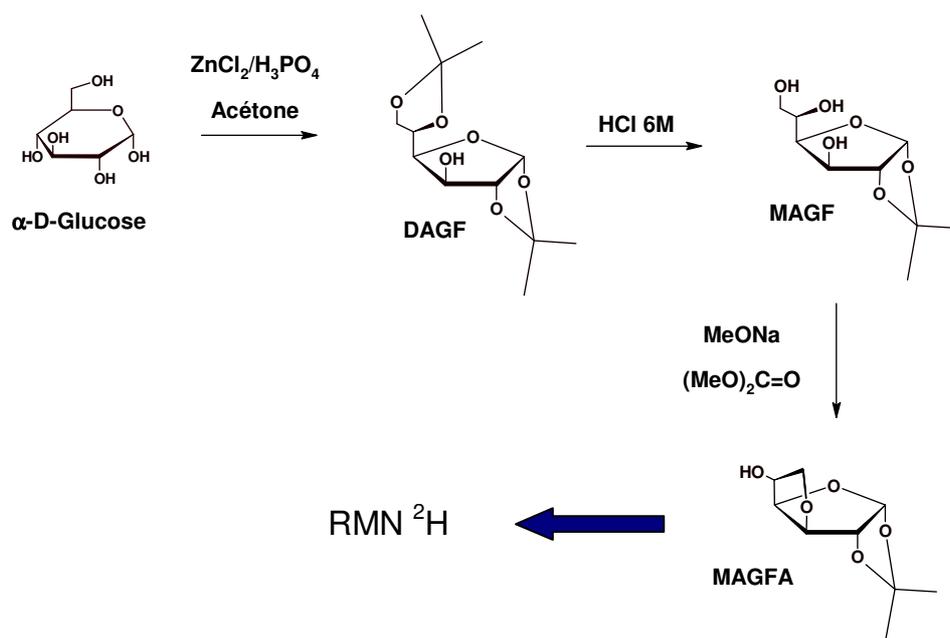
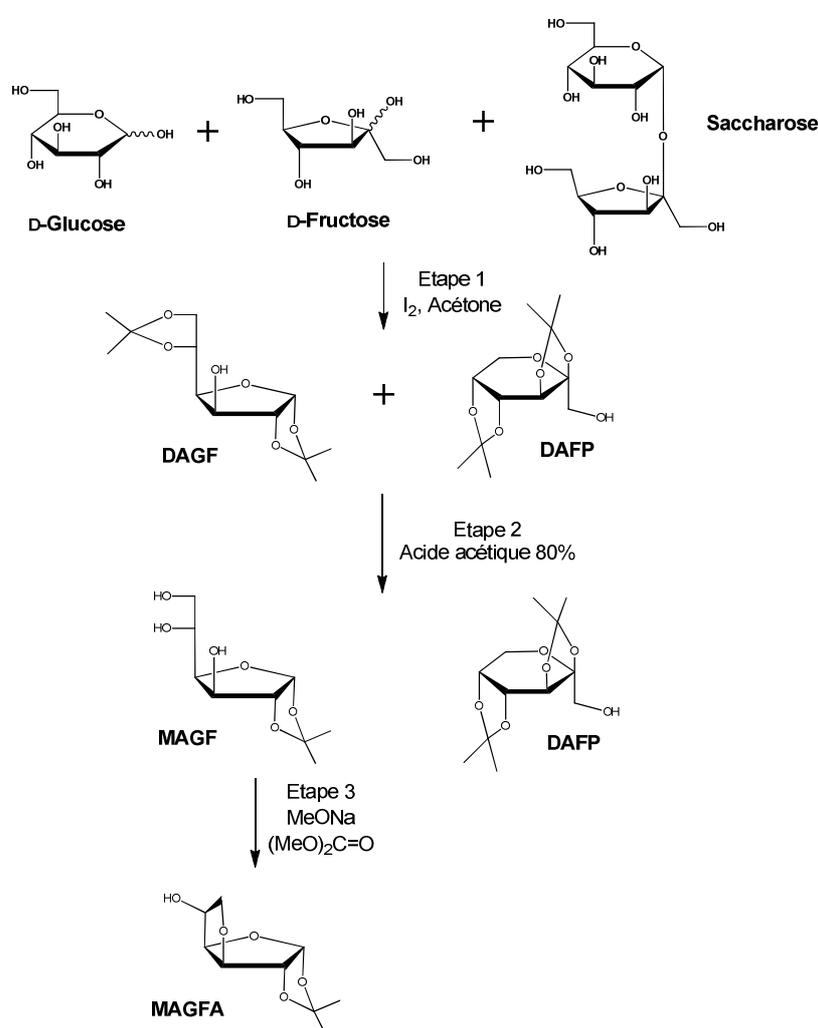


Figure 20. Dérivation du glucose pour son analyse par RMN  $^2\text{H}$  (d'après Schleucher *et al.*, 1999 [78]).

DAGF: 1,2;5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucopyranose ; MAGF: 1,2-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucopyranose; MAGFA : 3,5-anhydro-1,2-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucopyranose.

Des travaux réalisés au laboratoire par Zhang *et al.* (2002) [79] ont permis de mettre au point un protocole permettant, en plus de s'affranchir de la mutarotation des sucres en solution par la formation de composés acétonides, d'analyser séparément le glucose et le fructose par RMN  $^2\text{H}$ . Lors de la première étape de dérivation, le saccharose est hydrolysé en glucose+fructose. Ces deux molécules sont ensuite transformées en deux produits, le DAGF et le DAFP, dérivés du glucose et du fructose, respectivement (Figure 21). Les dérivés formés à la première étape de dérivation peuvent être séparés par extraction liquide-liquide, après hydrolyse sélective du DAGF en MAGF (étape 2 ; Figure 21). C'est donc sur cette base que les travaux pour la détermination des teneurs isotopiques par RMN  $^{13}\text{C}$  sur le glucose, le fructose et le saccharose ont été engagés.



**Figure 21. Dérivation du saccharose ou d'un mélange glucose/fructose pour l'analyse par RMN  $^2\text{H}$  adapté de Zhang *et al.* (2002) [79].**

La dernière étape permet la séparation du dérivé du glucose MAGF par extraction liquide/liquide (cf. partie expérimentale). DAGF : 1,2;5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucopyranose ; MAGF : 1,2-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucopyranose ; MAGFA : 3,5-anhydro-1,2-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucopyranose.

## 2 Résultats et discussion

### 2.1 Analyse directe du saccharose par RMN $^{13}\text{C}$

Comme mentionné précédemment, l'analyse du saccharose pur peut être envisagée par RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative. Celui-ci n'est pas soumis au phénomène de mutarotation. Une étude préliminaire sur ce composé est donc d'un intérêt certain pour l'orientation de la méthodologie. Les temps de relaxation RMN  $^{13}\text{C}$  ont donc été mesurés sur un saccharose pur dans les conditions définies dans la partie expérimentale (paragraphe 4.3). Ces conditions tiennent compte à la fois de la largeur des raies à mi-hauteur et de la séparation des signaux. Le temps de relaxation longitudinale  $T_1$   $^{13}\text{C}$  le plus long, mesuré pour le carbone 1 du groupement fructosyle (carbone quaternaire), est de 6,3 secondes. Le nombre de scans nécessaires pour obtenir un rapport S/B de 700 est estimé à 4000. Dès lors, le temps d'analyse du saccharose serait d'environ 210 heures pour un échantillon (à raison de 3 spectres par échantillon). L'analyse directe du saccharose est dès lors proscrite par un temps d'analyse beaucoup trop long. Ce dernier devra donc être analysé en utilisant la dérivation qui permet l'obtention du DAGF et du DAFP à partir du saccharose à la première étape (Figure 21).

### 2.2 Choix de la méthodologie

Dans un premier temps, une dérivation en une seule étape a été envisagée. Celle-ci conduit à la formation du 1,2;5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose, DAGF (dérivé du glucose), et du 2,3;4,5-di-*O*-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose, DAFP (dérivé du fructose) (Figure 21). La séparation de ces deux composés a été envisagée sur colonne de gel de silice mais le taux de recouvrement pour obtenir un produit pur est de l'ordre de 20% en masse par rapport au produit de départ. Cette séparation n'est pas adaptée au but de notre étude puisqu'un fractionnement isotopique contre le  $^{13}\text{C}$  sur colonne de gel de silice peut être attendu [80]. La deuxième étape de la dérivation consiste en l'hydrolyse sélective d'un des groupements acétonides du DAGF. A la fin de cette étape, deux composés sont présents dans le milieu réactionnel : le 1,2-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose, MAGF, et le DAFP (Figure 21). Ces deux composés sont séparables par une extraction liquide/liquide. Il est donc nécessaire de réaliser cette deuxième étape pour séparer les dérivés du glucose et du fructose, sous forme de MAGF et DAFP.

## 2.3 Rendements sur la dérivation

Il convient, après avoir défini la stratégie à suivre pour obtenir ces composés (dérivation en deux étapes) de s'assurer de la viabilité des dérivés obtenus en termes (i) d'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  (allure des spectres, solubilité, temps de relaxation  $T1$   $^{13}\text{C}$ , ...) et (ii) de fractionnement isotopique éventuel (rendements lors de la synthèse et de la purification). Dans un premier temps, la méthode est évaluée sur des produits purs d'origine connue. La dérivation a donc été effectuée sur un glucose commercial de maïs (C4), un fructose commercial C3 et un saccharose de betterave (C3).

Les rendements sur la dérivation en MAGF et DAFP sont regroupés dans le Tableau 6. Ceux-ci sont calculés par rapport à la masse théorique de produit attendu en estimant ce produit pur. Notons que lorsque la dérivation est effectuée à partir du fructose pur, une seule étape est nécessaire à l'obtention du DAFP.

**Tableau 6. Rendements obtenus lors de la dérivation à partir du glucose, du fructose ou du saccharose.**

<b>Produit de départ</b>	<b>DAGF + DAFP (%)<sup>a</sup></b>	<b>MAGF (%)<sup>a</sup></b>	<b>DAFP (%)<sup>a</sup></b>
<b>Glucose</b>	90	78	-
<b>Fructose</b>	90	-	90
<b>Saccharose</b>	88	90	76

<sup>a</sup>Les rendements sont donnés en pourcentage par rapport à la masse théorique de produit attendue.

Les rendements des produits formés sont supérieurs à 88% pour la première étape quelque soit le produit de départ. En partant du glucose pur, un rendement total (sur les deux étapes) de 78% est obtenu. Un rendement plus faible est observé pour le dérivé du fructose, DAFP, lorsque le saccharose est utilisé comme sucre de départ (76% sur 2 étapes). Ce faible rendement semble être compensé par un rendement plus élevé pour le dérivé provenant de la partie glucosyle du saccharose, MAGF (90% sur deux étapes) lors de la même synthèse. Cet aspect est dû à la formation d'un sous-produit issu du fructose lors de la dérivation. Ceci est développé dans le paragraphe 2.5.

## 2.4 Attribution des signaux des dérivés en RMN $^{13}\text{C}$

L'attribution des signaux des différents sites carbonés des dérivés MAGF et DAFP a été effectuée par un ensemble d'expérience RMN 1D et 2D (Figure 22 et Figure 23). Seuls les signaux correspondant aux parties glucose et fructose du MAGF et du DAFP, respectivement, sont d'intérêt pour notre étude.

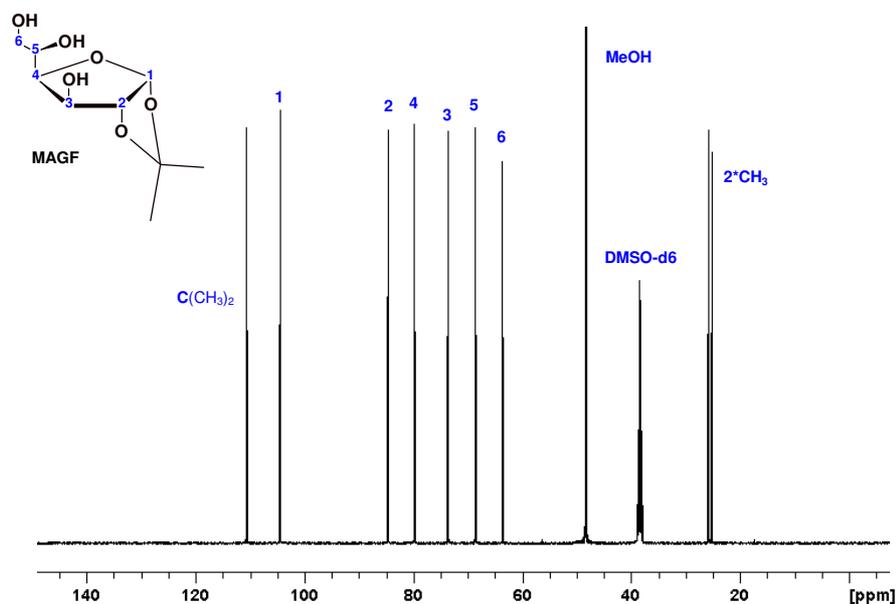


Figure 22. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  découplé  $^1\text{H}$  du MAGF dans un mélange DMSO- $d_6$ /MeOH (cf. partie expérimentale ; paragraphe 4.3).

La numérotation utilisée est la notation conventionnelle du glucose.

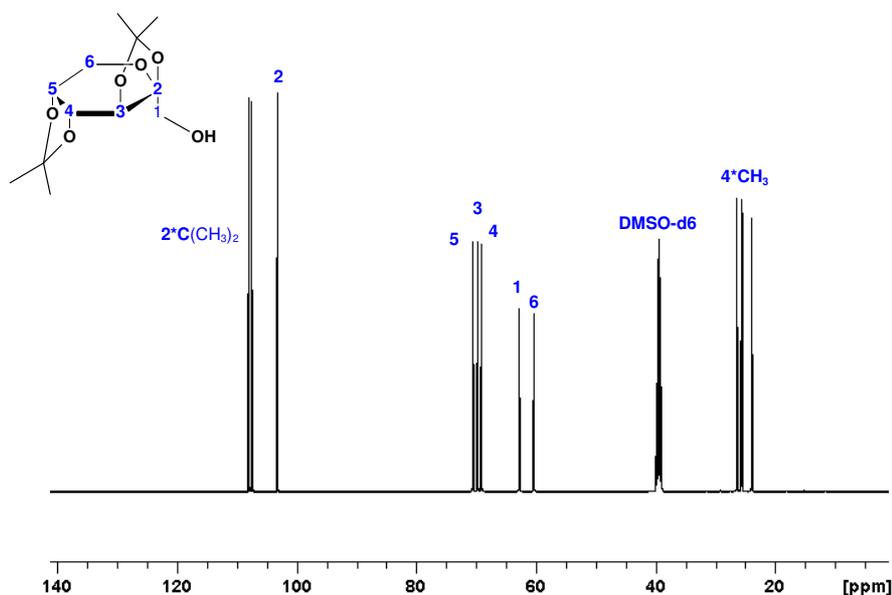


Figure 23. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  découplé  $^1\text{H}$  du DAFP dans le DMSO- $d_6$  (cf. partie expérimentale; paragraphe 4.3).

La numérotation utilisée est la notation conventionnelle du fructose.

Les signaux d'intérêt du MAGF (C-1 à C-6) sont suffisamment séparés pour être quantifiés sans recouvrement. Ceux du DAFP, en revanche, ne sont pas tous idéaux pour un lissage adéquate : les pics C-3, C-4 et C-5 sont très proches.

## 2.5 Profils d'impuretés

La pureté des échantillons dérivés (MAGF et DAFP) après purification a été évaluée par RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  (découplé du proton)<sup>a</sup>. La présence d'impureté n'est pas observée sur MAGF issu du glucose pur. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du dérivé du fructose après recristallisation montrent en revanche la présence d'une impureté, dont la quantité équivaut à environ 20% du DAFP. Lorsque le saccharose est utilisé comme produit de départ, le DAFP apparaît pur mais le MAGF contient une impureté présente à environ 20 % du produit d'intérêt (Figure 24).

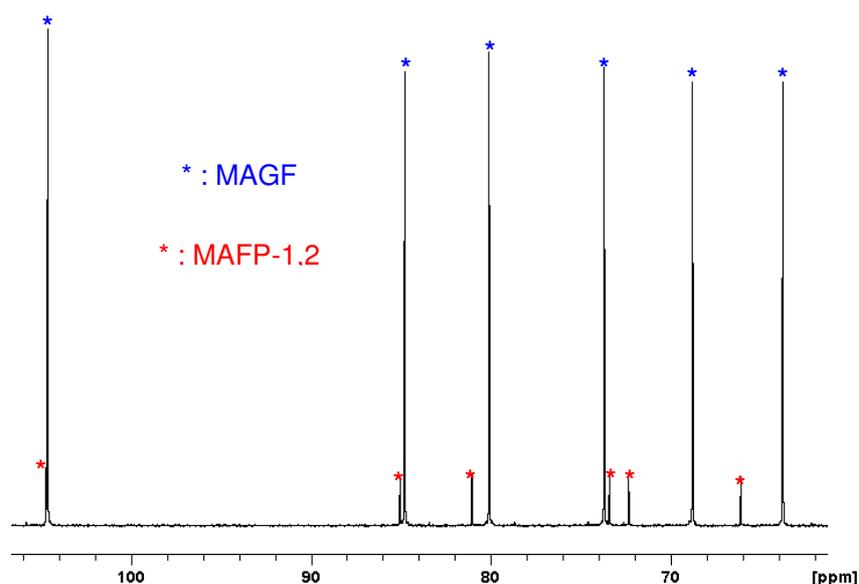
**Tableau 7. Pureté des produits obtenus lors de la dérivation à partir du glucose, du fructose ou du saccharose.**

Produit de départ	MAGF	DAFP
Glucose	Pur	-
Fructose	-	≈ 20% d'impureté
Saccharose	≈ 20% d'impureté	Pur

Il apparaît qu'un sous-produit se forme au cours de la dérivation. Ce sous-produit proviendrait du fructose (à partir du glucose pur, aucune impureté n'est observée sur le MAGF) et apparaîtrait à la première étape de dérivation (lorsque la dérivation est réalisée à partir du fructose pur en une seule étape, ce sous-produit est présent à environ 20% du DAFP).

La présence de ce sous-produit explique les rendements obtenus avec le saccharose comme produit de départ. Ce sous-produit, après hydrolyse lors de la deuxième étape, reste préférentiellement dans la phase aqueuse avec pour effet de (i) contaminer le MAGF résultant de cette dérivation et (ii) augmenter le rendement apparent de dérivation sur le MAGF et diminuer celui sur le DAFP (Tableau 6).

<sup>a</sup> Les analyses RMN  $^{13}\text{C}$  effectuées dans cette thèse sont toutes découplées du proton. Nous omettrons donc cette indication par la suite pour des raisons de lisibilité.



**Figure 24. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  découplé  $^1\text{H}$  du MAGF issu de la dérivation du saccharose. Le produit (MAGF) est pollué par l'apparition d'un dérivé non désiré du fructose (MAFP-1,2).**

La présence du sous-produit n'est pas gênante pour la détermination des  $\delta_i^{13}\text{C}$  mais peut être pénalisante pour la précision (rapport S/B diminué).

Ce sous-produit est décrit dans la littérature comme un dérivé acétonide du fructose, le 1,2;4,5-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-fructopyranose (appelé DAFP-1,2 par la suite) [81, 82]. Celui-ci peut s'hydrolyser sélectivement en monoacétonide (MAFP-1,2) lors d'une hydrolyse à l'acide acétique à 80 % dans l'eau [81]. Ce sous-produit est décrit comme le produit cinétique de la réaction de dérivation, formé préférentiellement à température ambiante alors que le DAFP est le produit thermodynamique, formé préférentiellement à plus haute température [81].

Le fait d'ajouter le diiode à la réaction lorsque le milieu réactionnel atteint une température suffisamment élevée (60°C), permet de limiter l'apparition de ce sous-produit à une proportion d'environ 10% du produit d'intérêt.

Lorsque le fructose pur est utilisé comme produit de départ, le mélange du DAFP et du DAFP-1,2 obtenu après la première étape de dérivation peut être traité à l'acide acétique à 80% dans l'eau, puis par extraction liquide-liquide (étape 2 du protocole expérimental, p. 80) afin d'obtenir le DAFP pur. Cependant lorsque le produit de départ est le saccharose, le sous-produit issu du fructose, MAFP-1,2 est difficilement isolable du MAGF par colonne de gel de silice. De plus, des tests ont été effectués pour tenter de recristalliser le MAGF mais sans résultats.

Dans le contexte de notre étude, la proportion de ce sous-produit par rapport aux produits d'intérêt (MAGF et DAFP) peut avoir plusieurs limitations. D'une part, même si ce sous-produit est suffisamment éloigné du MAGF en terme de déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$ , sa présence en trop grande quantité altère le rapport signal sur bruit du spectre en question, et par là même diminue la précision sur la mesure. D'autre part, la formation de ce sous-produit peut être source de fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  et donc conduire à des valeurs des déviations isotopiques mesurées sur le DAFP ne reflétant pas celles du fructose de départ. Il conviendra donc, par la suite, de travailler dans les conditions où ce sous-produit est formé en proportion la plus faible possible par rapport au DAFP (ajout du diiode à 60°C).

## 2.6 Mise au point des conditions d'analyse RMN $^{13}\text{C}$ et de traitement des spectres

### 2.6.1 Temps de relaxation longitudinale T1 $^{13}\text{C}$ et durée d'expérience pour la mesure RMN $^{13}\text{C}$ quantitative du MAGF et du DAFP

Une fois le protocole de synthèse établi pour l'obtention du MAGF et du DAFP, les temps de relaxation longitudinale T1  $^{13}\text{C}$  ont été mesurés pour tous les signaux de ces molécules dans les conditions de préparation établies dans le Tableau 8. Deux mélanges de solvants différents ont été utilisés pour l'analyse du MAGF. Le premier est constitué de DMSO et d'acétone- $\text{d}_6$  et le deuxième de DMSO- $\text{d}_6$  et de méthanol. Dans un premier temps, nous considérerons uniquement le premier mélange de solvants (Tableau 8 ; colonne 2). L'utilisation du deuxième mélange est explicitée dans le paragraphe 2.7.

**Tableau 8. Conditions de préparation, temps de relaxation T1  $^{13}\text{C}$  le plus long de la molécule et durée d'expérience pour les mesures RMN  $^{13}\text{C}$  du MAGF et du DAFP.**

Produit étudié	MAGF	MAGF	DAFP
Masse de produit (mg)	300	150	300
Solvant(s)	DMSO (300 $\mu\text{L}$ ) Acétone- $\text{d}_6$ (300 $\mu\text{L}$ )	DMSO- $\text{d}_6$ (300 $\mu\text{L}$ ) MeOH (400 $\mu\text{L}$ )	Relaxant à 0,1 M dans Acétone- $\text{d}_6$ (600 $\mu\text{L}$ )
Température (K)	303	308	303
T1 $^{13}\text{C}$ le plus long (s)	0,9	1,4	2,5
Temps d'expérience (heures) <sup>a</sup>	12	20	30

<sup>a</sup> Le temps d'expérience tient compte des 5 spectres effectués par mesure. Le rapport signal sur bruit (S/B) obtenu dans ces conditions est de 700 quelque soit le produit considéré.

L'ajout d'un agent relaxant (TrisAcétylacétonate de Chrome(III) ;  $\text{Cr}(\text{Acac})_3$ ) est nécessaire pour la mesure du DAFP. Cet agent permet une réduction du temps de relaxation  $T1^{13}\text{C}$  du carbone quaternaire (carbone dont le  $T1^{13}\text{C}$  est limitant pour la mesure), et donc une diminution du temps de mesure.

Les conditions d'acquisition RMN  $^{13}\text{C}$  ont ainsi pu être déterminées pour chaque molécule (délai de retour à l'équilibre TR, nombre de scans NS, durée d'échantillonnage du signal AQ). Ces paramètres sont regroupés dans l'annexe 5 et dans le paragraphe 4.3.2.

Deux mesures ont ensuite été réalisées : une première sur le MAGF dérivé d'un glucose de maïs (C4), et une deuxième sur le DAFP dérivé d'un fructose commercial C3. Celles-ci ont été réalisées dans les conditions standard de préparation de l'échantillon et d'analyse RMN  $^{13}\text{C}$ . Le rapport signal sur bruit obtenu dans les conditions décrites dans la partie expérimentale est de 700, conduisant à une durée d'analyse de 12 heures (pour 5 spectres) pour le MAGF et de 30 heures (pour 5 spectres) pour le DAFP (Tableau 8).

Le temps d'expérience nécessaire à la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative du MAGF est raisonnable pour une analyse en routine. En revanche, le temps d'expérience nécessaire pour la mesure du DAFP est plus restrictif en terme d'occupation des spectromètres (30 heures par échantillon ; cf. Tableau 8). A titre d'exemple, si une série de DAFP doit être analysé pendant un week-end, seuls deux échantillons pourront être analysés. De plus, comme toute technique analytique, l'analyse d'un échantillon de référence pour chaque série d'analyse est nécessaire pour évaluer la fiabilité du spectromètre lors de cette analyse. Dans ces conditions seul un échantillon, autre que la référence, peut être analysé lors d'une série d'analyse du DAFP.

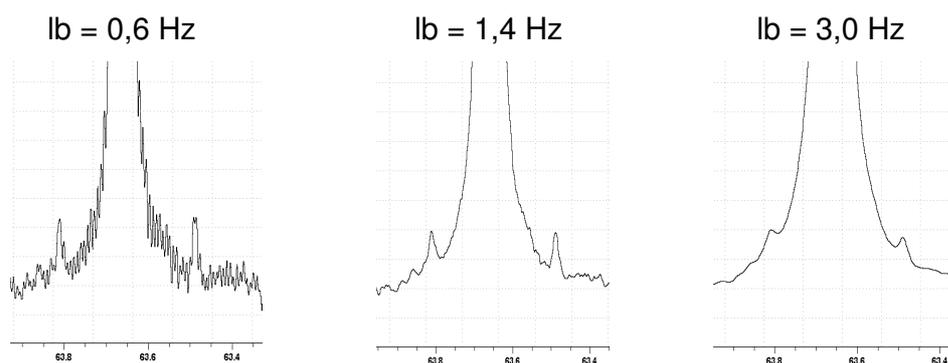
### **2.6.2 Influence du paramètre lb de la fonction d'apodisation de type exponentielle sur l'allure des signaux RMN $^{13}\text{C}$**

Avant la transformée de Fourier, le signal de précession libre (FID pour Free Induction Decay) est multiplié par une fonction d'apodisation. Cette fonction permet de s'affranchir des effets de troncature sur les signaux. La fonction d'apodisation utilisée en RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique est une fonction exponentielle de formule :

$$h(t) = e^{-\pi \cdot lb \cdot t} \quad (29)$$

Où lb représente le facteur d'élargissement de la raie (augmentation de 2 Hz de la largeur à mi-hauteur pour un lb égal à 2, par exemple). Le choix du lb gouverne la largeur à mi-hauteur des raies (plus le lb est grand, plus les raies sont larges). Un lb faible pose problème au niveau de la troncature du FID, c'est-à-dire de la déformation d'un signal donné

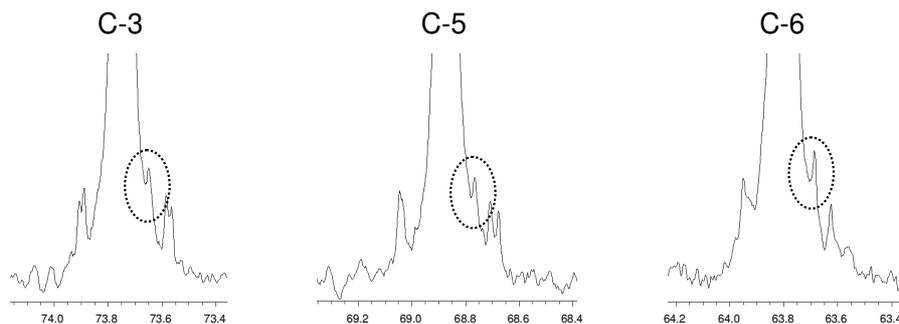
après transformée de Fourier. En revanche, un  $lb$  trop élevé conduit à des raies trop larges et donc à une mauvaise séparation des satellites et à un mauvais rapport signal sur bruit. En théorie, la valeur optimale du  $lb$  est la largeur naturelle à mi-hauteur de la raie. En pratique, la valeur du paramètre  $lb$  est choisie un peu plus grande que la largeur naturelle à mi-hauteur, de manière à compenser les déformations des pics dues aux instabilités de l'appareillage, tout en respectant le compromis entre une largeur à mi-hauteur et une troncature suffisamment faibles (Figure 25).



**Figure 25. Effet du paramètre de la fonction d'apodisation  $lb$  sur la forme d'une raie RMN  $^{13}\text{C}$ .** Le paramètre  $lb$  doit être choisi de manière à éviter une troncature trop importante ( $lb$  petit) et à obtenir une bonne résolution entre le pic central et ses satellites. Dans notre cas, le  $lb$  optimum est de 1,4 Hz.

## 2.7 Influence des conditions de préparation du MAGF sur l'allure des spectres RMN $^{13}\text{C}$

Lors de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du MAGF dans le premier mélange de solvants (DMSO + acétone- $d_6$ ; Tableau 8), 3 pics additionnels sont observés sur le spectre (Figure 26). Leur intensité est du même ordre de grandeur que celle des satellites (environ 0,5% du pic central). Les signaux concernés par ces pics additionnels sont ceux des carbones portant les fonctions hydroxyles (C-3, C-5 et C-6 du MAGF). Les mêmes signaux additionnels sont observés au voisinage des signaux correspondant aux carbones portant les fonctions hydroxyles du DAGF et du DAFP dans l'acétone- $d_6$ . Il apparaît clairement que les fonctions hydroxyles jouent un rôle dans la présence de ces signaux.



**Figure 26. Signaux RMN  $^{13}\text{C}$  correspondant aux carbones C-3, C-5 et C-6 du MAGF dans un mélange DMSO/acétone- $\text{d}_6$ .**

Les cercles en pointillés indiquent les pics additionnels observés dans ce mélange.

L'utilisation d'un mélange de solvants contenant du méthanol (Tableau 8) permet de s'affranchir des pics additionnels observés précédemment. Nous avons identifié ces pics comme étant dû à un effet de substitution isotopique H/D sur le déplacement chimique en RMN  $^{13}\text{C}$ . Ce phénomène est discuté dans le chapitre 3. Les temps de relaxation ont été mesurés dans ce nouveau mélange de solvants. Le fait de s'affranchir de l'apparition des pics supplémentaires implique une augmentation du temps d'expérience (12 heures par échantillon dans le mélange de solvants précédent contre 20 heures pour le mélange de solvants utilisant du méthanol ; Tableau 8).

## 2.8 Répétabilité

Une fois les conditions de mesure RMN  $^{13}\text{C}$  mises en place sur les produits dérivés, la répétabilité est évaluée au niveau instrumental et au niveau de la dérivation. Cette étude de répétabilité a pour but d'évaluer la contribution de la dérivation (fractionnement isotopique, pureté des produits) en terme de variabilité sur les déviations isotopiques obtenues par rapport à la mesure RMN  $^{13}\text{C}$ .

### 2.8.1 Répétabilité RMN $^{13}\text{C}$

La répétabilité de la technique RMN  $^{13}\text{C}$  est évaluée sur un échantillon de MAGF dérivé à partir d'un glucose de maïs C4. La moyenne et les écarts types sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurés par RMN  $^{13}\text{C}$  sont obtenus à partir de 4 mesures dans les mêmes conditions de préparation et d'analyse. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Répétabilité sur les mesures de  $\delta_i^{13}\text{C}$  effectuées par RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative sur un échantillon de MAGF issu d'un glucose de maïs (C4).**

MAGF	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\delta_i^{13}\text{C}$ Moyen (‰) <sup>a,b</sup>	-8,3	-8,9	-6,2	-10,6	-13,2	-10,6
Ecart type (‰) <sup>a</sup>	1,0	0,4	0,8	0,6	0,7	1,1

<sup>a</sup>Moyenne et écarts types calculés pour 4 répétitions dans les mêmes conditions de préparation de l'échantillon et de mesure RMN  $^{13}\text{C}$ .

<sup>b</sup>La composition isotopique globale est obtenue par SMRI sur le glucose de départ.

L'écart type sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur 4 mesures est, au maximum de 1,1 ‰ sur le C-6 du glucose. Cette valeur est en accord avec les exigences établies pour la technique et la répétabilité à long terme évaluée sur la vanilline (1‰) [37]. Le MAGF apparaît dès lors adapté à la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  pour la détermination des déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du glucose.

## 2.8.2 Répétabilité de synthèse

La répétabilité de synthèse sur la dérivation est évaluée à partir du glucose de maïs (C4). Trois dérivations sont effectuées sur ce même glucose et les échantillons sont analysés dans les conditions décrites dans la partie expérimentale (paragraphe 4.3). Globalement, l'écart type sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  est du même ordre de grandeur que pour la répétabilité liée à la RMN  $^{13}\text{C}$  (Tableau 10), suggérant que la dérivation en elle-même n'apporte pas de variabilité supplémentaire sur les valeurs des déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  déterminées par RMN  $^{13}\text{C}$ .

**Tableau 10. Répétabilité de synthèse sur les mesures de  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur le MAGF issu d'un glucose de maïs (C4).**

MAGF	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\delta_i^{13}\text{C}$ Moyen (‰) <sup>a,b</sup>	-8,0	-8,6	-6,5	-10,2	-13,6	-10,9
Ecart type (‰) <sup>a</sup>	0,3	0,6	0,9	0,5	0,2	1,2

<sup>a</sup>Moyenne et écarts types calculés pour 4 répétitions dans les mêmes conditions de préparation de l'échantillon et de mesure RMN  $^{13}\text{C}$ .

<sup>b</sup>La composition isotopique globale est obtenue par SMRI sur le glucose de départ.

L'analyse du dérivé du fructose est théoriquement envisageable dans les mêmes conditions de préparation que le MAGF (utilisation du méthanol pour s'affranchir des pics supplémentaires sur les carbones portant les fonctions hydroxyles). Cependant, la méthodologie présentée dans ce chapitre est une étude de faisabilité. Des améliorations peuvent être apportées, notamment pour réduire le temps d'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  des ces échantillons et permettre une purification plus aisée (recristallisation du dérivé du glucose, notamment). La répétabilité sur l'analyse du fructose ne peut être faite que sur une méthodologie prenant en compte ces aspects, décrite dans le chapitre 4.

### 3 Conclusion

Ce chapitre constitue une première approche pour la détermination de la distribution isotopique intramoléculaire en carbone 13 dans les molécules de glucose, fructose et saccharose. Deux difficultés majeures ont été rencontrées lors de la mise en place de la méthodologie :

- La formation d'un sous-produit issu du fructose (DAFP-1,2). Ce dernier, une fois hydrolysé en MAFP-1,2 pollue le MAGF formé lors de la dérivation à partir du saccharose et potentiellement, à partir d'un mélange de glucose et de fructose.
- l'apparition de pics additionnels sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des composés à étudier. Ce problème est développé plus en détail dans le chapitre 3.

Les rendements obtenus sur la dérivation du glucose sont satisfaisants et permettent de limiter le fractionnement isotopique lors de l'obtention des composés dérivés. Cependant, une étude complète doit être effectuée afin d'évaluer ce fractionnement et d'estimer l'impact de celui-ci sur les valeurs de déviations isotopiques obtenues par RMN  $^{13}\text{C}$ , notamment lors de la formation du sous-produit issu du fructose (DAFP-1,2).

Les premières mesures sont satisfaisantes en terme de répétabilité sur le glucose (1,1 ‰ d'écart type au maximum). Cependant, ce dérivé reste une molécule qui peut s'avérer difficile à purifier (pas de recristallisation possible), notamment dans le cas d'analyse du glucose provenant de matrices complexes. De plus, le choix restreint du solvant, régi par le phénomène responsable de l'apparition des pics additionnels sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , rend l'analyse relativement longue. Ces deux aspects (purification et temps d'analyse) nécessitent un complément d'étude pour obtenir une méthode applicable en routine sur un grand nombre d'échantillons. Ces aspects concernant l'amélioration de la méthodologie seront développés dans le chapitre 4.

## 4 Partie expérimentale

### 4.1 Origine des produits

La silice (63-200  $\mu\text{m}$ ), les plaques CCM (plaques sur feuilles d'aluminium, silice 60 F<sub>254</sub>), les solvants (acétone 99,9%, dichlorométhane 99%, acétate d'éthyle 99%, éther de pétrole 99% (40-65°C), éther diéthylique 99%, éthanol 99%, acide acétique 99%), le sulfate de magnésium  $\text{MgSO}_4$ , le thiosulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , le chlorure de sodium  $\text{NaCl}$ , le pentoxide de phosphore  $\text{P}_2\text{O}_5$  et le carbonate de sodium  $\text{NaHCO}_3$  ont été fournis par VWR. Le papier filtre utilisé pour filtrer les solutions dans les tubes RMN est de marque Kimwipes®.

Les échantillons de glucose, fructose, et saccharose proviennent de chez Sigma. Les solvants deutérés proviennent de la société Eurisotop.

Pour les étapes de purification, les solvants sont préalablement distillés.

### 4.2 Dérivation

Le protocole de dérivation est décrit ici pour le saccharose. Le protocole suivi pour le glucose ou fructose purs est le même.

#### 4.2.1 Première étape : isopropyldénation

2,5 g de saccharose sont broyés, séchés sur  $\text{P}_2\text{O}_5$  pendant une nuit sous vide avant d'être portés à reflux dans un ballon contenant 125 mL d'acétone et du  $\text{I}_2$  en quantité catalytique (0,05 éq.). La durée de cette réaction varie selon la qualité (teneur en eau, notamment) du produit de départ (généralement de 6 à 8h). Elle est suivie par Chromatographie sur Couche Mince (éluant : éther de pétrole / éther diéthylique 2:8 (v/v), révélation  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 % dans l'éthanol et chauffage au décapeur thermique).

A la fin de la réaction, et après refroidissement, le diiode est neutralisé par ajout d'une solution de thiosulfate à 0,1 M jusqu'à décoloration. La solution est évaporée puis reprise par 25 mL de solution de thiosulfate à 0,1 M et 75 mL de dichlorométhane. Après séparation la phase aqueuse est extraite par 2 fois 40 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et sont lavées par 100 mL d'une solution de  $\text{NaCl}$  à 10 %. La phase organique est ensuite séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et filtrée avant d'être évaporée à l'évaporateur rotatif. Une huile jaunâtre est obtenue.

#### 4.2.2 Deuxième étape : hydrolyse

Le résidu de la précédente étape est repris dans 80 mL d'acide acétique glacial et 20 mL d'eau, puis agité pendant 15 à 17 heures. Une fois la disparition totale du DAGF (observée

par CCM réalisée dans les mêmes conditions que pour l'étape précédente), la réaction est traitée : le milieu réactionnel est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif puis repris dans 100 mL d'eau distillée, extrait avec 2 fois 50 mL de dichlorométhane. La phase aqueuse est évaporée à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'un solide blanc, le MAGF, qui sera ensuite séché une nuit au dessiccateur sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec 2 fois 50 mL d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, puis 2 fois 50 mL d'eau distillée. Elles sont ensuite séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées pour obtenir le DAFP brut.

### 4.2.3 Purification des produits

Environ 1 g de MAGF est dissout dans 200 mL d'acétate d'éthyle préalablement distillé. Le mélange peut être légèrement chauffé (40 °C) pour faciliter la solubilisation du MAGF. A ce mélange sont alors ajoutés 10 g de Silice 63-200 µm. Le mélange ainsi obtenu est homogénéisé puis le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche. Celle-ci est reprise dans un minimum d'acétate d'éthyle et le gel formé est déposé sur une colonne de gel de silice (63-200 µm ; 60 g) préalablement conditionnée à l'acétate d'éthyle. L'élution est faite avec de l'acétate d'éthyle pur et le suivi de colonne se fait par CCM avec un éluant AcOEt/EtOH 95:5 (v/v).

Pour le DAFP, une recristallisation est effectuée à l'éther de pétrole (40-65 °C).

## 4.3 Analyse RMN <sup>13</sup>C des produits

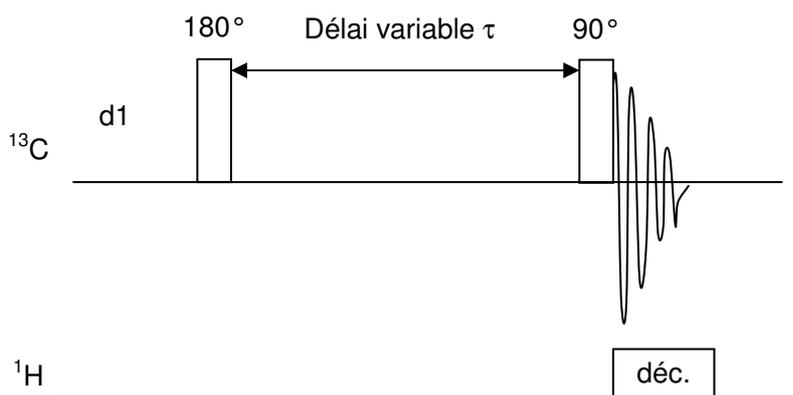
### 4.3.1 Préparation des tubes

Pour le MAGF et le DAFP, les produits sont pesés dans un pilulier de 4 mL et dissous dans le solvant ou le mélange de solvant comme indiqué dans le Tableau 8 (p. 73). Le mélange peut être légèrement chauffé au sèche-cheveux pour faciliter la solubilisation du composé.

Pour le saccharose, 150 mg sont dissous dans 600 µL d'eau et 100 µL de DMSO-d<sub>6</sub>. Le mélange obtenu est filtré sur papier filtre dans un tube RMN de 5 mm de diamètre externe.

### 4.3.2 Mesure des temps de relaxation longitudinale

La mesure des temps de relaxation longitudinale T1 <sup>13</sup>C est primordiale pour adapter les paramètres de mesure RMN <sup>13</sup>C quantitative à un échantillon. La mesure des T1 <sup>13</sup>C s'effectue à l'aide d'une séquence d'inversion-récupération (Figure 27). Une liste de délais variables τ est utilisée pour pouvoir déterminer les temps de relaxation longitudinale sur chaque site carboné d'intérêt.

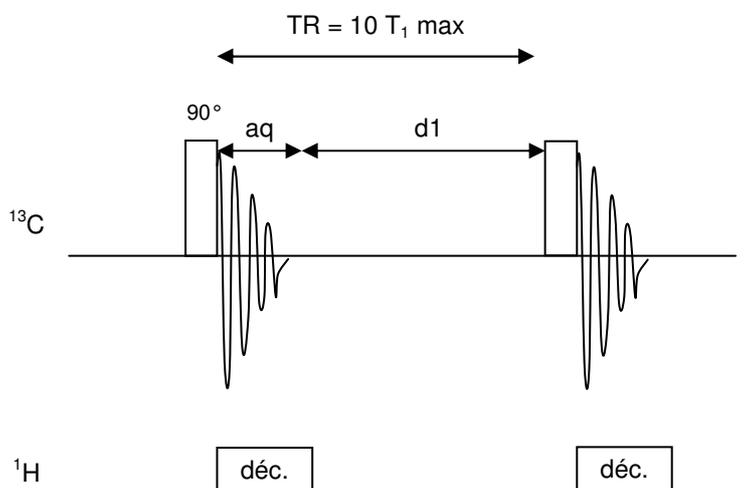


**Figure 27. Séquence utilisée pour la détermination des temps de relaxation longitudinale T<sub>1</sub>  $^{13}\text{C}$ .** La séquence consiste en une bascule de l'aimantation à 180° sur le canal  $^{13}\text{C}$  et une bascule de 90° après un délai variable  $\tau$ .

### 4.3.3 Paramètres pour l'analyse RMN $^{13}\text{C}$

Les mesures ont été effectuées à 303 K pour le DAFP, à 308 K pour le MAGF et à 313 K pour le saccharose.

Les expériences RMN ont été réalisées sur le spectromètre Bruker Avance DRX500 opérant à la fréquence  $^1\text{H}$  de 500,13 MHz et  $^{13}\text{C}$  de 125,76 MHz équipé d'une sonde double accord 5 mm dual ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) avec lock  $^2\text{H}$ . Les expériences ont été réalisées avec une vitesse de rotation des tubes de 20 Hz.



**Figure 28. Séquence utilisée pour la détermination des fractions molaires réduites  $f_i/F_i$  par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique.**

La séquence consiste en une bascule de l'aimantation (90°) sur le canal  $^{13}\text{C}$  et un découplage sur le canal  $^1\text{H}$  seulement pendant l'acquisition pour limiter l'apparition du NOE. Les paramètres utilisés sont les suivants : TR : temps de répétition (=  $10 \cdot T_{1\text{max}}(^{13}\text{C})$ ) le plus long de la molécule) ; aq : durée d'acquisition ; d1 : délai de retour à l'équilibre.

La séquence utilisée lors de l'acquisition des différents spectres RMN  $^{13}\text{C}$  est une séquence d'acquisition  $^{13}\text{C}$  découplé  $^1\text{H}$  consistant en un délai de récupération suivi d'une impulsion d'excitation dont l'angle de bascule vaut  $90^\circ$  et découplage  $^1\text{H}$  durant l'acquisition (recueil du FID) uniquement, afin de limiter le NOE (Figure 28). Le découplage utilisé est un découplage adiabatique décrit dans la référence [83].

Les paramètres pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  des composés sont regroupés dans le Tableau 11.

**Tableau 11. Paramètres d'acquisition RMN  $^{13}\text{C}$  pour la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  du MAGF et du DAFP.**

Paramètre	MAGF	DAFP
<b>T1 <math>^{13}\text{C}</math> le plus long (s)</b>	1,4	3,5
<b>D1</b>	14	35
<b>AQ</b>	1	0,7
<b>NS</b>	1000	620
<b>Durée par spectre</b>	4h00	5h00

#### 4.3.4 Traitement des spectres RMN $^{13}\text{C}$

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  obtenus dans les conditions décrites dans les paragraphes précédents sont traités à l'aide d'une fonction d'apodisation de type exponentielle décroissante avec un facteur d'élargissement des raies ( $lb$ ) dépendant des conditions de préparation de l'échantillon et de l'échantillon en lui-même (typiquement,  $lb = 2$  Hz pour le MAGF). Après transformée de Fourier, un phasage et une correction de la ligne de base sont effectués sur le spectre obtenu.

Le lissage des signaux d'intérêt est effectué à l'aide du logiciel Perch (Université de Kuopio, Finlande). Ce logiciel permet de lisser les raies par des lorentziennes tout en ajustant les déplacements chimiques, la largeur à mi-hauteur, l'amplitude ainsi qu'une correction de la phase des pics.

#### 4.3.5 Mesures SMRI

Les mesures SMRI ont été effectuées sur un spectromètre ThermoFisher Scientific sur modèle Delta-V piloté par le logiciel Isodat N V 2.5 ; interface d'analyse élémentaire (EA-SMRI) : Flash MT 112 Thermo géré par le logiciel Eager 300 sous Windows XP. Les échantillons sont pesés dans des capsules d'étain. Les masses nécessaires pour l'obtention de

la déviation isotopique en carbone 13 sur le glucose, le fructose ou le saccharose sont comprises entre 0,8 et 1 mg.

La référence de travail pour l'analyse élémentaire en  $^{13}\text{C}$  est l'acide glutamique avec un  $\delta^{13}\text{C} = -20,85 \pm 0,70\text{‰}$ . Elle est périodiquement vérifiée et calibrée à l'aide de références internationales.

# Chapitre 3 - Effet isotopique de déplacement chimique dû à la présence d'atomes de deutérium échangeables au cours de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ des produits

## 1 Introduction

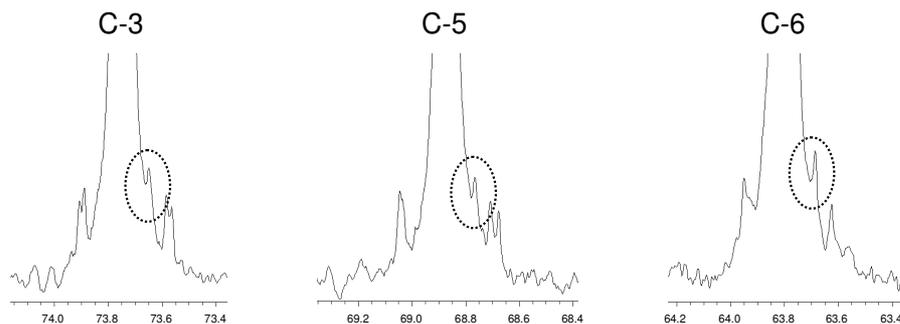
La RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique a été développée depuis environ six ans au laboratoire. Son intérêt a été démontré sur différentes molécules (vanilline [34, 36, 37], paracétamol [8], aspirine [8], glycérol [84]) et il est envisageable que le nombre de produits analysés par cette technique augmente considérablement au cours du temps. Dans ce cadre, une difficulté rencontrée lors de l'analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique d'un composé donné doit être investiguée afin de comprendre le phénomène qui l'engendre. Cette compréhension permettra d'aller au devant de difficultés du même type rencontrées lors de l'analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  de composés similaires.

Lors de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du MAGF et du DAFP, des pics additionnels ont été observés au voisinage des signaux correspondant aux carbones portant les fonctions hydroxyles (cf. chapitre 2 ; paragraphe 2.7). Même si la présence de ces pics peut être évitée par l'utilisation d'un mélange de solvants contenant du méthanol, elle s'avèrerait malgré tout problématique dans le cas d'analyse de produits similaires. Dès lors, il apparaît essentiel de comprendre le phénomène responsable de l'apparition des ces pics.

## 2 Résultats et discussion

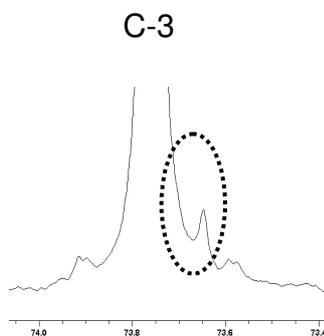
### 2.1 Observations

Lors de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du MAGF dans un mélange DMSO/Acétone- $\text{d}_6$ , des pics additionnels sont observés au voisinage des carbones portant les fonctions hydroxyles, C-3, C-5 et C-6 du MAGF (Figure 29). Le même phénomène est observé sur le C-3 du DAGF (précurseur du MAGF dans la dérivation présentée au chapitre précédent) lorsque ce dernier est analysé dans le même mélange (DMSO/Acétone- $\text{d}_6$ ) (Figure 30).



**Figure 29. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des carbones du MAGF portant les fonctions hydroxyles (C-3, C-5 et C-6 en notation conventionnelle du glucose).**

Les cercles en pointillés indiquent la présence des pics additionnels observés avec un mélange DMSO/acétone- $\text{d}_6$  (préparation (a) ; cf. partie expérimentale; paragraphe 4.2).



**Figure 30. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du carbone du DAGF portant la fonction hydroxyle (C-3).**

Le cercle en pointillé indique l'apparition d'un signal additionnel, observé dans un mélange DMSO/acétone- $\text{d}_6$  (préparation (d) ; cf. partie expérimentale; paragraphe 4.2).

## 2.2 Influence des signaux parasites sur les résultats

Dans le premier mélange de solvants utilisé (préparation (a) : DMSO/acétone- $\text{d}_6$  ; partie expérimentale - paragraphe 4.2) les pics additionnels sont observés. Pour s'affranchir de la présence de ces pics, un deuxième mélange a été effectué (préparation (b) : MeOH/Acétone- $\text{d}_6$  ; partie expérimentale - paragraphe 4.2).

Nous avons mesuré, pour chaque mélange de solvants (mélange (a) DMSO/acétone- $\text{d}_6$  et mélange (b) DMSO- $\text{d}_6$ /méthanol), les déviations isotopiques de chaque site carboné du MAGF par RMN  $^{13}\text{C}$ . L'échantillon de MAGF utilisé pour ces deux mesures est le même, il provient de la dérivation d'un glucose de maïs (C4).

Les résultats obtenus montrent des différences significatives sur la distribution intramoléculaire en carbone 13 du MAGF selon le mode de préparation de l'échantillon (Figure 31).

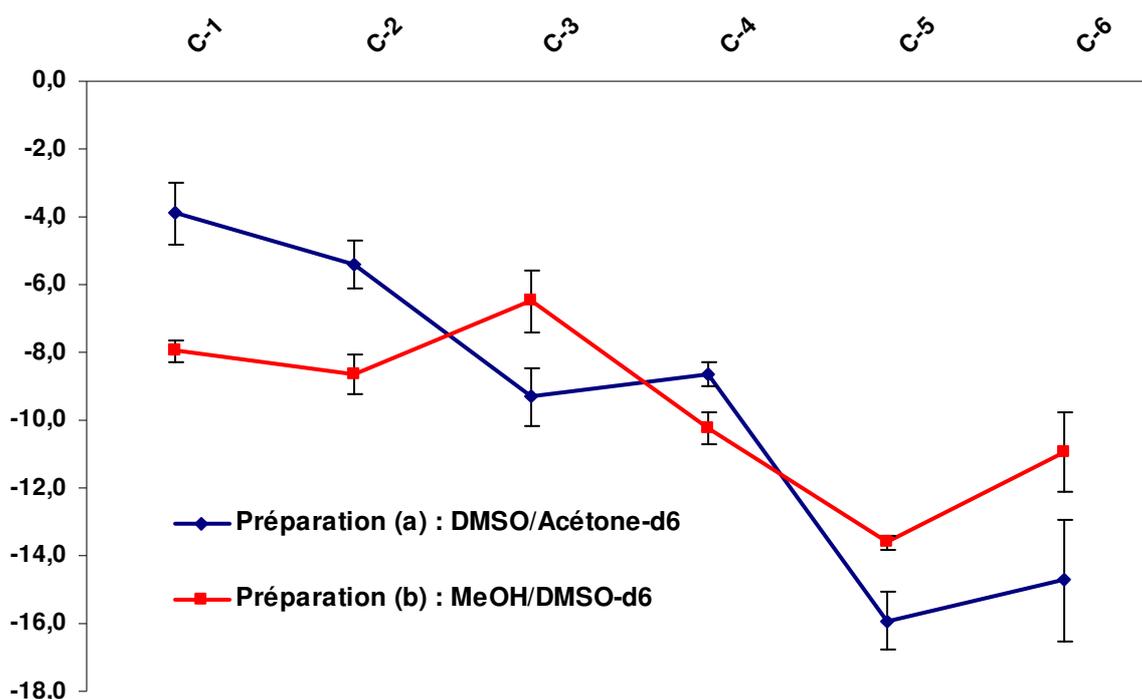


Figure 31. Déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  pour chaque site carboné du MAGF dans un mélange DMSO/acétone- $\text{d}_6$  (préparation (a)) et dans un mélange MeOH/DMSO- $\text{d}_6$  (préparation (b)).

Les sites carbonés portant les fonctions hydroxyles (C-3, C-5 et C-6), et donc ceux pour lesquels des signaux parasites sont observés, apparaissent plus pauvres dans la première préparation (préparation (a)) que dans la deuxième (préparation (b)). Par conséquent, le fait d'utiliser les fractions molaires réduites implique un enrichissement apparent sur les carbones qui ne portent pas de fonctions hydroxyles (C-1, C-2 et C-4) dans la première préparation (préparation (a)).

### 2.3 Mise en évidence d'un effet de substitution isotopique $\text{D} \rightleftharpoons \text{H}$ sur les signaux RMN $^{13}\text{C}$ des carbones du MAGF portant les fonctions hydroxyles

Deux explications ont été envisagées pour expliquer les différences sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  du MAGF mesurées dans les deux conditions de préparation :

- Une impureté pourrait être présente sous les signaux d'intérêt dans le mélange (b) et avoir un déplacement chimique différent dans le mélange (a), conduisant aux pics additionnels observés et à une déviation isotopique apparente plus faible sur les signaux au voisinage desquels ces pics sont observés.

- Le MAGF pourrait être présent sous deux formes différentes de proportions inégales dans le mélange (a) et sous une seule forme dans le mélange (b).

Les analyses CPG et RMN  $^1\text{H}$  montrent que le MAGF analysé ne contient pas d'impuretés. Dès lors, il faut envisager un phénomène responsable de l'apparition des différentes « formes » du MAGF dans la préparation (a).

Notre première idée permettant d'expliquer ce phénomène s'est portée sur la présence d'agrégats liés par liaisons hydrogène en plus ou moins grande quantité selon le solvant utilisé. Les dérivés acétonides du glucose, et notamment le MAGF, montrent en effet une propension importante à former un gel en présence de solvants organiques, comme le toluène [85, 86]. Les signaux observés pourraient alors être dus à la présence de cette forme agrégée, présente en faible quantité dans la préparation (a) et étant défavorisée par l'apport de OH libre (méthanol) dans la préparation (b). Ceci expliquerait deux déplacements chimiques différents pour les carbones portant les fonctions hydroxyles (sites impliqués dans la formation des liaisons H) dans la préparation (a).

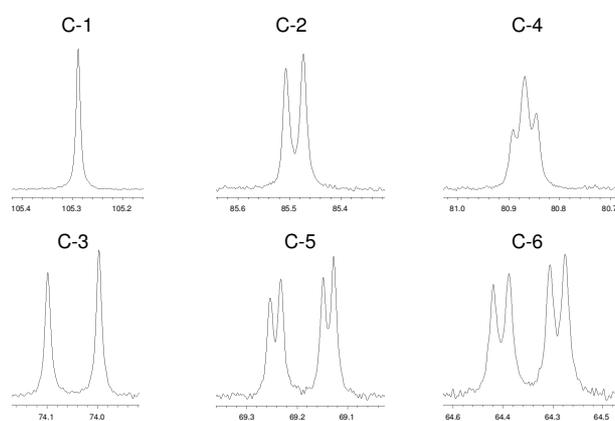
Une autre hypothèse était envisageable: un effet de substitution isotopique  $\text{H} \rightleftharpoons \text{D}$  sur les fonctions hydroxyles du MAGF pourrait conduire à un déplacement chimique en RMN  $^{13}\text{C}$  différent pour les carbones portant ces fonctions. Lorsqu'un proton est substitué par un atome de deutérium, dans le cas où l'atome substitué est porté par un carbone, ce changement provoque un déplacement chimique différent pour les deux espèces C-D et C-H. Cet effet isotopique de déplacement chimique peut aussi être observé sur un nombre plus important de liaisons entre le noyau observé et le noyau substitué (par exemple : structure  $\text{C}_{\text{observé}}\text{-X-H/C}_{\text{observé}}\text{-X-D}$  avec X : hétéroatome).

Ainsi, cet effet de substitution isotopique  $\text{H} \rightleftharpoons \text{D}$  sur le déplacement chimique  $^{13}\text{C}$  sur deux liaisons (effet  $\beta$ ) ou sur trois liaisons (effet  $\gamma$ ) est à l'origine de l'apparition de multiplets sur le spectre de glucides dans le DMSO- $d_6$  lorsqu'une quantité suffisante de  $\text{D}_2\text{O}$  est ajoutée [87, 88]. Les protons des fonctions hydroxyles sont alors échangés avec les deutériums de l'eau lourde. Cet échange est lent dans le DMSO à l'échelle de la RMN car le milieu est relativement visqueux, d'où l'apparition de signaux correspondants aux différents isotopomères présents en solution.

Dans notre cas, cette explication implique la présence d'atomes de deutérium échangeables dans la solution. Ces atomes peuvent être apportés par les molécules de HOD et  $\text{D}_2\text{O}$  présentes en très faibles quantités dans l'acétone- $d_6$  (environ 0,02% selon les données d'Eurisotop). Le DMSO- $d_6$  utilisé dans la préparation (b) ne contient que des molécules de

H<sub>2</sub>O (0,5% selon les données d'Eurisotop).

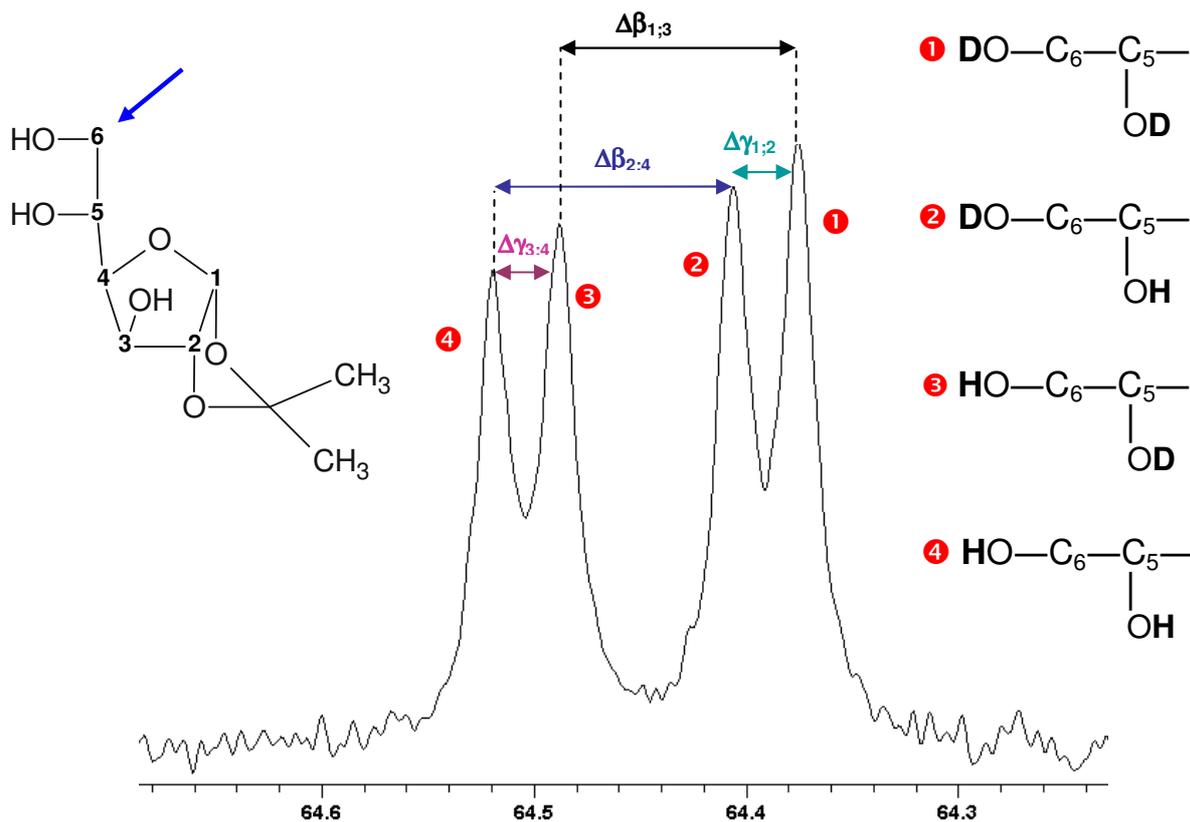
Nous avons décidé, dans un premier temps, d'évaluer la véracité de l'hypothèse impliquant un effet de substitution isotopique H $\rightleftharpoons$ D sur le déplacement chimique <sup>13</sup>C, celle-ci étant plus aisée à mettre en évidence au laboratoire par des expériences simples. Pour cela, nous avons effectué une troisième préparation (préparation (c) : DMSO-d<sub>6</sub> + 0,01 mL de D<sub>2</sub>O ; partie expérimentale - paragraphe 4.2). Dans ce mélange, la concentration en MAGF est plus faible que dans les précédentes (préparations (a) et (b)), permettant une largeur de raies plus faible et donc une meilleure résolution des signaux. L'apport de deutériums échangeables (D<sub>2</sub>O ajouté) a été calculé pour être dans les mêmes proportions que les hydrogènes échangeables du MAGF. L'allure des signaux observés dans cette préparation est regroupée sur la Figure 32 .



**Figure 32. Allure des signaux pour chaque carbone de la partie glucose du MAGF dans le mélange (c) (cf. partie expérimentale).**

La notation utilisée est la notation conventionnelle du glucose.

La Figure 32 met en évidence la présence d'effets isotopiques  $\beta$  et  $\gamma$ , impliquant la formation de plusieurs isotopologues par carbone considéré. A titre d'exemple, l'allure du signal correspondant au C-6 est détaillée sur la Figure 33. Les différents déplacements chimiques correspondant aux isotopologues présents en solution sont annotés sur cette figure. La notation utilisée est la notation conventionnelle du glucose.



**Figure 33. Allure du signal RMN  $^{13}\text{C}$  pour le carbone 6 du MAGF dans la préparation (c).**

Quatre formes sont observées (1, 2, 3 et 4) selon la substitution  $\text{H} \rightleftharpoons \text{D}$  du groupement hydroxyle lié au C-6 (effet  $\beta$ ) ou selon la substitution  $\text{H} \rightleftharpoons \text{D}$  du groupement hydroxyle lié au C-5 (effet  $\gamma$ ).

Un échange rapide entre les deux espèces C-OH et C-OD conduirait à un déplacement chimique moyen des deux formes, pondéré par la proportion des ces deux formes. Dans notre cas, les deux signaux représentant les formes C-OH et C-OD, apparaissent nettement séparés, dû à une vitesse d'échange relativement lente. En théorie, un couplage entre les carbones et les deutériums des fonctions hydroxyles doit exister et trois raies devraient être observées (pour le deutérium, le spin est égal à 1). Cependant, le fait que la valeur de cette constante de couplage soit *a priori* très faible (couplage longue distance) et que la largeur des raies soit relativement grande ne permet pas l'observation de ces raies.

Le phénomène observé dans la préparation (c) semble être de même nature que celui observé précédemment dans le mélange (a) puisque l'écart en ppm des différents signaux (COH et COD)  $\Delta^{13}\text{C}$  sont identiques dans les deux préparations (Tableau 12).

**Tableau 12. Effets isotopiques  $\beta$  et  $\gamma$  pour les 6 atomes de carbone (C-1 à C-6) correspondant à la partie glucose du MAGF dans le mélange (c).**

Preparation	Effet isotopique <sup>a</sup>	Sites carbonés <sup>b</sup>					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
(a)	$\beta$ (ppm)	-	-	0.103	-	0.107	0.111
(c)	$\beta$ (ppm)	-	-	0.101	-	0.104	0.113
	$\gamma$ (ppm)	-	0.033	-	0.023	0.022	0.032

<sup>a</sup> Les effets isotopiques sont calculés par la différence, en ppm, entre la forme COD et la forme COH en valeur absolue.

<sup>b</sup> La numérotation est celle conventionnelle du glucose (Figure 33).

De plus, un rapide calcul permet de montrer que dans les conditions du mélange (a), la proportion en deutériums labiles (apportés par les molécules de HOD et D<sub>2</sub>O présentes dans l'acétone-d<sub>6</sub>) permet de prédire une proportion de C-O-D par rapport aux C-O-H du MAGF d'environ 0,5% à 1%, ce qui est effectivement observé sur le spectre (l'intensité des signaux additionnels étant environ égale à celle des satellite, c'est-à-dire environ 0,5% du produit).

### 3 Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent de mettre clairement en évidence (i) un échange chimique H $\rightleftharpoons$ D, lent par rapport au phénomène RMN et responsable de l'apparition de pics non désirés sur le spectre RMN <sup>13</sup>C des produits d'intérêt et (ii) l'influence de ces pics sur la mesure des déviations isotopiques en carbone 13.

L'exactitude à atteindre pour la mesure RMN <sup>13</sup>C étant de 1‰, ce phénomène doit être pris en compte lors de l'analyse par cette technique de composés similaires (présence de fonction OH ou NH/NH<sub>2</sub> dans leur structure). Pour ce faire, deux options sont envisageables :

- éviter l'utilisation de solvants présentant des traces de D<sub>2</sub>O et HOD, et ce, même dans des proportions inférieures à 0,1% ;
- transformer chimiquement la molécule pour bloquer les fonctions hydroxyles ou amines de celle-ci.

Les solvants usuels ne contenant pas de D<sub>2</sub>O/HOD, selon les spécifications du fournisseur (Eurisotop) sont le chloroforme deutéré CDCl<sub>3</sub>, le DMSO-d<sub>6</sub>. Dès lors, le choix du solvant de lock à utiliser pour une mesure RMN <sup>13</sup>C isotopique est restreint. Dans certains cas, un mélange de solvants deutérés et non deutérés (e.g. MeOH/DMSO-d<sub>6</sub> ; cf. chapitre 2) est envisageable pour la mesure.

## 4 Partie expérimentale

### 4.1 Origine des produits

Le MAGF (1,2-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-glucofuranose) utilisé pour la mesure RMN <sup>13</sup>C isotopique préparations (a) et (b), provient de la dérivation d'un glucose de maïs Sigma (cf. Chapitre 2 ; paragraphe 4.2). Le MAGF utilisé dans la préparation (c) est fourni par Fluka. Les solvants deutérés (acétone-d<sub>6</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>, D<sub>2</sub>O) ont été fournis par Eurisotop. Le papier filtre utilisé pour filtrer les solutions dans les tubes RMN est de marque Kimwipes®.

### 4.2 Préparations des échantillons

*Préparation (a)*: 200 mg de MAGF sont dissous dans 0,3 mL de DMSO; puis 0,3 mL d'acétone-d<sub>6</sub> sont ajoutés. Le mélange est alors filtré dans un tube de 5 mm de diamètre.

*Préparation (b)*: 200 mg de MAGF sont dissous dans 0,4 mL de DMSO-d<sub>6</sub>; puis 0,2 mL de MeOH sont ajoutés. Le mélange est alors filtré dans un tube de 5 mm de diamètre.

*Préparation (c)*: 200 mg de MAGF sont dissous dans 0,7 mL de DMSO-d<sub>6</sub>; puis 0,01 mL de D<sub>2</sub>O sont ajoutés. Le mélange est alors filtré dans un tube de 5 mm de diamètre.

*Préparation (d)*: 200 mg de DAGF sont dissous dans 0,3 mL de DMSO; puis 0,3 mL d'acétone-d<sub>6</sub> sont ajoutés. Le mélange est alors filtré dans un tube de 5 mm de diamètre.

### 4.3 Mesures RMN <sup>13</sup>C

Les spectres RMN <sup>13</sup>C ont été obtenus sur un spectromètre Bruker DRX 500 (préparation (a)) ou DPX 400 (préparation (b)) équipé d'une sonde dual <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H 5 mm i.d. accordée à la fréquence <sup>13</sup>C de 125,75 MHz et 100,64 MHz respectivement. La température de la sonde est maintenue à 303 K.

# Chapitre 4 - Analyse par RMN $^{13}\text{C}$ site-spécifique du glucose, du fructose et du saccharose : mise en place et évaluation du protocole analytique

## 1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que les protons des groupements hydroxyles du MAGF et du DAFP pouvaient être échangés avec les deutériums du solvant (provenant des molécules HOD et D<sub>2</sub>O contenues dans les solvants deutérés). Ce phénomène peut être évité en utilisant un mélange de solvants appropriés (DMSO-d<sub>6</sub>/MeOH ; cf. chapitre 2 – paragraphe 2.7). Le MAGF étant soluble dans le DMSO mais très peu dans les autres solvants (acétone, méthanol, acétonitrile), le fait de s'affranchir de ces échanges chimiques implique donc un panel de solvants à utiliser très restreint.

Le choix des conditions de préparation de l'échantillon (concentration du composé à analyser, solvant utilisé) pour la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique est fait en fonction (i) de la séparation des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  à quantifier, (ii) des temps de relaxation longitudinale T1  $^{13}\text{C}$  (gouvernant la durée d'analyse par le biais du délai de retour à l'équilibre TR) et (iii) des largeurs à mi-hauteur  $\Delta\nu_{1/2}$  (gouvernant le rapport signal/bruit et la séparation des satellites d'avec le pic central). Les largeurs à mi-hauteur  $\Delta\nu_{1/2}$  sont elles-mêmes inversement proportionnelles aux temps de relaxation transversale T2  $^{13}\text{C}$  (en négligeant les inhomogénéités du champ B<sub>0</sub>). Les temps de relaxation longitudinale T1  $^{13}\text{C}$  et transversale T2  $^{13}\text{C}$  dépendent de la mobilité de la molécule dans le milieu : plus la molécule est mobile (solvant fluide et/ou produit peu concentré), plus les temps de relaxation  $^{13}\text{C}$  sont élevés. En revanche, dans le cas d'un milieu moins mobile (visqueux et/ou concentré), les T2  $^{13}\text{C}$  vont diminuer et les T1  $^{13}\text{C}$  vont réaugmenter. La préparation effectuée pour l'analyse du MAGF se situe dans le dernier cas : le mélange de solvants utilisé (DMSO-d<sub>6</sub>/MeOH) est relativement visqueux, ce qui implique un temps de relaxation transversal T2  $^{13}\text{C}$  court et donc une largeur à mi-hauteur  $\Delta\nu_{1/2}$  relativement grande. Ceci peut être pénalisant pour la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique (mauvaise séparation des satellites d'avec le pic central, rapport signal sur bruit faible).

La suppression des groupements hydroxyles par dérivation en groupements plus apolaires permettrait d'une part de s'affranchir du phénomène décrit dans le chapitre 3 (effet de substitution isotopique  $H \rightleftharpoons D$  sur le déplacement chimique RMN  $^{13}C$ ) et d'autre part d'utiliser des solvants plus fluides (comme l'acétone par exemple). De plus, dans le cas du MAGF, le fait de dériver les groupements hydroxyles permettrait une meilleure purification (recristallisation possible).

La finalisation de la méthode d'analyse nécessite donc une étape de dérivation supplémentaire des deux molécules précédemment choisies, MAGF et DAFP. Cette dernière étape doit répondre aux mêmes critères que les deux étapes précédentes en terme de rendement et d'allure des spectres RMN  $^{13}C$  des produits obtenus.

Le but de chapitre est de présenter la finalisation de la méthodologie (dérivation des sucres et analyse des dérivés par RMN  $^{13}C$ ). Le choix de la transformation des molécules décrites dans le chapitre 2, MAGF et DAFP, sera abordé dans un premier temps, en termes de rendements réactionnels, de pureté des produits formés et de déplacements chimiques RMN  $^{13}C$ . Une étude de répétabilité sur les valeurs de  $\delta_i^{13}C$  mesurées par RMN  $^{13}C$  sera menée ensuite sur les deux composés choisis (dérivés du glucose et du fructose). Enfin, le fractionnement isotopique associé à chacune des trois étapes de la dérivation sera évalué.

## 2 Choix de la dernière étape de dérivation

Même si les transformations du MAGF et du DAFP sont nécessaires pour notre étude, l'addition d'un groupement sur ces molécules peut avoir des limitations puisque (i) la molécule ainsi dérivée s'alourdit, diminuant ainsi le nombre de moles de produit dans le tube, à masse identique, et (ii) la formation du dérivé en elle-même peut être source de fractionnement isotopique.

L'enjeu est donc de trouver une méthode de dérivation permettant :

- Une transformation totale permettant de s'affranchir au maximum du fractionnement isotopique en  $^{13}C$  associé à cette transformation ;
- Une purification (recristallisation) aisée des molécules formées (l'apparition de sous-produits doit être contrôlée pour établir un profil d'impuretés) ;
- La formation de composés à masse molaire suffisamment faible, solubles dans des solvants organiques usuels relativement fluides (acétone, chloroforme, ...) et dont les signaux RMN  $^{13}C$  sont bien séparés et les plus fins possibles.

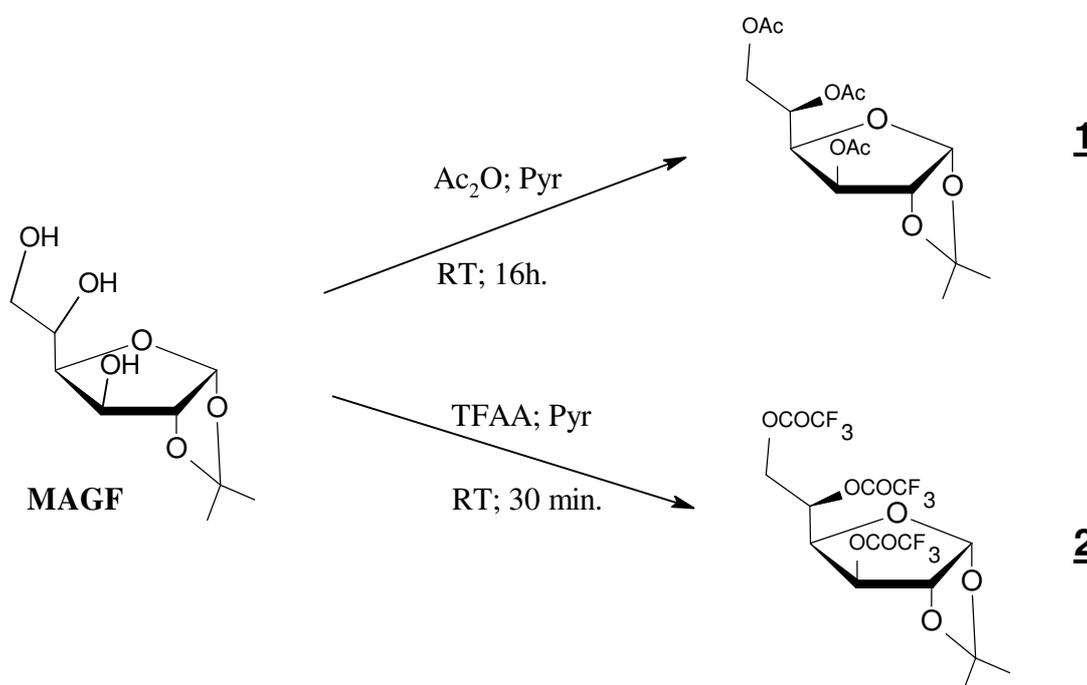
L'acétylation permet de dériver les groupements hydroxyles dans un temps raisonnable

et avec un rendement élevé [89]. Nous nous sommes donc intéressés à la dérivation du MAGF et du DAFP avec des groupements acétyles.

## 2.1 Dérivation du MAGF

### 2.1.1 Choix de l'agent de dérivation

Deux réactifs pour la dérivation du MAGF ont été envisagés. D'une part l'anhydride acétique qui permet de former le 3,5,6-tris-*O*-acétyl-1,2-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**1**) et d'autre part l'anhydride trifluoroacétique, plus réactif pour ce genre de réactions et qui permet l'obtention de produits plus solubles, qui forme le 3,5,6- tris-*O*-trifluoroacétyl-1,2-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**2**) (Figure 34).



**Figure 34. Dérivations envisagées du MAGF.**

$\text{Ac}_2\text{O}$  : anhydride acétique ; Pyr : pyridine ; TFAA : anhydride trifluoroacétique.

La première dérivation, permettant de former le composé **1** ne montre pas de sous-produits supplémentaires en Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et la disparition totale du MAGF est observée au bout de 16 heures à température ambiante. La pureté du composé **1** après purification sur colonne chromatographique (partie expérimentale – paragraphe 6.3.3) est satisfaisante pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique (pas de sous-produits détectés par RMN  $^1\text{H}$ ).

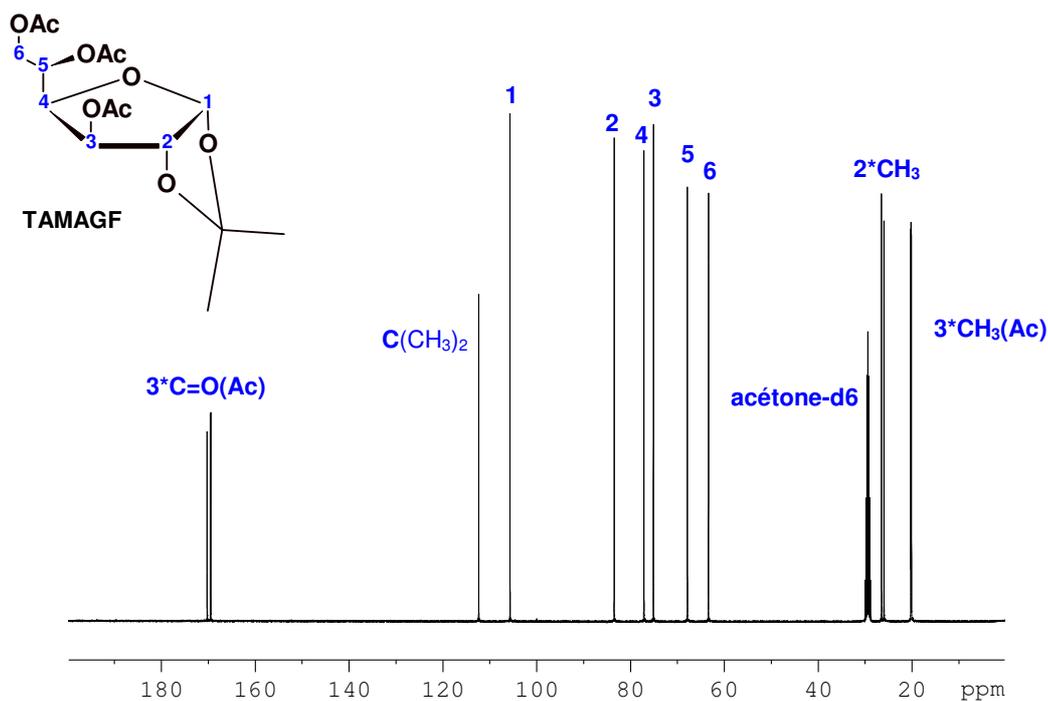
Lors de la réaction utilisant l'anhydride trifluoroacétique, le MAGF est consommé au bout de 30 minutes à température ambiante. En revanche, la CCM, utilisée pour suivre la réaction, montre la présence de sous-produits. Il est probable que l'acide trifluoroacétique généré lors de la réaction provoque l'hydrolyse partielle du MAGF donnant lieu à une quantité importante de sous-produits. Une purification sur colonne chromatographique n'est pas suffisante pour rendre possible l'analyse du composé **2** par RMN <sup>13</sup>C isotopique.

L'anhydride acétique apparaît comme un agent de dérivation adapté à la formation du dérivé définitif pour l'analyse du glucose par RMN <sup>13</sup>C isotopique. Le rendement sur la dérivation du MAGF en composé **1** est de 96% après purification sur colonne chromatographique de gel de silice. Le composé formé peut, de plus, être recristallisé dans l'éther de pétrole. Lors de la recristallisation de ce composé, les rendements s'échelonnent de 60 à 80% du produit brut (partie expérimentale – paragraphe 6.3.3). Celle-ci n'est pas nécessaire quand le produit de départ (MAGF) est suffisamment pur (MAGF commercial pur à 99,8%, par exemple). En revanche, la recristallisation est nécessaire dans le cas où le dérivé du fructose MAFP-1,2, après acétylation, contamine le TAMAGF. Lorsque le saccharose est utilisé comme produit de départ, une recristallisation du TAMAGF permet de limiter la proportion ce sous-produit à seulement 2% du TAMAGF ; le rapport signal sur bruit n'est dans ce cas que très faiblement atténué.

Le dérivé formé par cette transformation, et choisi pour la méthodologie finale est donc le TriAcétylMonoAcétonideGlucoFuranose (**TAMAGF** composé **1**).

### **2.1.2 Choix des conditions de préparation et des paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup>C**

L'attribution des signaux RMN <sup>13</sup>C du TAMAGF a été effectuée à l'aide d'expériences RMN 1D et 2D. Dans l'acétone-d<sub>6</sub>, les signaux du TAMAGF sont suffisamment séparés pour être quantifiés (Figure 35).



**Figure 35. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du TAMAGF dans l'acétone-d6.**

Les signaux des différents carbones ont été attribués par un ensemble d'expériences RMN 1D et 2D. Les pics d'intérêt (correspondant à la partie glucose du TAMAGF, C-1 à C-6) sont suffisamment résolus pour permettre leur quantification. La notation utilisée est la numérotation conventionnelle du glucose.

Les temps de relaxation longitudinale  $T_1$   $^{13}\text{C}$  dans les conditions de préparation choisies (cf. partie expérimentale – paragraphe 5.4.2) sont suffisamment faibles pour s'affranchir de l'utilisation d'un agent relaxant. La durée d'analyse pour une mesure (3 spectres/mesure) est de 9h00 pour un rapport signal sur bruit de 750.

La dernière étape de dérivation du glucose induit donc un temps de manipulation supplémentaire, mais qui est toutefois compensé par les avantages présentés par le composé formé lors de cette étape (élimination des fonctions hydroxyles, temps d'analyse plus court et recristallisation possible).

### 2.1.3 Répétabilité de la mesure des $\delta_i^{13}\text{C}$ du TAMAGF par RMN $^{13}\text{C}$

La répétabilité sur la mesure des déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  du TAMAGF par RMN  $^{13}\text{C}$  a été évaluée en utilisant le même lot de TAMAGF synthétisé à partir du MAGF commercial Fluka (partie expérimentale – paragraphe 5.1). Cet échantillon a été analysé 8 fois dans les mêmes conditions (partie expérimentale – paragraphes 5.4 et 5.5). L'écart type sur les

$\delta_i^{13}\text{C}$  est, au maximum de 0,8‰ (Tableau 13). Cette valeur est en accord avec nos attentes en terme de précision sur la mesure (écart type inférieur à 1‰).

**Tableau 13. Moyenne et écart type de répétabilité RMN  $^{13}\text{C}$  sur la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du TAMAGF.**

TAMAGF	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰) <sup>a</sup>	-20,5	-23,7	-23,4	-25,8	-29,3	-26,8
Ecart type (‰) <sup>a</sup>	0,7	0,6	0,8	0,6	0,8	0,6

<sup>a</sup>Les moyennes et écarts types sont calculés à partir de huit mesures différentes sur le même produit.

#### 2.1.4 Reproductibilité de la mesure des $\delta_i^{13}\text{C}$ du TAMAGF par RMN $^{13}\text{C}$

Les analyses isotopiques par RMN  $^{13}\text{C}$  ont été menées, au début de ces travaux, sur le spectromètre Bruker DRX 500. A la fin de l'année 2009, une rénovation de l'électronique a été entreprise sur les différents spectromètres du laboratoire : 400 Avance I (= « 400A ») et 400 Avance III (= « 400B »). La qualification de ces deux spectromètres pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique a été effectuée en utilisant des molécules bi-marquées (éthanol et acide acétique) [90], et en comparant les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  de différentes molécules (éthanol, propionate d'éthyle, vanilline) obtenues sur ces spectromètres (400A et 400B) avec celles obtenues sur le DRX 500.

Ce changement de configuration a été l'occasion d'évaluer la reproductibilité de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  sur le TAMAGF sur plusieurs spectromètres. La répétabilité de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique a donc été évaluée en mesurant les  $\delta_i^{13}\text{C}$  du même échantillon n fois sur les deux spectromètres : 400A (n = 4) et 400B (n = 3). Les résultats ont été comparés avec ceux donnés par le DRX 500 (Tableau 14).

Globalement, les écarts types sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  donnés par la mesure sur le 400A et le 400B sont identiques à ceux observés sur le DRX 500 et les résultats donnés par les trois spectromètres sont cohérents en termes de déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$ .

**Tableau 14. Moyenne et écart type de répétabilité RMN <sup>13</sup>C sur la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du TAMAGF de référence sur les différents spectromètres RMN du laboratoire (400A, 400B et 500).**

Spectromètre	TAMAGF	Site carboné					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<b>400A</b> (n=4)	$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰)	-20,8	-22,2	-23,9	-24,7	-29,0	-28,8
	Ecart type (‰)	0,8	0,8	0,6	0,5	0,4	0,7
<b>400B</b> (n=3)	$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰)	-21,4	-23,5	-23,3	-24,4	-28,9	-28,0
	Ecart type (‰)	0,9	0,0	0,8	0,3	0,6	0,1
<b>500</b> (n=6)	$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰)	-21,1	-22,6	-23,4	-25,7	-29,0	-27,7
	Ecart type (‰)	0,6	0,9	0,8	0,4	0,7	0,3

<sup>a</sup>Les moyennes et écarts types sont exprimés en ‰ et sont calculés à partir de n mesures sur le même produit.

Dans le contexte de développement actuel de la RMN <sup>13</sup>C, une étude de ce type est fondamentale. Jusqu'à présent, la répétabilité avait été déterminée sur le DRX 500 mais l'impact du changement de spectromètre sur les mesures RMN <sup>13</sup>C n'avait pas été évalué. Les moyennes et les écarts types sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  du même TAMAGF mesurées sur les trois spectromètres (400A, 400B et 500) sont regroupés dans le Tableau 15. Les écarts types de reproductibilités sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées par RMN <sup>13</sup>C sur 13 mesures sont au maximum de 1,1‰ sur une période de 24 mois. La mesure RMN <sup>13</sup>C du TAMAGF apparaît donc reproductible entre spectromètres.

**Tableau 15. Moyenne et écart type de répétabilité sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées par RMN <sup>13</sup>C sur les différents spectromètres du laboratoire (400A, 400B, 500) sur chaque site carboné du TAMAGF de référence.**

TAMAGF (n=13) 24 mois	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰)	-21,1	-22,6	-23,9	-24,8	-28,9	-28,1
Ecart type (‰)	0,7	0,9	0,7	1,1	0,5	0,7

La détermination de la reproductibilité de cette technique est essentielle, dans la mesure où son potentiel est intéressant tant d'un point de vue purement fondamental (élucidation de biosynthèses, par exemple) que d'un point de vue des applications (authentification principalement). Divers laboratoires pourraient dès lors être amenés à utiliser la RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique ; il convient donc de s'assurer d'une cohérence des résultats obtenus, quelque soit le laboratoire et quel que soit le spectromètre utilisé pour les mesures. Des études sont actuellement en cours avec d'autres laboratoires partenaires afin de déterminer la reproductibilité de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur plusieurs spectromètres.

## 2.2 Dérivation du DAFP

### 2.2.1 Choix de l'agent de dérivation

Une démarche similaire a été engagée pour la dérivation du DAFP : détermination de l'agent de dérivation et des paramètres pour la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative pour l'analyse du dérivé choisi. Trois composés potentiels peuvent être obtenus à partir du DAFP selon l'agent de dérivation employé (Figure 36) :

- Le 1-*O*-propionyl-2,3;4,5-di-*O*-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (**4**) à partir de l'anhydride propionique  $(\text{EtCO})_2\text{O}$  ;
- Le 1-*O*-acétyl-2,3;4,5-di-*O*-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (**5**) à partir de l'anhydride acétique  $\text{Ac}_2\text{O}$  ;
- Le 1-*O*-trifluoroacétyl-2,3;4,5-di-*O*-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (**6**) à partir de l'anhydride trifluoroacétique  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ .

Les trois réactions sont totales (suivi de la disparition du DAFP par CCM) et conduisent à un rendement supérieur à 95% après purification sur colonne chromatographique (partie expérimentale – paragraphe 6.4) et une pureté satisfaisante pour la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique (pureté estimée par RMN  $^1\text{H}$ ). Le choix de l'agent de dérivation, et donc de la molécule dérivée pour finaliser la méthode, doit donc se faire sur le dernier critère de sélection : la séparation des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  selon le dérivé et le solvant choisi.

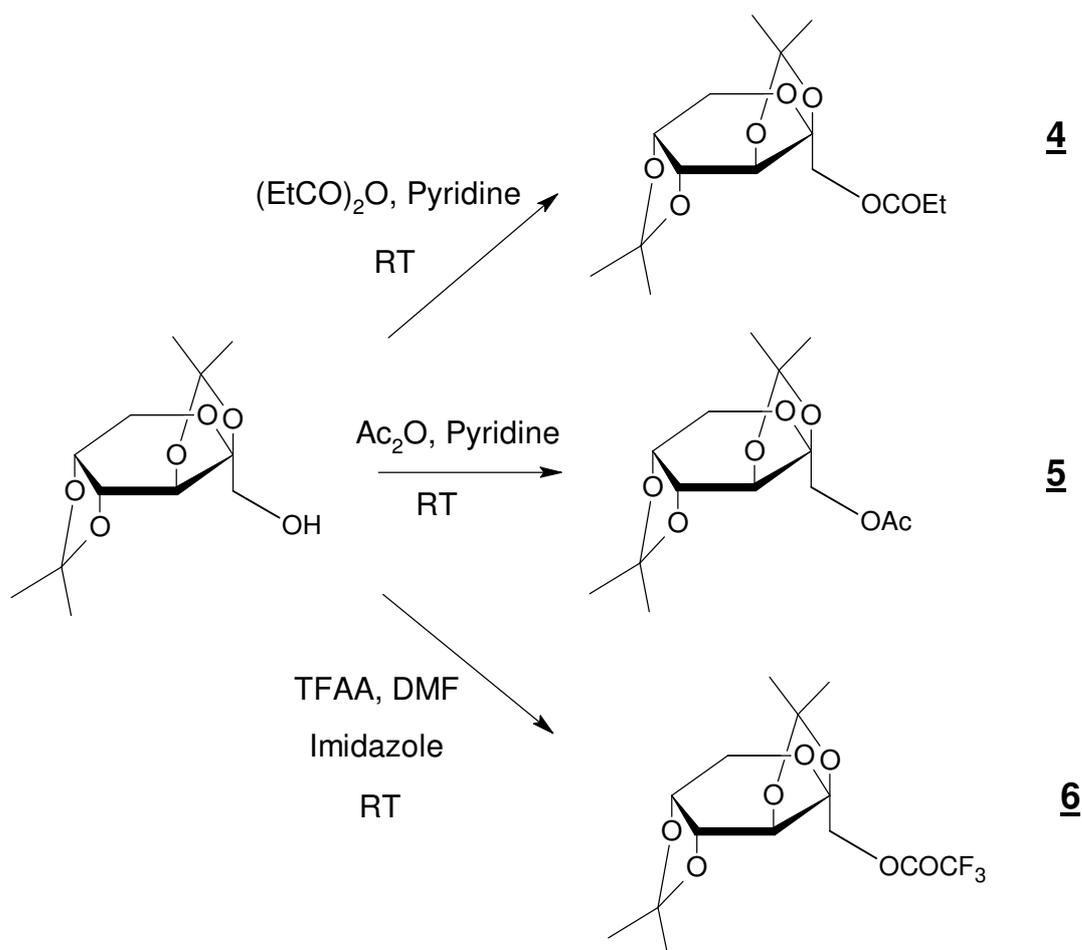
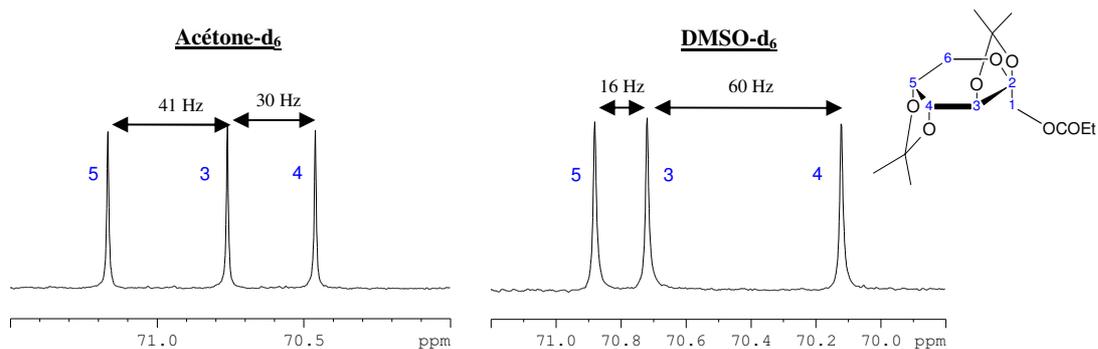


Figure 36. Dérivations envisagées du DAFP, pour la formation d'un composé analysable par RMN  $^{13}\text{C}$ .

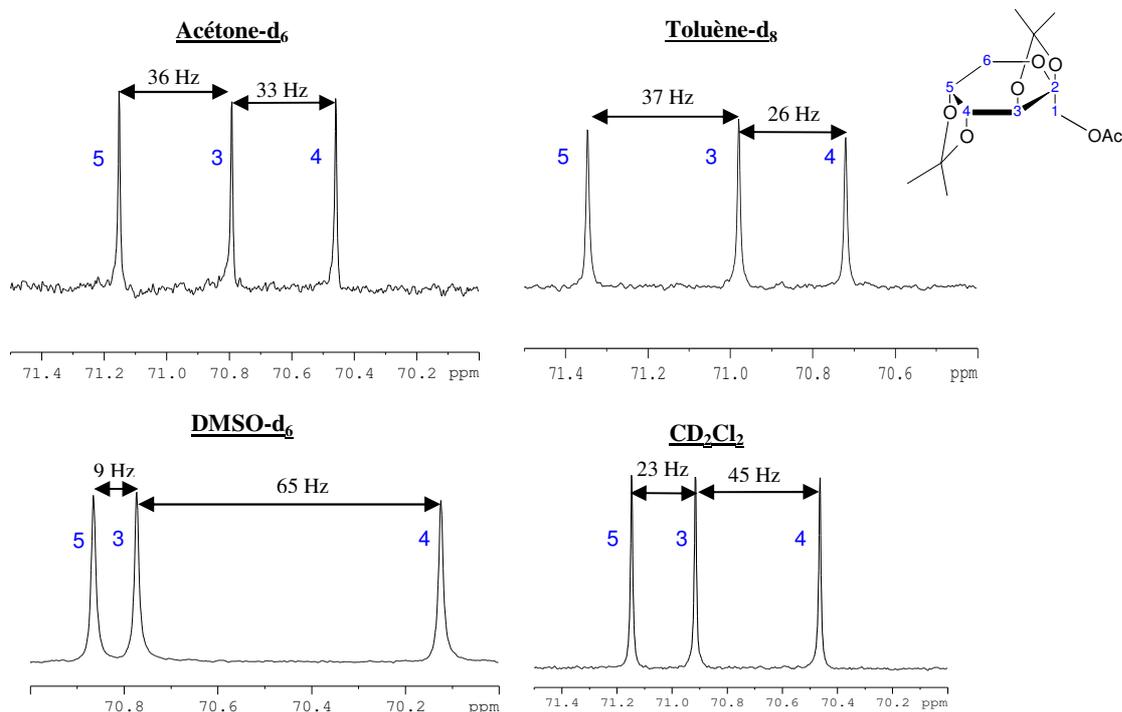
$\text{Ac}_2\text{O}$  : anhydride acétique ; TFAA : anhydride trifluoroacétique ;  $(\text{EtCO})_2\text{O}$  : anhydride propionique.

## 2.2.2 Choix des conditions de préparation et des paramètres pour la mesure RMN $^{13}\text{C}$ en fonction des dérivés potentiels

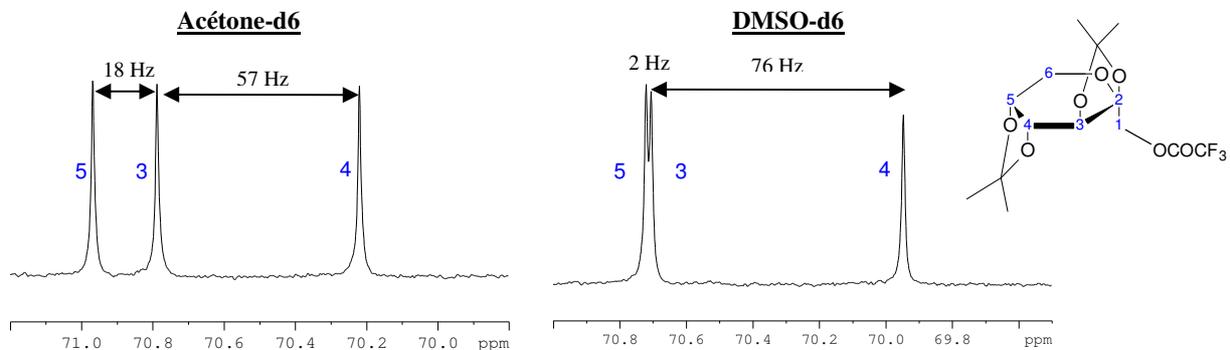
Parmi les trois composés 4, 5 et 6, formés à l'aide de différents agents d'acétylation, un seul doit être retenu pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique du fructose. Quelque soit le composé synthétisé (4, 5 et 6), les signaux correspondant aux carbones C-3, C-4 et C-5 (selon la notation conventionnelle du fructose) ne montrent pas une séparation idéale pour la mesure de leur teneur isotopique par RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 37, Figure 38 et Figure 39). Le solvant pouvant avoir une influence sur le déplacement chimique, des essais de solvant ont été effectués pour chacun des trois composés (Figure 37, Figure 38 et Figure 39).



**Figure 37. Zone du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  correspondant aux carbones C-3, C-4, C-5 du fructose pour le composé **4**.**  
La séparation des trois pics est optimale dans l'acétone- $\text{d}_6$ .



**Figure 38. Zone du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  correspondant aux carbones C-3, C-4, C-5 du fructose pour le composé **5**.**  
La séparation des trois pics est optimale dans l'acétone- $\text{d}_6$ .



**Figure 39. Zone du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  correspondant aux carbones C-3, C-4, C-5 du fructose pour le composé **6**.**  
La séparation des trois pics est optimale dans l'acétone- $\text{d}_6$ .

Les tests de solvants sur chacun des trois composés montrent que la séparation des pics C-3, C-4 et C-5 est optimale pour les composés **4** et **5** dans l'acétone-d<sub>6</sub>. La masse molaire plus faible du composé **5** (plus forte concentration potentielle du composé dans le tube RMN, à masse identique) nous a conduit à choisir ce composé pour l'analyse de la teneur isotopique en RMN <sup>13</sup>C du fructose.

Le composé choisi pour la mesure des détermination des déviations isotopiques <sup>13</sup>C sur la molécule de fructose est donc le composé **5**: MonoAcétylDiacétonideFructoPyranose : **MADAFP**.

Les conditions de préparation et d'analyse RMN <sup>13</sup>C choisies pour le MADAFP sont décrites dans la partie expérimentale (paragraphe 5.4) et dans l'Annexe 5. L'ajout d'un agent relaxant est ici nécessaire. Il permet une diminution significative du temps d'expérience, via la diminution du T1 <sup>13</sup>C du carbone quaternaire C-2 (environ 20 secondes dans les conditions de préparation sans relaxant contre 7,5 secondes dans les conditions de préparation avec relaxant), paramètre limitant pour la mesure. La concentration en relaxant a été choisie de manière à ne pas provoquer un élargissement trop important des raies RMN <sup>13</sup>C des signaux d'intérêt, ce qui pourrait provoquer un recouvrement des raies centrales avec leurs satellites et une diminution du rapport signal sur bruit.

### **2.2.3 Répétabilité et reproductibilité RMN <sup>13</sup>C MADAFP**

De même que pour le dérivé du glucose TAMAGF, la détermination de l'écart type sur la répétabilité de mesure RMN <sup>13</sup>C isotopique du dérivé du fructose MADAFP a été effectuée en analysant 5 et 8 échantillons de référence sur le spectromètre 400A et sur le spectromètre DRX 500, respectivement (Tableau 16). Les écarts types obtenus pour les mesures effectuées sur le 400A sont satisfaisants (inférieurs ou égaux à 1‰). En revanche, ceux obtenus pour la mesure sur le DRX 500 sont plus grands (1,5‰ au maximum). De plus, des écarts importants (2 à 4 ‰) sont observés pour les sites carbonés C-1, C-2, C-3 et C-6 entre les mesures effectuées sur les deux spectromètres 400A et 500.

**Tableau 16. Moyenne et écart type de répétabilité RMN <sup>13</sup>C sur la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du MADAFP sur les différents spectromètres du laboratoire (400A et 500).**

Spectromètre	MADAFP	Site carboné					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
400A (n=5)	$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰) <sup>a</sup>	-27,6	-18,6	-27,1	-20,3	-28,4	-33,5
	Ecart type (‰) <sup>a</sup>	0,6	0,5	1,0	0,8	0,9	0,9
500 (n=8)	$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰) <sup>b</sup>	-31,6	-16,0	-23,4	-19,9	-28,7	-35,9
	Ecart type (‰) <sup>b</sup>	1,5	1,2	0,6	0,7	1,0	1,5

<sup>a</sup>Les valeurs sont calculées sur 5 échantillons sur le même MADAFP et dans les mêmes conditions de mesure RMN <sup>13</sup>C. <sup>b</sup>Les valeurs sont calculées sur 8 échantillons sur le même MADAFP et dans les mêmes conditions de mesure RMN <sup>13</sup>C.

La mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur le MADAFP n'est pas aussi reproductible que celle effectuée sur le TAMAGF. Cette observation peut s'expliquer par les propriétés propres à la mesure RMN <sup>13</sup>C isotopique du MADAFP (temps d'expérience long, inhomogénéité des largeurs à mi-hauteur  $\Delta\nu_{1/2}$  et proximité des signaux C-3, C-4 et C-5 en terme de déplacements chimiques RMN <sup>13</sup>C). Ces aspects sont développés dans le chapitre 5.

### 3 Estimation du fractionnement isotopique associé à la dérivation

Une fois les molécules sondes choisies pour l'analyse par RMN <sup>13</sup>C quantitative (TAMAGF et MADAFP pour l'analyse du glucose et du fructose, respectivement), une étude sur la répétabilité de la dérivation en elle-même doit être menée pour évaluer si celle-ci est une source d'imprécision supplémentaire sur les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  obtenues. Lors de cette étude, les valeurs moyennes des  $\delta_i^{13}\text{C}$  obtenues sur n répétitions de la dérivation dans les mêmes conditions de synthèse seront considérées comme valeurs cibles et l'écart type de la répétabilité de dérivation sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  permettra de déterminer la précision de la méthodologie<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Le terme « méthodologie » employé ici concerne l'intégralité de la chaîne analytique : de la préparation de l'échantillon (dérivation) à l'analyse de cet échantillon (mesure par RMN <sup>13</sup>C isotopique)

Le but de cette méthodologie étant, à plus long terme de pouvoir étudier la filiation isotopique du glucose et/ou du fructose dans des processus donnés, nous devons nous assurer que les valeurs de déviations isotopiques obtenues *via* la molécule dérivée correspondent à celles de la molécule de glucose et/ou de fructose de départ. D'un point de vue analytique, ce concept est relié à la justesse de la méthodologie. Pour évaluer ce paramètre, les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur des produits obtenus avec des rendements faibles (ceci permettant une accentuation du fractionnement isotopique éventuel lors d'une réaction donnée) sur chacune des étapes de la dérivation seront comparées aux valeurs cibles (moyenne de la répétabilité de synthèse avec un taux de conversion le plus élevé possible).

La répétabilité de la dérivation et la robustesse de celle-ci vis-à-vis des résultats obtenus par RMN  $^{13}\text{C}$  a donc été évaluée sur la molécule dérivée du glucose, le TAMAGF, le dérivé du fructose donnant lieu à un temps d'analyse beaucoup trop long pour une telle étude. Nous estimerons par la suite, étant donné la similitude des réactions engagées pour la formation du dérivé du glucose et du fructose (mêmes étapes de transformations au cours de la dérivation), que les conclusions formulées quant au fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  sur la formation du dérivé du glucose s'appliquent aussi à la formation du dérivé du fructose MADAFP.

### 3.1 Répétabilité de synthèse

La répétabilité sur la synthèse du dérivé TAMAGF a été déterminée à partir d'un glucose de maïs (C4) et d'un saccharose de betterave (C3), à partir desquels la dérivation a été effectuée 8 et 4 fois, respectivement. Les moyennes et les écarts types représentés dans le Tableau 17 sont calculés sur les mesures des différents  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur les TAMAGF obtenus par ces dérivations.

Les écarts types sur la répétabilité de synthèse sur le même glucose de départ (maïs ; C4) ne sont pas différents de ceux observés pour la répétabilité de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$ . Les écarts types obtenus sur un même saccharose (betterave ; C3) après 4 dérivations différentes sont légèrement plus élevés pour le C-6. Celui-ci reste tout de même de l'ordre de grandeur attendu par cette technique (de l'ordre de 1‰).

**Tableau 17. Moyenne et écart type de répétabilité de synthèse sur la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  du TAMAGF obtenu à partir du glucose et du saccharose.**

TAMAGF		Site carboné					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Glucose	$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰) <sup>a</sup>	-6,6	-8,7	-8,0	-10,3	-12,4	-11,9
(n=8)	Ecart type (‰) <sup>a</sup>	0,8	0,8	0,6	0,5	0,5	0,7
Saccharose	$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰) <sup>b</sup>	-22,8	-26,0	-22,2	-17,8	-27,8	-31,1
(n=4)	Ecart type (‰) <sup>b</sup>	0,5	0,6	0,8	0,7	0,6	1,1

<sup>a</sup>Les valeurs sont calculées sur 8 dérivations différentes à partir du même glucose (glucose de référence) et dans les mêmes conditions de mesure RMN  $^{13}\text{C}$ .

<sup>b</sup>Les valeurs sont calculées sur 4 dérivations différentes à partir du même saccharose (saccharose de référence) et dans les mêmes conditions de mesure RMN  $^{13}\text{C}$ .

### 3.2 Robustesse de la dérivation en terme de fractionnement isotopique $^{13}\text{C}$

Pour s'assurer que la justesse des résultats n'est pas affectée par la méthodologie analytique, nous avons évalué le fractionnement isotopique associé à chaque étape de la synthèse. Si, pour chacune de ces trois étapes, aucun fractionnement isotopique n'est observé, nous estimerons que l'information obtenue sur la molécule dérivée reflète les «valeurs vraies» du sucre de départ. Nous estimerons qu'un fractionnement isotopique associé à l'une des trois étapes de la synthèse aura pour conséquence un changement de distribution intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  par rapport à la valeur cible.

Pour évaluer le fractionnement isotopique pendant une réaction donnée, le seul moyen est d'accentuer ce fractionnement isotopique en portant les rendements réactionnels à des taux très faibles. Si aucun fractionnement isotopique n'est observé avec un rendement de 50%, par exemple, sur une réaction, le fractionnement isotopique pour un rendement de 90% pourra être considéré comme nul. C'est dans cette optique que l'étude du fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à chacune des trois étapes de la dérivation a été réalisée.

L'indicateur de fractionnement isotopique retenu pour notre étude est la variation de distribution isotopique intramoléculaire (profil isotopique) entre la valeur cible (obtenue par répétabilité de synthèse) et la valeur mesurée à des rendements faibles pour chacune des trois étapes de la dérivation.

### 3.2.1 Etape 1 : acétonisation

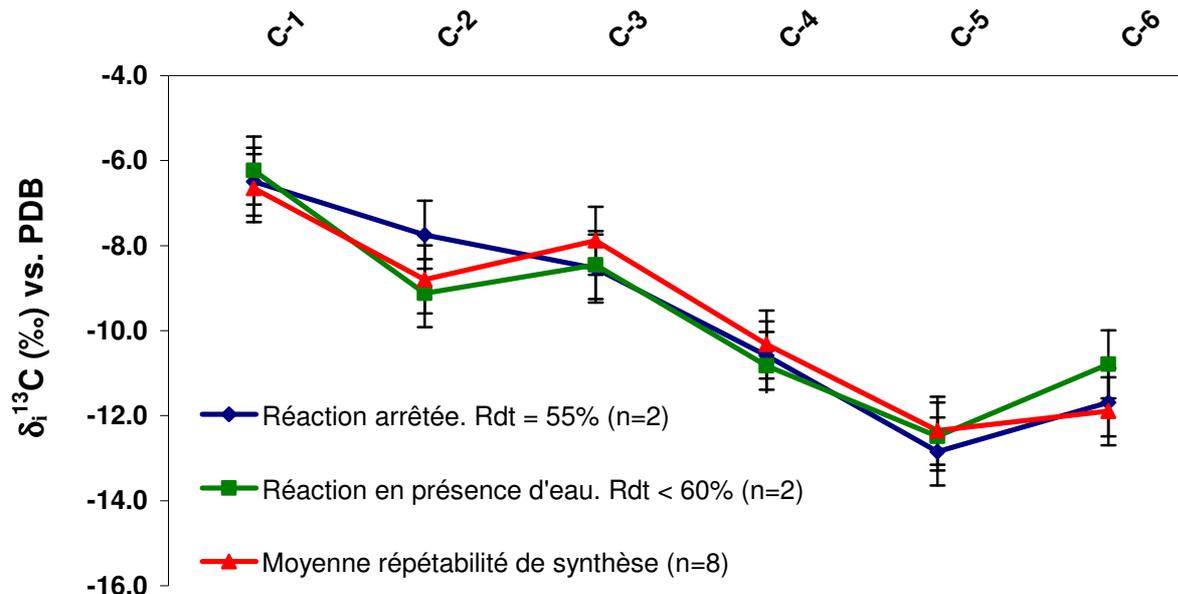
La première étape est la plus propice à un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  pour deux raisons : (i) le rendement peut être affecté par la teneur en eau dans les molécules de départ et (ii) avant la réaction d'acétonisation en elle-même, le fructose et le glucose se transforment en une forme linéaire (ouverte) avant d'être transformés en composés pyranose et furanose, respectivement. Cette transformation implique le passage des carbones anomériques des composés par une forme hybridée  $sp_2$  et peut donc induire un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$ .

Deux catalyseurs ont été utilisés pour la synthèse du DAGF à partir du glucose (première étape) : le diiode  $\text{I}_2$  et l'acide sulfurique concentré (98%)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pour chacun de ces deux catalyseurs, le fractionnement isotopique a été évalué en portant la transformation du glucose en DAGF à des rendements faibles.

#### 3.2.1.1 Catalyse par $\text{I}_2$

Le faible rendement lors de la première étape catalysée par  $\text{I}_2$  peut être obtenu de deux façons : soit la réaction est arrêtée par ajout de thiosulfate de sodium, soit de l'eau distillée (10% v/w par rapport au glucose de départ) est ajoutée au milieu réactionnel en début de réaction. Dans les deux cas, les rendements sont compris entre 50% et 60% et la réaction est répétée deux fois ( $n=2$ ). Les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées sur les TAMAGF obtenus par ces deux types de réaction sont reportés sur la Figure 40 ainsi que la moyenne sur le TAMAGF obtenu dans des conditions optimales de rendement (TAMAGF de répétabilité de synthèse).

Les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  ne montrent pas de différence significative entre un rendement faible et un rendement maximal (> 90%). La première étape peut donc être considérée comme robuste en terme de résultats, et nous estimerons par la suite que les résultats obtenus lors d'une dérivation avec un rendement supérieur à 60 % peuvent être considérés comme valides.



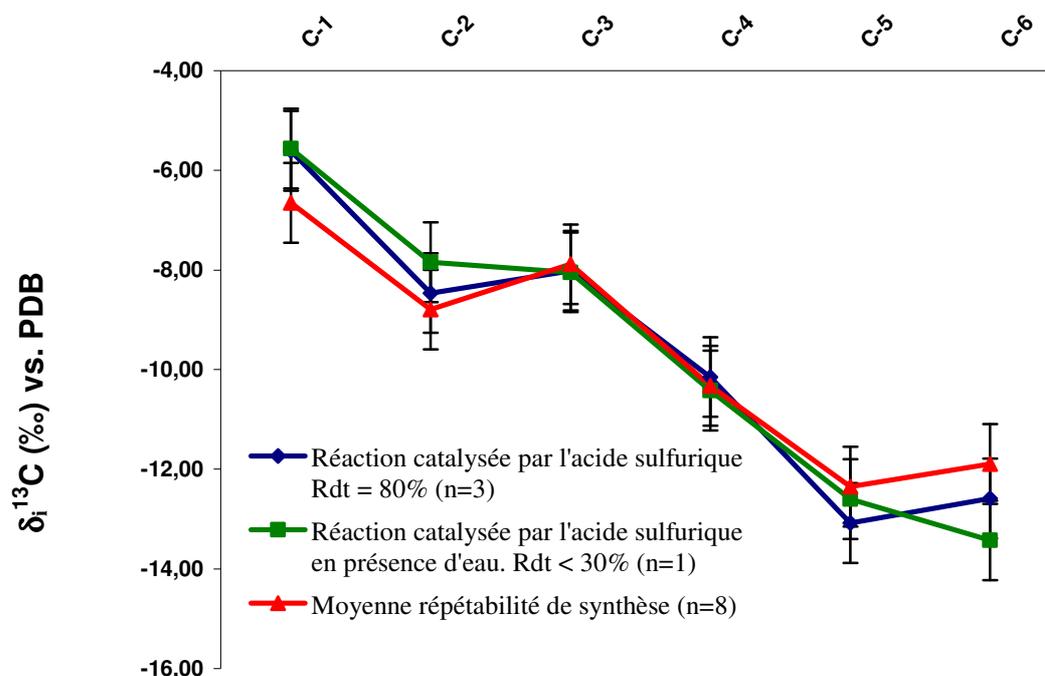
**Figure 40. Déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  déterminées par RMN<sup>13</sup>C sur chaque site carboné du TAMAGF issu du même glucose (maïs ; C<sup>4</sup>) avec un rendement optimal ou faible lors de la première étape catalysée par l'iode.**

Les courbes représentent les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  obtenues avec un rendement optimal (courbe rouge), diminué par la présence d'eau (courbe verte) et diminué par arrêt de la réaction par ajout de thiosulfate (courbe bleue). Les écarts types représentés sont ceux obtenus lors de la répétabilité de synthèse : 0,8‰ (cf. paragraphe 3.1 de ce chapitre).

### 3.2.1.2 Catalyse par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré

L'acide sulfurique concentré (98%) permet d'obtenir un rendement plus élevé que le diiode dans le cas d'échantillons présentant une teneur importante en eau. La dérivation en acétonide dans un milieu contenant de l'eau, jusqu'à 10% (w/w) par rapport au sucre de départ, permet d'obtenir un rendement de 80% avec une catalyse à l'acide sulfurique. Cet élément est très important pour la suite de notre étude, car les sucres à dériver pourront contenir une partie non négligeable d'eau provenant du milieu d'extraction. Nous avons donc testé l'acide sulfurique comme catalyseur pour la première étape, avec des proportions variables en eau dans le milieu de départ. Le rendement est de 80% lorsqu'une proportion de 10% en eau est présente dans le milieu et de 20% lorsque cette proportion est de 30%. Les expériences ont été réalisées 3 fois avec la présence de 10% d'eau dans le milieu de départ (n=3) et 1 fois avec la présence de 30% d'eau dans le milieu (n=1). Les déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  pour chaque site carboné du TAMAGF obtenu dans ces conditions ont été mesurées par RMN <sup>13</sup>C (Figure 41). La moyenne des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur le TAMAGF obtenu dans des conditions

optimales de rendement (TAMAGF de répétabilité de synthèse) est également reportée sur la Figure 41 pour comparaison. Les résultats montrent que, même avec un rendement de 30% sur cette étape, aucune différence significative n'est observée sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  du glucose. La synthèse apparaît donc robuste vis-à-vis du catalyseur et du fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$ .



**Figure 41. Déviations isotopiques déterminées par RMN $^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du TAMAGF issu du même glucose avec un rendement optimal ou faible lors de la première étape catalysée par l'acide sulfurique.**

Les courbes représentent les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  des TAMAGF obtenus avec un rendement optimal avec le diiode comme catalyseur, catalysé par l'acide sulfurique avec un rendement de 80% et catalysé par l'acide sulfurique en présence d'eau. Les écarts types représentés sont ceux obtenus lors de la répétabilité de synthèse : 0,8‰ (cf. paragraphe 3.1 de ce chapitre).

Aucun fractionnement isotopique n'est observé lors de la première étape de dérivation, et ce, même avec un rendement de 60% quel que soit le catalyseur utilisé. Ces résultats sont surprenants puisqu'un fractionnement isotopique est théoriquement envisagé lors de la transformation de la forme glucosepyranose en forme glucofuranose. Cependant, le fait qu'aucun fractionnement isotopique ne soit observé au cours de la première étape est encourageant quant à l'application de cette méthode à des matrices naturelles, pour lesquelles le rendement de dérivation pourrait être détérioré par la présence d'eau.

### 3.2.2 Etape 2 : hydrolyse du groupement isopropylidène

L'étape d'hydrolyse est *a priori* moins délicate du point de vue du fractionnement isotopique. En effet, cette étape transforme le DAGF en MAGF avec un taux de conversion supérieur à 90 %. De plus, le rendement sur cette étape n'est pas directement affecté par la qualité du glucose de départ. Le fractionnement isotopique lors de cette étape doit néanmoins être estimé pour évaluer l'impact de ce dernier sur les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées sur les dérivés des sucres par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique. Deux expériences permettant d'obtenir le MAGF à partir du DAGF avec un rendement compris entre 50% et 60% ont été réalisées. Celles-ci sont réalisées avec une durée plus courte de temps d'expérience : l'expérience est arrêtée à environ une heure après ajout de la solution d'acide acétique par évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif. Le mélange obtenu, contenant le DAGF restant et le MAGF est ensuite traité comme pour une expérience à rendement optimal (Chapitre 2 - paragraphe 4.2.2).

Les déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur le dérivé du glucose obtenu avec un rendement faible à la deuxième étape (n=2) sont regroupées dans le Tableau 18. La moyenne des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur la répétabilité de synthèse y est aussi reportée, pour comparaison.

**Tableau 18. Déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  obtenues par RMN  $^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du TAMAGF.**

Rendement	TAMAGF	Site carboné					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Normal <sup>a</sup> (n=8) <sup>a</sup>	$\delta_i^{13}\text{C}$ (‰)	-6,6	-8,7	-8,0	-10,3	-12,4	-11,9
Faible (n=2) <sup>b</sup>	$\delta_i^{13}\text{C}$ (‰)	-5,3	-7,6	-6,8	-10,7	-14,5	-13,0

<sup>a</sup>Rendement supérieur à 90% sur chacune des trois étapes.

<sup>b</sup>Rendement égal à 55% sur la deuxième étape (hydrolyse du groupement isopropylidène) et supérieur à 90% sur les deux autres étapes.

Un fractionnement isotopique faible (écart de 2,1‰ par rapport à la valeur cible) est observé sur le site carboné C-5. Cependant, aux rendements de synthèse habituels (minimum 90%), le fractionnement isotopique lors de cette transformation peut être considéré comme négligeable.

### 3.2.3 Etape 3 : Acétylation des groupements hydroxyles

L'étude de la robustesse pour la troisième étape a été réalisée sur un MAGF commercial en comparant les valeurs de  $\delta_i^{13}\text{C}$  d'un TAMAGF acétylé avec un rendement optimal (>95%)

avec celles d'un TAMAGF acétylé avec un rendement égal à 60% (expérience réalisée deux fois). Celles-ci sont réalisées avec une durée plus courte de temps d'expérience : l'expérience est arrêtée à environ une heure après ajout de l'anhydride acétique par évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif. Le mélange obtenu, contenant le MAGF restant et le TAMAGF est ensuite traité comme pour une expérience à rendement optimal (Paragraphe 6.3.1 de ce Chapitre).

Les déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur les TAMAGF obtenus dans ces deux conditions de rendement sont regroupées dans le Tableau 19.

**Tableau 19. Déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  obtenues par RMN  $^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du TAMAGF.**

Rendement	TAMAGF	Site carboné					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Normal <sup>a</sup>	$\delta_i^{13}\text{C}$ (‰)	-21,1	-22,6	-23,4	-25,7	-29,0	-27,7
Faible (n=2) <sup>b</sup>	$\delta_i^{13}\text{C}$ (‰)	-21,3	-21,5	-23,8	-25,8	-29,8	-27,3

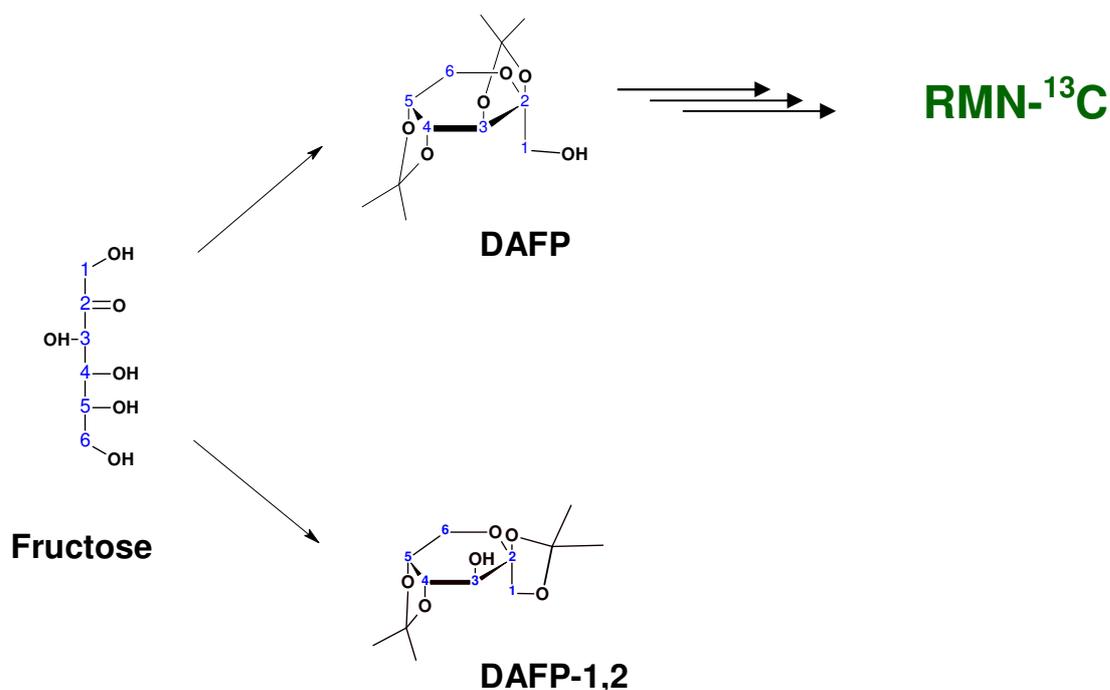
<sup>a</sup>Valeurs obtenues sur un TAMAGF provenant de l'acétylation d'un MAGF commercial avec un rendement supérieur à 95%.

<sup>b</sup>Valeurs obtenues sur un TAMAGF provenant de l'acétylation d'un MAGF commercial avec un rendement supérieur à 95%.

L'absence de fractionnement isotopique à 60% de transformation du MAGF en TAMAGF, indique qu'à des rendements habituels de synthèse (> 95 %), le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à cette transformation est nul.

### 3.2.4 Fractionnement isotopique en $^{13}\text{C}$ lors de la formation du sous-produit issu du fructose

Nous avons estimé, pour l'étude sur la robustesse, que les réactions impliquées dans la formation du TAMAGF et du MADAFP étaient les mêmes. Cependant, comme mentionné dans le chapitre 2 (paragraphe 2.5), lors de la dérivation du fructose, un sous-produit est formé : le DAFP-1,2 (Figure 42). La formation de ce sous-produit est caractéristique de la dérivation en MADAFP et doit donc être évaluée en terme de fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$ .

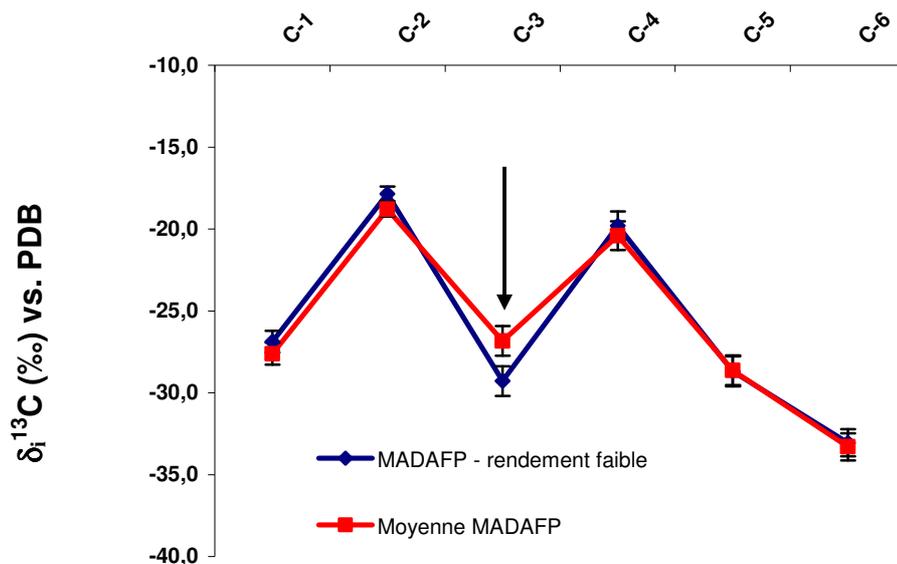


**Figure 42. Formation des deux produits lors de l'acétonation du fructose : 1,2,4,5-di-O-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (DAFP-1,2) et 2,3,4,5-di-O-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (DAFP).**

Ce dernier est formé plus aisément à forte température ou en utilisant un catalyseur acide fort (acide sulfurique).

La formation de ce sous-produit ne peut pas être évitée totalement, et ce même dans les conditions optimales (catalyse par l'acide sulfurique concentré) où une proportion d'environ 5% par rapport au DAFP est obtenue. Pour valider la méthode d'analyse, il convient d'évaluer les conséquences de la formation de ce composé sur les déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  du dérivé du fructose MADAFP.

Pour cela, une synthèse a été réalisée à 40°C à partir du fructose de référence avec l'iode comme catalyseur. La proportion de DAFP-1,2 par rapport au DAFP est d'environ 50% (déterminée par RMN  $^1\text{H}$ ). Le mélange est ensuite mis en présence d'acide acétique à 80% dans l'eau (étape 2) pour éliminer le DAFP-1,2 (chapitre 2 –paragraphe 4.2.2). Le DAFP est ensuite acétylé, purifié (partie expérimentale – paragraphe 6.4.1), puis analysé par RMN  $^{13}\text{C}$ . Les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées sur ce composé sont comparées avec celles du même composé obtenu dans des conditions optimales (5% de DAFP-1,2). Les résultats sont regroupés sur la Figure 43.



**Figure 43. Déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  déterminées par RMN  $^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du MADAFP obtenu dans des conditions typiques de synthèse et dans des conditions de forte proportion (environ 50%) de formation du DAFP-1,2 à l'étape 1 de la dérivation.** Les mesures ont été effectuées sur le spectromètre 400A. Les écarts types représentés sont ceux obtenus lors de la répétabilité de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur le MADAFP : 1‰ (cf. paragraphe 2.2.3 de ce chapitre).

Un fractionnement isotopique faible est observé sur le carbone 3 du fructose. Ce fractionnement suggère un effet isotopique normal associé à la formation du DAFP (appauvrissement du DAFP par rapport au fructose de départ). Une proportion de 50% conduit à une différence de déviation isotopique de 2,5‰. Le fractionnement isotopique associé à une proportion de 5% du sous-produit peut dès lors être considéré comme négligeable. Cependant, lors de la dérivation du fructose (ou du saccharose) pour son analyse par RMN  $^{13}\text{C}$ , une attention particulière devra être portée à la proportion de sous-produit (DAFP-1,2) formé, puisque la teneur en eau du produit de départ peut favoriser sa formation.

## 4 Premières applications

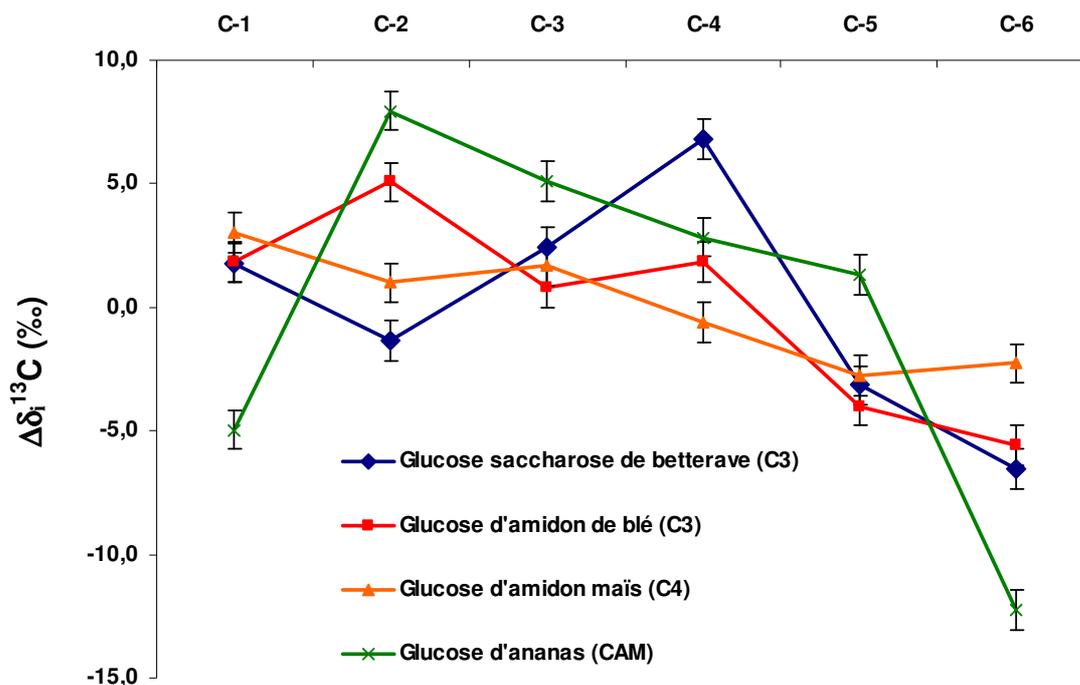
La méthodologie décrite dans ce chapitre a été appliquée à divers glucoses d'origine connue (glucose de saccharose de betterave (C3), glucose d'amidon de blé (C3), glucose d'amidon de maïs (C4) et glucose provenant des sucres extraits d'un jus d'ananas (CAM)). Les résultats sont présentés sur la Figure 44. Pour s'affranchir des différences de déviations isotopiques globales entre les échantillons, les résultats sont présentés en écart à la déviation isotopique globale du glucose, mesurée par SMRI : pour un site carboné  $i$  donné, l'axe des

ordonnées représente l'écart à la valeur globale  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ , donné par :

$$\Delta\delta_i^{13}\text{C} = \delta_i^{13}\text{C} - \delta_g^{13}\text{C} \quad (30)$$

$\delta_i^{13}\text{C}$  : déviation isotopique en carbone 13 du site carboné i

$\delta_g^{13}\text{C}$  : déviation isotopique globale en carbone 13 obtenue par SMRI



**Figure 44. Comparaison des écarts à la moyenne des déviations isotopiques  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné d'un glucose de saccharose de betterave (C3), d'un glucose d'amidon de blé (C3), d'un glucose d'amidon de maïs (C4) et d'un glucose d'ananas (CAM) obtenus par la méthodologie décrite dans ce chapitre.**

Les écarts types représentés sont ceux obtenus lors de la répétabilité de synthèse : 0,8%. (cf. paragraphe 3.1 de ce chapitre). Les valeurs sont données en écart par rapport à la valeur globale donnée par la SMRI :  $\Delta\delta_i^{13}\text{C} = \delta_i^{13}\text{C} - \delta_g^{13}\text{C}$ .

Les résultats montrent que la distribution isotopique intramoléculaire varie selon l'origine de la plante dont est extrait le sucre étudié. Ces résultats constituent une approche préliminaire et nécessitent la collecte d'un plus grand nombre d'échantillons pour évaluer l'aspect reproductible, pour une origine donnée, des valeurs des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  observées. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons de glucoses, de fructoses et de saccharoses fait l'objet du chapitre 7.

## 5 Conclusion

La méthodologie présentée dans ce chapitre permet la détermination de la teneur isotopique en carbone  $^{13}\text{C}$  dans les molécules de glucose, fructose et saccharose. L'addition d'une dernière étape de dérivation (acétylation) permet :

- de s'affranchir d'éventuels effets de substitution isotopique D/H sur les déplacements chimiques RMN  $^{13}\text{C}$  dus aux deutériums échangeables du solvant (cf. chapitre 3) ;
- d'obtenir des composés dont la purification est plus aisée, notamment concernant le dérivé du glucose TAMAGF ;
- l'utilisation d'un solvant plus fluides (induisant des raies RMN  $^{13}\text{C}$  plus fines) dans le cas du TAMAGF.

La répétabilité instrumentale RMN  $^{13}\text{C}$  ainsi que la reproductibilité inter spectromètres, associées à la détermination des déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$ , ont été évaluées sur les molécules choisies pour la méthodologie : TAMAGF et MADAFP. Concernant le TAMAGF, les résultats sont très satisfaisants (répétabilité RMN  $^{13}\text{C}$  et reproductibilité inter spectromètres inférieures à 1,1‰). Pour le MADAFP, en revanche, les valeurs de  $\delta_i^{13}\text{C}$  et les écarts types sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurés diffèrent d'un spectromètre à l'autre. Les facteurs responsables de cette différence seront développés plus en détails dans le chapitre 5.

La dérivation apparaît répétable sur le dérivé du glucose, TAMAGF, avec un écart type sur la répétabilité de synthèse de 0,8‰. De plus, l'étape la plus délicate en terme de fractionnement isotopique (étape 1) ne semble pas être source de fractionnement isotopique, même à des rendements inférieurs à 60%. Aux rendements habituels de synthèse, le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à la dérivation peut être considéré comme négligeable. Une attention particulière devra être portée à la formation du dérivé du fructose DAFP-1,2 puisque (i) il apparaît qu'un faible fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  est associé à sa formation et (ii) ce composé, une fois hydrolysé en MAFP-1,2 et acétylé, peut contaminer le TAMAGF issu de la dérivation du saccharose et/ou d'un mélange glucose/fructose.

La méthodologie a été appliquée pour la détermination des  $\delta_i^{13}\text{C}$  d'un glucose de jus de fruit (ananas) de glucoses d'amidon (blé et maïs) et de la partie glucosyle d'un saccharose de betterave. Ces premiers résultats montrent que la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  du glucose peut varier selon son origine botanique.

## 6 Partie expérimentale

### 6.1 Provenance des produits

Le MAGF utilisé pour la dérivation en TAMAGF provient de chez Fluka. L'anhydride acétique (pureté>99%), l'anhydride trifluoroacétique (pureté>99%), l'anhydride propionique (pureté>99%) et la pyridine (pureté>99,8%) proviennent de chez Acros. L'acide sulfurique (98%) provient de chez VWR.

Les autres produits utilisés lors de la synthèse sont ceux utilisés au chapitre 2 – paragraphe 4.1.

### 6.2 Dérivation du glucose en DAGF à l'aide de l'acide sulfurique

1 g de glucose est introduit dans un ballon de 100 mL puis 50 mL d'acétone et 100  $\mu$ L d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à 60°C. La réaction est suivie par CCM (éluant : éther de pétrole / éther diéthylique 2:8 (v/v), révélation H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % dans l'éthanol et chauffage au décapeur thermique). Au bout de 6 heures, la réaction est terminée et est traitée comme suit : après refroidissement, une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub> est ajoutée au milieu. Celui-ci est alors évaporé à l'évaporateur rotatif sous vide pour éliminer l'acétone. Le milieu est alors repris dans 50 mL d'eau distillée. La phase aqueuse est ensuite extraite avec 2 x 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 100 mL d'eau distillée, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées puis évaporées à l'évaporateur rotatif sous vide. Le DAGF obtenu est traité comme décrit dans le chapitre 2 – paragraphe 4.2.2 pour obtenir le MAGF.

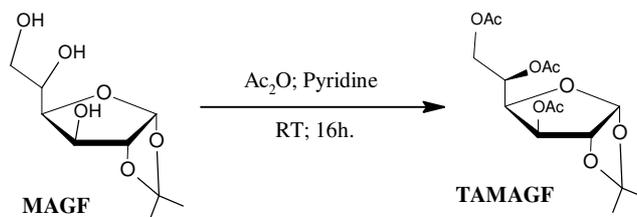
### 6.3 Dérivation du MAGF

Deux dérivations du MAGF ont été testées, la première est une acétylation des trois fonctions hydroxyles à l'aide de l'anhydride acétique et la deuxième à l'aide d'anhydride trifluoroacétique.

Avant les étapes d'acétylation, le MAGF est préalablement séché au dessiccateur une nuit sous vide sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

#### 6.3.1 Acétylation du MAGF en TAMAGF (Figure 45)

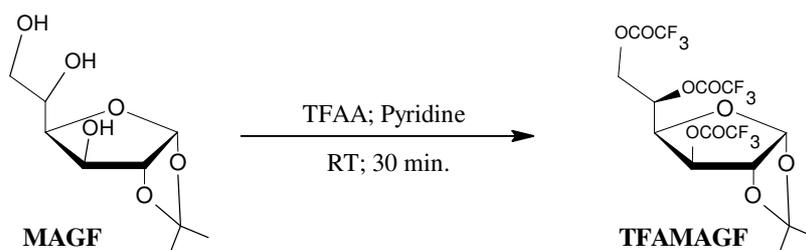
1 g de MAGF est introduit dans un ballon de 250 mL puis 20 mL de pyridine et 1,5 g d'anhydride acétique sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (Eluant Cyclohexane/AcOEt 3:1 v/v). Une fois la réaction terminée (disparition du MAGF de départ), 50 mL de toluène sont ajoutés et le milieu est évaporé à l'évaporateur rotatif.



**Figure 45. Dérivation du MAGF à l'aide de l'anhydride acétique ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ).**

La solution jaunâtre obtenue est reprise avec 50 mL d'une solution  $\text{NaHCO}_3$  aqueux à 15 % (w/v) et 75 mL de dichlorométhane. Après extraction, la phase aqueuse est réextraite avec 2 x 40 mL de dichlorométhane, les phases organiques rassemblées étant ensuite lavées avec 150 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  distillée. La phase organique est ensuite séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée sur coton, et évaporée à l'aide de l'évaporateur rotatif.

### 6.3.2 Acétylation du MAGF en TFAMAGF (Figure 46)



**Figure 46. Dérivation du MAGF à l'aide de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA).**

1 g de MAGF est introduit dans un ballon de 250 mL puis 20 mL de pyridine et 1,5 g d'anhydride trifluoroacétique sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (Eluant Cyclohexane/ $\text{AcOEt}$  3:1 v/v). Une fois la réaction terminée (disparition du MAGF de départ), 50 mL de toluène sont ajoutés et le milieu est évaporé à l'évaporateur rotatif. La solution jaunâtre obtenue est reprise avec 50 mL d'une solution  $\text{NaHCO}_3$  aqueux à 15 % (w/v) et 75 mL de dichlorométhane. Après extraction, la phase aqueuse est réextraite avec 2 x 40 mL de dichlorométhane, les phases organiques rassemblées étant ensuite lavées avec 150 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  distillée. La phase organique est ensuite séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée sur coton, et évaporée à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le produit n'est pas purifié par la suite, la CCM montrant trop d'impuretés formées lors de cette réaction.

### 6.3.3 Purification(s) du TAMAGF

1 g de produit préalablement obtenu est dissous dans un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle 4:1 puis déposés sur colonne de gel de silice contenant 60 g de silice 63-200  $\mu\text{m}$  préalablement conditionné au cyclohexane. L'élution se fait avec un éluant cyclohexane/AcOEt 4:1 (v/v) et les fractions sont récoltées dans des tubes à essai (20 mL). Les fractions 20 à 70 contiennent le produit pur (suivi par CCM éluant cyclohexane/AcOEt 3:1v/v). Les fractions contenant le produit sont évaporées à l'évaporateur rotatif. Lors de la dérivation à partir d'un saccharose ou d'un mélange glucose/fructose, une recrystallisation à l'éther de pétrole peut être effectuée afin d'éliminer au maximum le composé dérivé du fructose non désiré (TAMAFP-1,2).

## 6.4 Dérivations du DAFP

### 6.4.1 1-O-Acétyle-2,3;4,5-di-O-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (Figure 47)

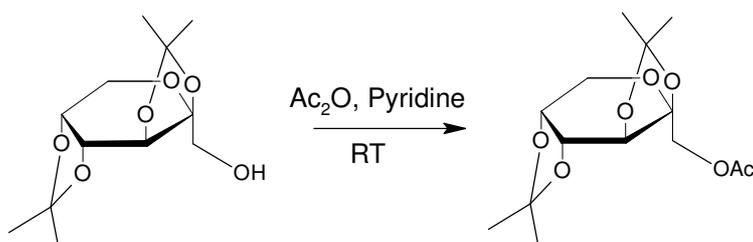


Figure 47. Dérivation du DAFP à l'aide de l'anhydride acétique ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ).

500 mg de DAFP (1,92 mmol) sont dissous dans 5 mL de pyridine (99%) puis 300  $\mu\text{L}$  d'anhydride acétique 99% (3,18 mmol ; 1,7 éq.) sont ajoutés et le mélange est agité à température ambiante jusqu'à disparition totale du DAFP (suivi par CCM ; éluant cyclohexane/AcOEt 4:1 v/v). Le mélange est alors évaporé à l'évaporateur rotatif, puis coévaporé avec du toluène pour éliminer la pyridine restante. Le résidu est repris dans 50 mL de dichlorométhane et 50 mL d'une solution de HCl à 0,5 M. Après décantation, la phase organique est récupérée puis lavée avec 50 mL de la solution de HCl à 0,5 M puis 2 x 50 mL d'une solution de  $\text{NaHCO}_3$  à 15 % (w/v) dans l'eau et enfin 2 x 50 mL d'eau distillée. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif.

#### 6.4.2 1-O-TrifluoroAcétyl-2,3;4,5-di-O-isopropylidène-β-D-fructopyranose (Figure 48)

500 mg de DAFP (1,92 mmol) sont dissous dans 5 mL de Diméthylformamide DMF (99%). 600 µL d'anhydride trifluoroacétique TFAA 99% (3,08 mmol ; 1,6 éq.) sont ajoutés et le mélange est agité à température ambiante jusqu'à disparition totale du DAFP au bout d'environ 5 minutes (suivi par CCM ; éluant cyclohexane/AcOEt 4:1 v/v).

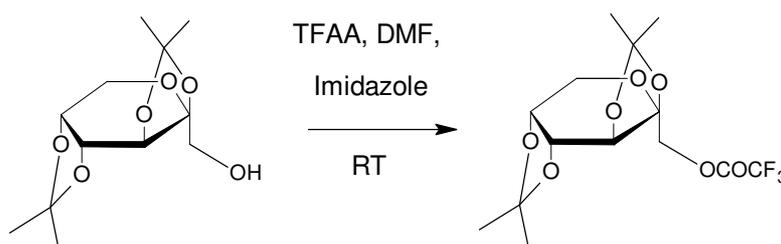


Figure 48. Dérivation du DAFP à l'aide de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA).

Le mélange est alors évaporé à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans 50 mL de dichlorométhane et 50 mL d'une solution de HCl à 0,5 M. Après décantation, la phase organique est récupérée puis lavée avec 50 mL de la solution de HCl puis 2 x 50 mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 15% (w/v) dans l'eau et enfin 2 x 50 mL d'eau distillée. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif.

#### 6.4.3 1-O-Propionyl-2,3;4,5-di-O-isopropylidène-β-D-fructopyranose (Figure 49)

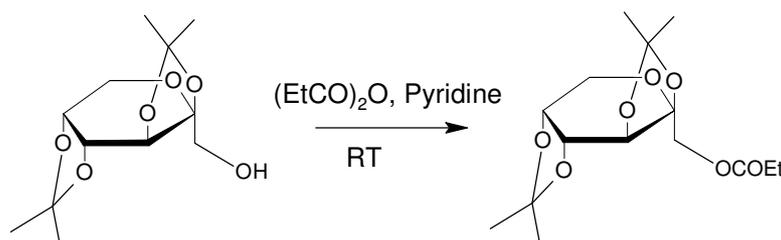


Figure 49. Dérivation du DAFP à l'aide de l'anhydride propionique ((EtCO)<sub>2</sub>O).

500 mg de DAFP (1,92 mmol) sont dissous dans 5 mL de pyridine (99%) puis 400 µL d'anhydride propionique 99% (3,30 mmol ; 1,7 éq.) sont ajoutés et le mélange est agité à température ambiante jusqu'à disparition totale du DAFP (suivi par CCM ; éluant cyclohexane/AcOEt 4:1 v/v).

Le mélange est alors évaporé à l'évaporateur rotatif, puis coévaporé avec du toluène pour éliminer la pyridine restante. Le résidu est repris dans 50 mL de dichlorométhane et 50 mL d'une solution de HCl à 0,5 M. Après décantation, la phase organique est récupérée puis lavée avec 50 mL de la solution de HCl à 0,5 M puis 2 x 50 mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 15% (w/v) dans l'eau et enfin 2 x 50 mL d'eau distillée. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif.

## 6.5 Analyse RMN <sup>13</sup>C

### 6.5.1 Préparation des tubes

Les produits sont pesés dans un pilulier de 4 mL et dissous dans le solvant ou le mélange de solvant comme indiqué dans le Tableau 20. Le mélange peut être légèrement chauffé au sèche-cheveux pour faciliter la solubilisation du composé. Une fois le mélange bien homogénéisé, celui-ci est filtré sur Kimwipes dans un tube RMN de 5 mm de diamètre externe.

Tableau 20. Conditions de préparation du TAMAGF et du MADAFP pour leur analyse RMN <sup>13</sup>C.

Paramètre	TAMAGF	MADAFP
Masse (mg)	280	300
Solvant	Acétone-d <sub>6</sub>	Acétone-d <sub>6</sub>
Volume solvant (μL)	500	500
Relaxant	Non	20 μL de Cr(Acac) <sub>3</sub> à 0,1 M dans l'acétone

### 6.5.2 Paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup>C

Les paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup>C isotopique du TAMAGF et du MADAFP sont regroupés dans le Tableau 21.

**Tableau 21. Paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup>C isotopique du TAMAGF et du MADAFP.**

<b>Paramètre</b>	<b>TAMAGF</b>	<b>MADAFP</b>
<b>T1 <sup>13</sup>C le plus long (s)</b>	1,5	7,5
<b>D1 (s)</b>	15	75
<b>AQ (s)</b>	0,8	1
<b>NS (s)</b>	720	540
<b>Durée par spectre</b>	3 heures	10 heures

### **6.5.3 Paramètres utilisés pour le lissage**

Les spectres RMN <sup>13</sup>C obtenus dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent sont traités à l'aide d'une fonction d'apodisation de type exponentielle décroissante avec un facteur d'élargissement des raies (lb) dépendant des conditions de préparation de l'échantillon et de la durée d'échantillonnage du signal AQ (lb = 1,6 pour le TAMAGF et lb = 1,4 pour le MADAFP). Un phasage et une correction de la ligne de base sont effectués sur le spectre ainsi obtenu après transformée de Fourier.

L'intégration des raies des signaux d'intérêt est effectuée à l'aide du logiciel Perch (Université de Kuopio, Finlande). Ce logiciel permet de lisser les raies par des lorentziennes tout en ajustant les déplacements chimiques, la largeur à mi-hauteur, l'amplitude ainsi qu'une correction de la phase des pics. L'option dispersion (D) est ajoutée sur tous les signaux pour le TAMAGF et seulement sur les signaux correspondant aux carbones C-1, C-2 et C-6 du MADAFP, les autres signaux n'étant pas suffisamment séparés.

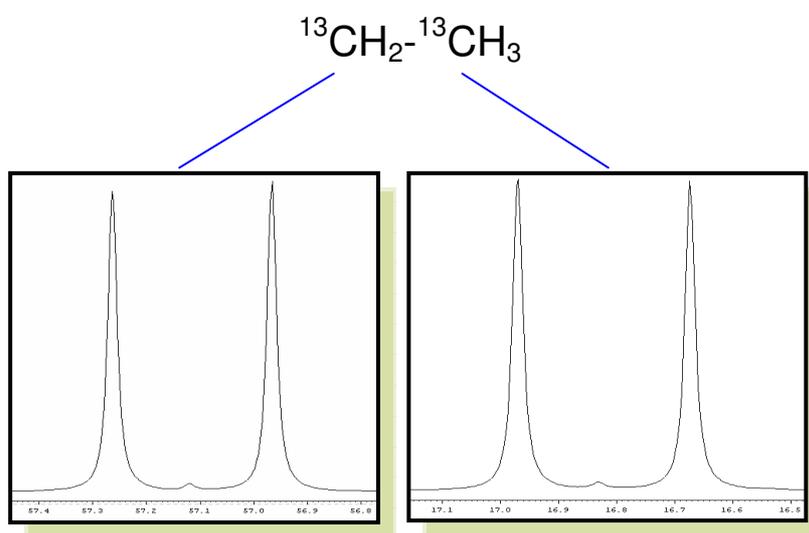
### **6.5.4 Mesures SMRI**

Les mesures SMRI ont été effectuées en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2.

# Chapitre 5 - Evaluation de l'impact des paramètres du lissage sur la justesse et la précision des mesures effectuées par RMN $^{13}\text{C}$

## 1 Introduction

Un des inconvénients majeurs de la RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique est l'absence de technique de référence permettant d'obtenir les valeurs de déviations isotopiques intramoléculaires sur une molécule donnée. Dès lors, la justesse de cette technique ne peut pas être évaluée par comparaison avec d'autres techniques analytiques. La précision de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  peut être déterminée en effectuant une étude de répétabilité à long terme (cf. chapitre 4 – paragraphe 2.1.3 et ref. [37]). La justesse de cette technique, quant à elle, est évaluée en utilisant des molécules bi-marquées en carbone 13 (éthanol et acide acétique) [90]. L'allure des signaux correspondant aux sites méthyle et méthylène de l'éthanol bi-marqué sont donnés sur la Figure 50 pour exemple.



**Figure 50. Allure des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  de l'éthanol bi-marqué en carbone 13.**

La présence de doublets est due au couplage  $^1J^{13}\text{CH}_2-^{13}\text{CH}_3$ .

Une mesure fiable donne théoriquement des aires identiques pour les deux doublets.

Le paramètre retenu pour l'évaluation de la justesse de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  est le paramètre  $\Delta$ , exprimé en ‰ :

$$\Delta = \left( \frac{f_{\text{CH}_2}}{F_{\text{CH}_2}} - 1 \right) \times 1000 \quad (31)$$

$f_{\text{CH}_2}$  : fraction molaire du site  $\text{CH}_2$  déterminée expérimentalement à partir de la surface des doublets :

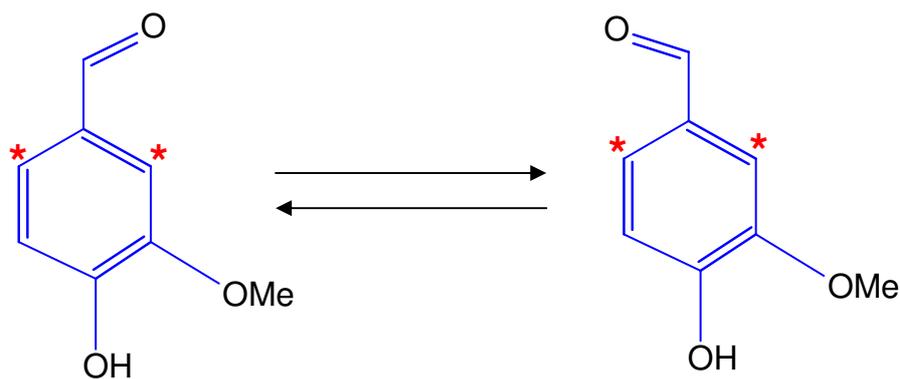
$$f_{\text{CH}_2} = \frac{S_{\text{doubletCH}_2}}{S_{\text{doubletCH}_2} + S_{\text{doubletCH}_3}} \quad (32)$$

$F_{\text{CH}_2}$  : fraction molaire théorique du site  $\text{CH}_2$  dans la molécule d'éthanol ( $F_{\text{CH}_2} = 1/2$ )

Lorsque la mesure est réalisée dans des conditions quantitatives et de découplage  $^1\text{H}$  optimales, les aires des deux signaux de la molécule bi-marquée sont identiques et  $\Delta$  est égal à 0. En pratique, une valeur de  $\Delta$  comprise entre 0 et 2‰ est considérée comme acceptable. Les molécules bi-marquées sont utilisées régulièrement pour évaluer l'efficacité du découplage et l'aspect quantitatif des appareils utilisés pour la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  en abondance naturelle et lors d'un changement de configuration d'un appareil. Cependant, même si les conditions quantitatives sont respectées et que le découplage  $^1\text{H}$  est optimal, d'autres phénomènes peuvent générer une erreur dans la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  d'une molécule en abondance naturelle.

L'exemple de l'effet de substitution isotopique  $\text{H} \rightleftharpoons \text{D}$  sur le déplacement chimique RMN  $^{13}\text{C}$  étudié au chapitre 3 permet d'illustrer l'impact de ces phénomènes sur l'allure de signaux et sur les valeurs des déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées.

De la même manière, des études sont actuellement en cours au laboratoire pour tenter de déterminer l'effet de l'échange conformationnel de la vanilline sur les valeurs des déviations isotopiques mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative. Cette molécule possède une fonction aldéhyde en  $\alpha$  d'un cycle benzénique. Selon la position de l'oxygène du groupement aldéhyde par rapport aux autres constituants du cycle benzénique, les carbones en  $\beta$  de cette fonction n'auront pas le même déplacement chimique RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 51). Le signal RMN  $^{13}\text{C}$  pour ces carbones est d'autant plus large que l'échange est lent par rapport au phénomène RMN, ce qui peut induire une erreur sur les mesures des  $\delta_i^{13}\text{C}$ .



**Figure 51. Equilibre conformationnel de la vanilline.**

Les signaux des carbones situés en  $\beta$  de l'aldéhyde (\*) subissent un élargissement dû à cet équilibre.

Les signaux obtenus par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sont théoriquement de forme lorentzienne. La déformation des raies (par un échange conformationnel dans le cas de la vanilline, par exemple) induit une forme plus éloignée de la forme lorentzienne théoriquement attendue. L'ajustement des signaux à une courbe théorique (« lissage » des signaux) peut alors être effectué en utilisant des fonctions gaussiennes, qui permettent de prendre en compte, en partie, l'élargissement des signaux lors de la détermination de leur aire.

Dans notre cas, les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées sur le dérivé du glucose TAMAGF sur les trois spectromètres (400A, 400B et 500) ne montrent pas de différence significative (reproductibilité sur la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  de 1,1‰). En revanche, les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  du dérivé du fructose MADAFP mesurées sur les deux spectromètres 400A et 500 sont différentes, avec des écarts pouvant aller jusqu'à 4‰ sur certains sites carbonés. Cette différence de comportement entre le TAMAGF et le MADAFP peut s'expliquer par les propriétés intrinsèques à la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique du MADAFP :

- temps de mesure relativement long (30 heures pour le MADAFP contre 10 heures pour le TAMAGF) ce qui rend la mesure sur le MADAFP plus sensible aux instabilités de l'appareillage ;
- présence d'un carbone quaternaire dans la structure du MADAFP. Les temps de relaxation transversale  $T_2^{13}\text{C}$  des signaux de ce composé, et par là même les largeurs à mi-hauteur  $\Delta\nu_{1/2}$ , ne seront pas homogènes pour tous les signaux : un défaut inhérent au spectre (problème de shims, par exemple) n'aura pas la même répercussion sur tous les signaux ;
- proximité des trois signaux correspondant aux carbones C-3, C-4 et C-5. Les déplacements chimiques ne sont pas les mêmes sur les deux spectromètres

(signaux plus proches sur le 400A que sur le 500), de même que les satellites sont mieux résolus sur le 400A que sur le 500.

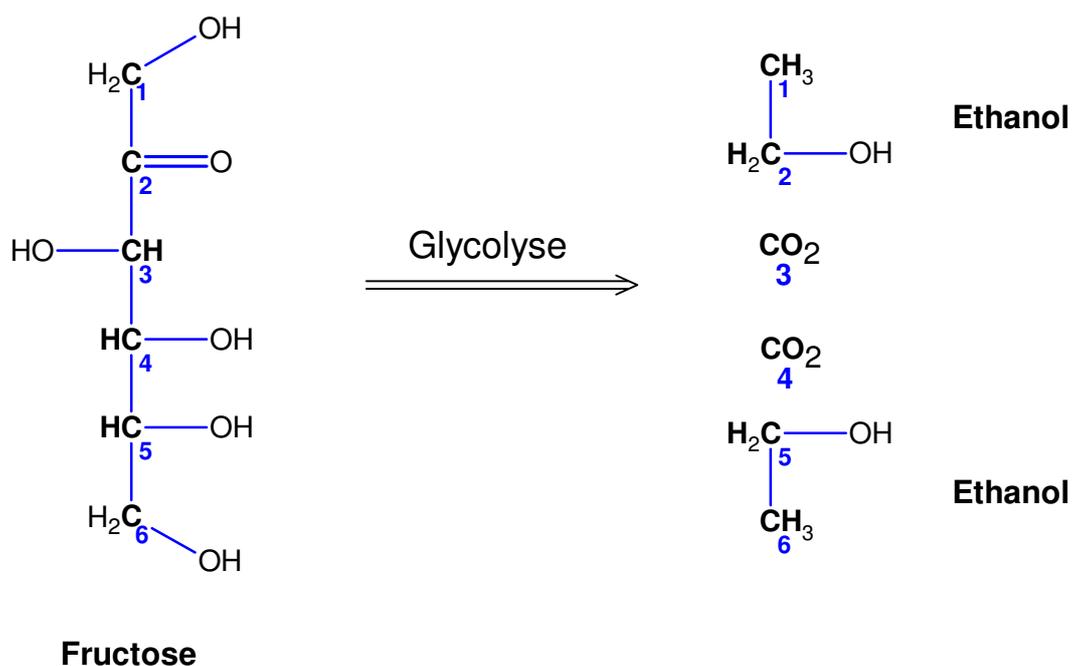
Ces trois propriétés, associées aux défauts inhérents aux spectromètres (problèmes de shims, efficacité du découplage, etc.) conduisent à se poser la question de la justesse des valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées sur cette molécule. L'objectif de ce chapitre est de d'évaluer l'impact du mode de lissage sur les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  du MADAFP, et de sélectionner le mode de lissage permettant l'obtention des valeurs les plus justes et précises possibles sur le dérivé du fructose.

## 2 Résultats et discussion

### 2.1 Critères pour la sélection du mode de lissage

Les critères qui devront être utilisés pour la sélection d'un mode de lissage adapté pour le MADAFP sont, d'une part, l'écart type obtenu sur  $n$  mesures sur la même molécule (MADAFP de référence), et d'autre part la cohérence des valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  obtenues sur les molécules de référence avec celles obtenues sur les éthanol provenant de la fermentation du fructose ayant servi à l'obtention du MADAFP. Ce dernier critère fait l'objet d'un paragraphe dans le chapitre suivant (chapitre 6 – paragraphe 2.1.2). Lors de la fermentation du fructose par la voie glycolytique, le site méthyle ( $\text{CH}_3$ ) de l'éthanol est formé par les sites carbonés C-1 et C-6 du fructose de départ, et le site méthylène ( $\text{CH}_2$ ) est formé par les sites carbonés C-2 et C-5 du fructose de départ.

En considérant un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  négligeable au cours de la fermentation (ce fractionnement isotopique est estimé dans le chapitre 6 – paragraphe 2.1.1.3), la déviation isotopique du site méthyle,  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$ , est théoriquement la moyenne des déviations isotopiques des sites carbonés C-1 et C-6 et celle du site méthylène,  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$ , la moyenne des sites carbonés C-2 et C-5 (Figure 52) du fructose de départ.



**Figure 52. Schéma simplifié du processus fermentation du fructose par voie glycolytique.**

Les deux critères retenus pour apprécier la justesse et la précision de nos résultats seront donc :

- Les écarts types obtenus sur les 5 mesures effectuées par RMN  $^{13}\text{C}$  sur les spectromètres 400A et 500 ;
- L'écart entre les valeurs de déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  mesurées sur le fructose *via* le MADAFP et celles obtenues sur l'éthanol provenant de la fermentation glycolytique de ce même fructose.

## 2.2 Effets de différents paramètres de lissage pour l'obtention des déviations isotopiques sur le MADAFP

Un mode de lissage incluant des fonctions gaussiennes a donc été utilisé pour le traitement des 5 échantillons mesurés sur le 400A, et comparé au traitement habituel, utilisant seulement un lissage lorentzien et incluant de la dispersion (permettant de compenser les effets du phasage du spectre). Le Tableau 22 montre les résultats des  $\delta_i^{13}\text{C}$  obtenus en utilisant les différents modes de lissage ainsi que l'écart à la valeur expérimentale des déviations isotopiques sur l'éthanol issu de ce fructose  $\Delta\text{CH}_2$  et  $\Delta\text{CH}_3$  (colonnes de droite).

**Tableau 22. Effet du lissage sur les valeurs des déviations isotopiques calculées sur la molécule MADAFP de référence sur le spectromètre 400A.**

MADAFP (n=5) 400A	Site carboné						$\Delta\text{CH}_2$	$\Delta\text{CH}_3$
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6		
lb = 1,4 Hz Dispersion seule <sup>a</sup>	-27,6	-18,6	-27,1	-20,3	-28,4	-33,5	2,4	-2,4
SD (‰)	0,6	0,5	1,0	0,8	0,9	0,9		
lb = 1,4 Hz Dispersion + Gaussienne <sup>b</sup>	-27,0	-20,2	-24,4	-20,7	-31,6	-31,6	0,0	-1,2
SD (‰)	0,7	0,4	1,1	1,0	1,1	1,0		

<sup>a</sup>Mode de lissage lorentzien incluant de la dispersion

<sup>b</sup>Mode de lissage lorentzien incluant des fonctions gaussiennes et de la dispersion

$\Delta\text{CH}_2$  : écart entre la valeur théorique de la déviation isotopique du site  $\text{CH}_2$  de l'éthanol provenant du fructose de référence (moyenne des sites carbonés C-2 et C-5 du MADAFP) et la valeur expérimentale mesurée sur l'éthanol obtenu par fermentation glycolytique du fructose de référence

$\Delta\text{CH}_3$  : écart entre la valeur théorique de la déviation isotopique du site  $\text{CH}_3$  de l'éthanol provenant du fructose de référence (moyenne des sites carbonés C-1 et C-6 du MADAFP) et la valeur expérimentale mesurée sur l'éthanol obtenu par fermentation glycolytique du fructose de référence.

Des écarts (jusqu'à 3,2‰ pour le site carboné C-5) sont observés entre les deux modes de lissage. Les écarts types obtenus en utilisant de la gaussienne sont moins bons (1,1‰ contre 1‰ au maximum pour le mode de lissage classique). Cependant, le mode de lissage utilisant des fonctions gaussiennes donne des valeurs plus proches de celles obtenues expérimentalement sur l'éthanol (écart maximal de 1,2‰ sur le site  $\text{CH}_3$ ).

Le mode de lissage utilisant des fonctions gaussiennes a été effectué sur les mesures données par le spectromètre 500. Des écarts de  $\delta_i^{13}\text{C}$  du même ordre de grandeur que ceux observés sur le 400A sont obtenus entre les deux modes de lissage. Cependant, pour les spectres obtenus sur le spectromètre 500, aucun des deux modes de lissage (avec ou sans fonctions gaussiennes) ne permet une adéquation des valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  théoriquement attendues sur les éthanol avec celles effectivement mesurées ( $\Delta\text{CH}_2 = -5,1‰$  et  $\Delta\text{CH}_3 = -2,1‰$  au minimum pour le lissage utilisant des fonctions gaussiennes).

Dans un premier temps, et pour la suite des résultats présentés, nous considérerons donc ce dernier mode de lissage (utilisant des fonctions gaussiennes) associé à la mesure effectuée

sur le spectromètre 400A comme viable en terme de précision et de justesse. Une étude plus approfondie est toutefois requise afin de déterminer les facteurs qui induisent une erreur ou une imprécision sur la mesure. De plus, le spectromètre DRX500 n'étant plus disponible pour la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique (changement de configuration), il est préférable de se focaliser sur les appareils récents et disponibles.

### 3 Conclusion

Les résultats obtenus sur les dérivés du fructose (MADAFP) et du glucose (TAMAGF) montrent que :

- l'impact du changement de spectromètre sur les mesures des  $\delta_i^{13}\text{C}$  peut être différent pour chaque molécule ;
- le mode de lissage permet, *a priori*, de s'affranchir de certains défauts pour un spectromètre donné (meilleure cohérence fructose-éthanol sur le 400A avec un mode de lissage utilisant des fonctions gaussiennes).

Cependant, la différence entre la mesure des  $\delta_i^{13}\text{C}$  du MADAFP sur les spectromètres 400A et 500 n'est pas entièrement comprise à l'heure actuelle.

Des études sont actuellement en cours au laboratoire pour évaluer l'impact du mode de lissage des signaux RMN  $^{13}\text{C}$  sur d'autres molécules comme l'éthanol ou le TAMAGF. Cet impact n'est pas évalué dans les travaux présentés dans cette thèse mais devra être pris en compte par la suite, notamment pour la publication éventuelle des travaux sur les éthanol et sur le glucose.

# Chapitre 6 -Impacts de facteurs environnementaux et métaboliques sur la distribution intramoléculaire en $^{13}\text{C}$ du glucose : utilisation de l'éthanol comme molécule sonde

## 1 Introduction

Les travaux exposés dans ce chapitre ont été réalisés en partenariat avec le Bureau Européen des vins, spiritueux et alcools (BEVABS, EC-JRC, Ispra, Italie). Ils ont été entrepris au laboratoire, avant le début de mes travaux de thèse, dans le but d'évaluer l'apport de la RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique pour étudier la distribution intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  dans les sucres, en utilisant l'éthanol comme molécule sonde. D'un point de vue chronologique, c'est ce projet qui a suscité l'intérêt pour la détermination de la teneur isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des molécules de glucose, fructose et saccharose.

La molécule d'éthanol provient de la fermentation des sucres par glycolyse (lorsque des levures sont utilisées) et permet l'obtention d'indications concernant la distribution isotopique en  $^{13}\text{C}$  du sucre précurseur (fructose, glucose, saccharose) [49, 54]. La durée des analyses RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur la molécule d'éthanol (2 heures par mesure pour 5 spectres) et sa préparation simple (fermentation + distillation) en font une molécule avantageuse pour la détermination des  $\delta_i^{13}\text{C}$  par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur un grand nombre d'échantillons. De plus, la molécule d'éthanol est présente dans de nombreux produits finis (bières, vins, spiritueux, ...), ce qui lui confère un potentiel intéressant pour une étude concernant l'authentification de ces produits. L'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique de la molécule d'éthanol a donc été incluse dans mes travaux de thèse.

Le but de ce chapitre est d'utiliser la molécule d'éthanol en tant que molécule sonde pour mettre en évidence des variations isotopiques intramoléculaires en  $^{13}\text{C}$  au sein des molécules de glucose, fructose et saccharose. La question primordiale étant : quels sont les facteurs pouvant influencer la distribution isotopique intramoléculaire en carbone 13 des

sucres issus d'une plante? Pour tenter de répondre à cette large question, deux de ces facteurs seront étudiés en utilisant l'éthanol comme molécule sonde :

- Le métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub> de la plante (C3, C4 ou CAM) ;
- Les paramètres climatiques (température, ensoleillement, humidité) associés à l'environnement de la plante.

Dans ce but, des échantillons d'éthanol de diverses origines botaniques (C3, C4, CAM) et de diverses origines géographiques ont été analysés. Dans ce dernier cas, et afin de s'affranchir des différences de fractionnement isotopique inter espèces, nous avons choisi de travailler sur la même plante : la vigne (*Vitis vinifera*), celle-ci étant cultivée pour l'obtention du vin dans de nombreuses de régions d'Europe. La collecte de ces échantillons doit permettre d'évaluer l'impact, sur la même espèce, de facteurs environnementaux sur la distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C de l'éthanol et, implicitement, sur celle des sucres.

La molécule d'éthanol est produite, à partir des sucres (glucose, fructose, saccharose), par des levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces bayanus* principalement) *via* la glycolyse. Cette voie métabolique permet, à partir d'une molécule de glucose et/ou de fructose, de former deux molécules d'éthanol et deux molécules de CO<sub>2</sub>. Lors de ce processus, le saccharose est hydrolysé par les levures pour former une molécule de fructose et une molécule de glucose.

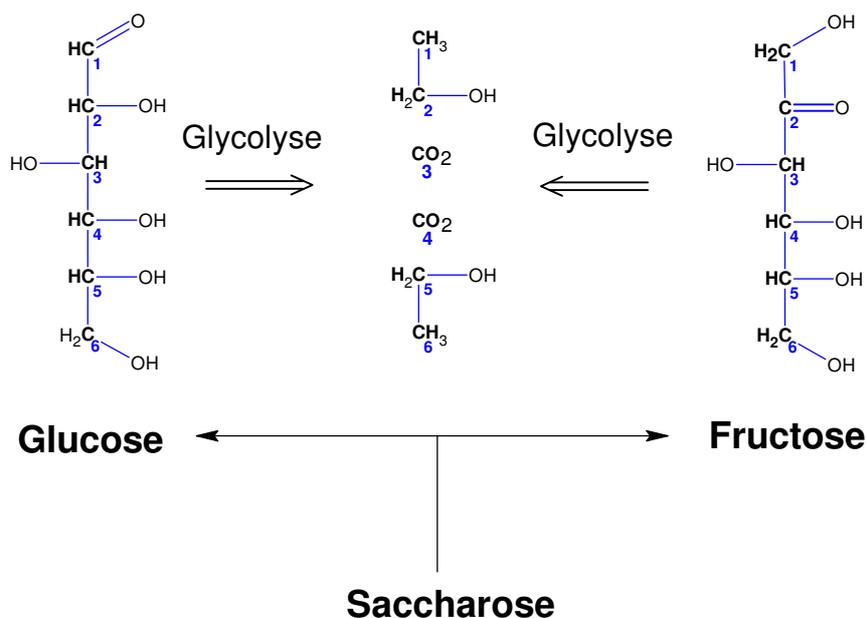
Pour pouvoir relier les données observées sur les éthanol aux données réelles sur les sucres, il est nécessaire (i) d'évaluer la répétabilité et la robustesse de la fermentation alcoolique en terme de fractionnement isotopique et (ii) d'évaluer la filiation isotopique entre éthanol et sucres en utilisant la méthodologie décrite dans le chapitre 4 (transformation des sucres en TAMAGF et MADAFP puis analyse de ces molécules par RMN <sup>13</sup>C isotopique). Une fois ces considérations prises en compte, des échantillons d'éthanol de différentes origines géographiques et botaniques seront analysés.

## **2 Résultats et discussion**

### **2.1 L'éthanol comme molécule sonde**

Comme mentionné dans le chapitre 5, la molécule d'éthanol est produite à partir d'une molécule de glucose, de fructose et/ou de saccharose.

La déviation isotopique en  $^{13}\text{C}$  du site méthyle de l'éthanol,  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$ , est la moyenne de celles des sites C-1 et C-6 du glucose de départ et celle du site méthylène,  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$ , la moyenne des sites C-2 et C-5 du glucose de départ [54]. Cette répartition a été exploitée par Rossmann *et al.* (1991) [49] pour la détermination de la distribution intramoléculaire en carbone 13 du glucose (cf. chapitre 1 – paragraphe 3.2.1). Lors de la fermentation du fructose par voie glycolytique, le même raisonnement peut être appliqué (Figure 53).



**Figure 53. Schéma simplifié du processus de fermentation glycolytique des sucres (glucose, fructose et/ou saccharose) en éthanol.**

Cette approche n'est valable que dans le cas où un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  lors de l'obtention de l'éthanol par la voie glycolytique est négligeable. Il est donc nécessaire d'évaluer la valeur de ce fractionnement isotopique. De plus, dans le cadre de notre étude, une grande quantité d'échantillons doit être analysée. Pour pouvoir tirer des conclusions pertinentes, l'écart type sur la répétabilité lors du processus de fermentation doit être déterminé.

## 2.1.1 Répétabilité et robustesse associées au processus de fermentation glycolytique

### 2.1.1.1 Répétabilité instrumentale

La répétabilité sur la mesure des déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  sur la molécule d'éthanol a été évaluée sur le spectromètre DRX 500. L'écart type sur 40 mesures d'un éthanol pur est

de 0,2 ‰ quelque soit le site considéré (méthyle et méthylène) pour un rapport S/B de 2000 environ. Le choix du solvant de lock (DMSO-d6) et de l'utilisation d'un agent relaxant (Cr(Acac)<sub>3</sub>) ont été faits en fonction de la durée d'analyse et de la largeur des raies à mi-hauteur (résolution des pics avec les satellites).

L'impact de la présence d'eau dans l'échantillon (jusqu'à 70 %) sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  de l'éthanol a été évaluée. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 23. Les résultats  $\delta_i^{13}\text{C}$  obtenus par RMN <sup>13</sup>C sur un échantillon d'éthanol ne dépendent pas de la teneur en eau de cet échantillon. Cependant, le nombre de scans NS doit être ajusté pour avoir un rapport S/B satisfaisant ; la durée d'analyse augmente donc avec la teneur en eau de l'éthanol.

**Tableau 23. Déviations isotopique  $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) pour chaque site carboné de la molécule d'éthanol.**

Dilution de l'éthanol de référence	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) CH <sub>2</sub>	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) CH <sub>3</sub>
Pur (99,9 %)	-32,8	-26,2
+ ~10 % d'eau	-32,9	-26,1
+ ~40 % d'eau	-32,5	-26,6
+ ~60 % d'eau	-32,6	-26,4
+ ~70 % d'eau	-32,6	-26,5

L'analyse RMN <sup>13</sup>C est réalisée avec différentes proportions en eau dans le même échantillon d'éthanol (éthanol de référence). Le nombre de scans NS est ajusté de manière à obtenir un rapport S/B supérieur à 2000 dans tous les cas.

### 2.1.1.2 Répétabilité de la chaîne analytique

La répétabilité sur la fermentation des sucres en molécules d'éthanol a été évaluée en réalisant la fermentation glycolytique 5 fois en partant du même glucose et 3 fois en partant du même fructose ou du même saccharose (appelés sucres de référence par la suite).

Les rendements en éthanol après distillation sur colonne à bande tournante Cadiot sont compris entre 88 % et 93 % quelque soit le sucre de départ. La moyenne sur les valeurs  $\delta_i^{13}\text{C}$  pour chaque site carboné de l'éthanol obtenues par RMN <sup>13</sup>C et les écarts types sur les *n* fermentations sont regroupés dans le Tableau 24.

**Tableau 24. Déviations isotopiques  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) sur chaque site carboné de la molécule d'éthanol obtenue par fermentation des sucres de référence (glucose, fructose, saccharose).**

	$\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$	$\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$
Glucose (n=5) <sup>a</sup>	-12,4	-10,2
<i>Ecart type (‰)<sup>p</sup></i>	0,3	0,3
Fructose (n=3) <sup>a</sup>	-25,4	-28,6
<i>Ecart type (‰)<sup>p</sup></i>	0,2	0,2
Saccharose (n=3) <sup>a</sup>	-23,5	-26,5
<i>Ecart type (‰)<sup>p</sup></i>	0,2	0,2

<sup>a</sup>Les moyennes et écarts types de répétabilité sont calculés à partir des valeurs obtenues sur 5 répétitions pour le glucose et 3 répétitions pour le fructose et le saccharose.

La répétabilité de la fermentation est satisfaisante pour notre étude (0,3‰ au maximum pour l'éthanol provenant de la fermentation du glucose). Cet écart type suggère que, si elle est effectuée dans les mêmes conditions de transformation totale, la fermentation n'apporte pas d'imprécision supplémentaire sur la détermination des déviations isotopiques intramoléculaires en  $^{13}\text{C}$  sur l'éthanol.

### 2.1.1.3 Robustesse

Une démarche similaire à celle effectuée pour la dérivation du glucose en TAMAGF (cf. chapitre 4 – paragraphe 3) a été menée afin d'évaluer le fractionnement isotopique lors du processus de fermentation. Pour cela, les sucres de référence ont été fermentés avec un taux de conversion inférieur à celui obtenu dans des conditions normales (> 90%). Les expériences ont été réalisées une fois avec un rendement de 50% et une fois avec un rendement de 35% pour chaque sucre étudié (glucose et fructose). Les résultats des fermentations menées avec des taux de conversion faibles sont regroupés dans le Tableau 25. Le taux de conversion est estimé grâce à la perte de masse lors de la fermentation.

Les écarts à la moyenne des déviations isotopiques lors de fermentations non complètes (35 à 50 % de conversion) sont de 0,4‰ et de 0,2‰ au maximum avec le glucose et le fructose comme produit de départ, respectivement. Ces résultats suggèrent que, s'il existe, le fractionnement est très faible lors du processus de fermentation.

**Tableau 25. Déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  (‰) sur chaque site carboné de la molécule d'éthanol obtenue par fermentation des sucres de référence (glucose, fructose, saccharose) à rendements optimaux (max.) et à rendements faibles (35% et 50%).**

	$\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$	$\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$
Glucose max.	<b>-12,4</b>	<b>-10,2</b>
Glucose 50 % <sup>a</sup>	-12,0	-10,6
Glucose 35 % <sup>a</sup>	-12,2	-10,4
Fructose max.	<b>-25,4</b>	<b>-28,6</b>
Fructose 50 % <sup>a</sup>	-25,2	-28,8
Fructose 35 % <sup>a</sup>	-25,2	-28,8

<sup>a</sup>Les rendements sont estimés à partir de la perte de masse lors de la fermentation.

### 2.1.2 Correspondance glucose/fructose/saccharose – éthanol

En estimant un fractionnement isotopique négligeable au cours du processus de fermentation (cf. paragraphe précédent), les valeurs théoriques des déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  sur chaque site de la molécule d'éthanol peuvent être obtenues en calculant la moyenne des  $\delta_i^{13}\text{C}$  des sites carbonés C-1 et C-6 (pour le groupe méthyle) et celle des sites carbonés C-2 et C-5 (pour le groupe méthylène) du ou des sucre(s) de départ. Les déviations isotopiques en  $^{13}\text{C}$  sur différents sucres (glucose, fructose, saccharose) ont été obtenues en utilisant la méthodologie décrite dans le chapitre 4. Les déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$  et  $\delta_i^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$  calculées à partir de ces sucres et celles obtenues par mesure RMN  $^{13}\text{C}$  des éthanol correspondants sont regroupés dans le Tableau 26.

L'écart entre les valeurs mesurées sur les éthanol et les valeurs calculées à partir des sucres selon la méthodologie décrite dans le chapitre 4 est de 1,6 ‰ au maximum pour le glucose de blé « Glucose blé 2 ». Etant donné les écarts types sur la mesure des éthanol (0,2 ‰) et ceux sur la dérivation du glucose (0,8 ‰), les différences entre glucoses et éthanol ne sont pas statistiquement significatives.

**Tableau 26. Déviations isotopiques  $\delta_1^{13}\text{C}$  (‰) sur chaque site carboné de la molécule d'éthanol obtenue par fermentation de sucres dont les  $\delta_1^{13}\text{C}$  (‰) ont été déterminés par la méthode décrite au chapitre 4.**

	Valeur calculée		Valeur expérimentale		Différence valeur calculée – valeur expérimentale	
	CH <sub>3</sub> <sup>a</sup>	CH <sub>2</sub> <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
Glucose blé 1	-26,6	-24,2	-26,0	-23,7	-0,6	-0,5
Glucose blé 2	-27,7	-23,9	-26,1	-24,1	-1,6	0,2
Glucose pomme de terre	-24,9	-22,2	-23,5	-21,9	-1,4	-0,3
Glucose maïs	-9,3	-10,5	-9,0	-9,6	-0,3	-0,9
Fructose commercial	-25,9	-29,3	-25,9	-28,1	0,0	-1,2
Saccharose betterave	-27,8	-24,9	-27,5	-25,2	-0,3	0,3
Saccharose canne	-12,5	-11,4	-11,7	-12,2	0,8	-0,8

<sup>a</sup>Moyenne des  $\delta^{13}\text{C}$  des sites C-1 et C-6 du sucre de départ

<sup>b</sup>Moyenne des  $\delta^{13}\text{C}$  des sites C-2 et C-5 du sucre de départ

Cet écart peut cependant être interprété par une proportion de sucre métabolisé par la voie des pentoses phosphates[91]. Lors de ce processus, le carbone 1 du glucose est oxydé ; un effet isotopique normal (enrichissement sur le C-1 du glucose restant) a été mesuré (cf. chapitre 1 – paragraphe 3.3.4). Jusqu'ici, nous avons supposé une fermentation totalement glycolytique. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces bayanus* sont théoriquement capables d'effectuer la fermentation du glucose *via* la voie des pentoses phosphates. Même si la proportion de cette voie reste faible par rapport à la glycolyse, elle permettrait d'expliquer la valeur plus riche sur le CH<sub>3</sub> mesuré de l'éthanol par rapport à la valeur calculée sur le glucose de départ. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour le confirmer.

Les différentes expériences présentées dans les paragraphes précédents permettent de mettre en évidence le fait que :

- le processus de fermentation des sucres (glucose, fructose, saccharose) en éthanol est répétable à 0,3 ‰ ;

- le fractionnement isotopique lors d'une transformation dans les conditions optimales est négligeable ;
- les valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  théoriquement attendues sur les éthanols (calculées à partir des  $\delta_i^{13}\text{C}$  des sucres obtenues par la méthodologie décrite dans le chapitre 4) sont cohérentes avec celles effectivement mesurées.

## 2.2 Variations intramoléculaires en $^{13}\text{C}$ de l'éthanol selon l'origine botanique

Des échantillons d'éthanol de différentes origines botaniques ont été analysés. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 27. Les déviations isotopiques  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$  et  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$  sur chaque site carboné de l'éthanol sont déterminés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Pour permettre une meilleure lisibilité des résultats, un nouveau paramètre  $\Lambda$  est introduit.  $\Lambda$  représente la différence entre la déviation isotopique du site méthylène et celle du site méthyle :

$$\Lambda = \delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2) - \delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3) \quad (33)$$

Lorsque  $\Lambda$  est positif, le site méthylène ( $\text{CH}_2$ ) est plus riche en carbone 13 que le site méthyle ( $\text{CH}_3$ ), et *vice versa*.

Les résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  d'éthanols de différentes origines botaniques (Tableau 27) montrent clairement que le mécanisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  joue un rôle dans la distribution isotopique en carbone 13 sur la molécule d'éthanol. Chez les plantes en C3, le site méthylène est plus enrichi que le site méthyle ( $\Lambda = 0,4 \text{ ‰}$  à  $4,8 \text{ ‰}$ ) alors que chez les plantes en C4, une tendance inverse est observée ( $\Lambda = -0,5 \text{ ‰}$  à  $-3,9 \text{ ‰}$ ). Chez les plantes CAM, la tendance est la même que pour les plantes C3 mais avec une différence beaucoup plus marquée ( $\Lambda = 8,8 \text{ ‰}$  à  $13,5 \text{ ‰}$ ).

**Tableau 27. Déviations isotopiques globales  $\delta_g^{13}\text{C}$  (‰) et sur chaque site carboné  $\delta_i^{13}\text{C}$  (‰) de molécules d'éthanol de différentes origines botaniques.**

	Origine botanique	$\delta_g^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta\text{CH}_2$ (‰)	$\delta\text{CH}_3$ (‰)	$\Lambda$ (‰) <sup>a</sup>
<b>C3</b>	<b>Blé</b>	-24,9	-23,7	-26,0	<b>2,3</b>
	<b>Pomme de terre</b>	-25,1	-24,1	-26,1	<b>2,0</b>
	<b>Betterave 1</b>	-26,1	-25,0	-27,1	<b>2,1</b>
	<b>Betterave 2</b>	-26,4	-25,2	-27,5	<b>2,3</b>
	<b>Betterave 3</b>	-27,4	-26,5	-28,2	<b>1,7</b>
	<b>Jus de pomme</b>	-28,0	-27,8	-28,2	<b>0,4</b>
	<b>Jus d'orange</b>	-26,7	-24,5	-28,9	<b>4,4</b>
	<b>Raisin</b>	-24,8	-22,4	-27,2	<b>4,8</b>
	<b>Bière 1</b>	-26,1	-24,8	-27,4	<b>2,6</b>
	<b>Bière 2</b>	-26,8	-25,6	-27,9	<b>2,3</b>
	<b>Saké 1</b>	-26,8	-26,0	-27,5	<b>1,5</b>
	<b>Saké 2</b>	-27,3	-26,5	-28,0	<b>1,5</b>
	<b>Miel de Bruyère</b>	-26,7	-25,2	-28,1	<b>2,9</b>
	<b>Miel de tournesol</b>	-25,8	-24,0	-27,6	<b>3,6</b>
<b>C4</b>	<b>Maïs 1</b>	-11,0	-12,2	-9,8	<b>-2,4</b>
	<b>Maïs 2 (Bourbon)</b>	-10,6	-12,5	-8,6	<b>-3,9</b>
	<b>Maïs 3 (Bourbon)</b>	-10,8	-12,2	-9,4	<b>-2,8</b>
	<b>Canne</b>	-12,0	-12,2	-11,7	<b>-0,5</b>
	<b>Rhum 1</b>	-12,6	-13,6	-11,5	<b>-2,1</b>
	<b>Rhum 2</b>	-12,9	-14,0	-11,8	<b>-2,2</b>
	<b>Sucre de palme</b>	-13,0	-13,3	-12,6	<b>-0,7</b>
<b>CAM</b>	<b>Tequila 1</b>	-12,5	-8,1	-16,9	<b>8,8</b>
	<b>Tequila 2</b>	-12,4	-6,3	-18,5	<b>12,2</b>
	<b>Ananas</b>	-14,7	-7,9	-21,4	<b>13,5</b>

<sup>a</sup>Le paramètre  $\Lambda$  est la différence de déviation isotopique entre le site méthylène  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\text{CH}_2$ ) et le site méthyle  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\text{CH}_3$ ) de l'éthanol.

Les raisons permettant d'expliquer la différence de distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  sur les éthanols provenant de plantes à métabolisme C3 et C4 ne sont pas encore clairement identifiées. Quelque soit le métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  considéré, C3, C4 ou CAM, le cycle de Calvin permet la formation du saccharose à partir du  $\text{CO}_2$ . Le cycle de Calvin ne peut donc pas être responsable des différences observées. En revanche, la photorespiration (importante chez les plantes en C3 et faible chez les plantes en C4) pourrait être l'une des causes permettant d'expliquer ces différences. La valeur élevée du paramètre  $\Lambda$  pour les éthanols provenant de plantes à métabolisme CAM ne peut pas être expliquée uniquement par la photorespiration. Il est probable que le cycle C4 (fixation du  $\text{CO}_2$  atmosphérique pour former le malate) soit en partie responsable de la valeur élevée de  $\Lambda$  mesurée sur les éthanols provenant de plantes utilisant le métabolisme CAM.

Des études plus approfondies sont nécessaires pour tenter de conforter ces hypothèses. La dérivation et l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  de sucres provenant de plantes à métabolismes C3, C4 ou CAM permettrait une meilleure compréhension du fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à la formation et/ou à l'utilisation de ces sucres dans la plante. Ces analyses font l'objet du chapitre 7.

## **2.3 Variations intramoléculaires en $^{13}\text{C}$ de l'éthanol selon le millésime et l'origine géographique**

### **2.3.1 Etude préliminaire qualitative**

Pour évaluer l'impact des conditions climatiques sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des sucres issus de la vigne, des éthanols de vins récoltés en 2003 et 2005 et provenant du Royaume-Uni (RU), du Luxembourg, de Grèce et d'Autriche ont été analysés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Les moyennes des paramètres isotopiques mesurés ( $\delta\text{CH}_2$ ,  $\delta\text{CH}_3$ ,  $\Lambda$  et  $\delta_g$ ) ainsi que les paramètres climatiques pour le mois de juillet ont été reportés dans le Tableau 28. Les paramètres climatiques pris en compte sont la moyenne de la température maximale, la somme des précipitations, et la moyenne de l'ensoleillement au mois de juillet des années 2003 et 2005, mois habituellement retenu dans les milieux viticoles pour juger la maturité des raisins [92].

Les éthanols de vins récoltés en Grèce ont une déviation isotopique globale  $\delta_g^{13}\text{C}$  plus élevée que ceux obtenus dans les pays moins chauds : Royaume-Uni, Luxembourg et Autriche (Tableau 28). Cette observation est en accord avec les prédictions de l'équation mise au point par Farquhar *et al.*(1982) [2]: lors d'un stress hydrique, la teneur isotopique globale en  $^{13}\text{C}$  des glucides est plus élevée qu'en l'absence de stress hydrique (chapitre 1 – paragraphe 3.1.1).

Le paramètre  $\Lambda$  est plus important pour la Grèce (pays chaud), que pour les pays moins chauds (Royaume-Uni, Autriche, Luxembourg). La température du pays de culture apparaît donc avoir un effet sur la distribution *intramoléculaire* en  $^{13}\text{C}$  sur la molécule d'éthanol. De plus, les valeurs de déviation isotopique du site méthylène ( $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$ ) semblent plus étendues (écart maximal de 4,6‰, tous pays et années confondus ; Tableau 28) que celles du site méthyle (écart maximal de 2,3 ‰, tous pays et années confondus ; Tableau 28).

Un écart important du paramètre  $\Lambda$  entre les années 2003 et 2005 est observé pour l'Autriche et pour le Luxembourg. Concernant ce dernier, cet écart peut être expliqué par la hausse des températures et de l'ensoleillement et la baisse des précipitations. En revanche, les paramètres climatiques pour l'Autriche entre les années 2003 et 2005 varient peu. L'écart de  $\Lambda$  entre 2003 et 2005 ne peut donc pas entièrement être expliqué par un changement des conditions climatiques relevées.

La vague de chaleur de 2003 ne semble pas avoir affecté le Royaume-Uni ni la Grèce en terme de paramètres climatiques. Pour ces deux pays, le climat reste sensiblement le même chaque année et cet aspect se reflète dans les données isotopiques (même  $\Lambda$  pour les années 2003 et 2005).

**Tableau 28. Paramètres climatiques, déviations isotopiques globales  $\delta_g^{13}\text{C}$  (‰) et sur chaque site carboné  $\delta_i^{13}\text{C}$  (‰) d'éthanol de vin de différentes origines géographiques et de différents millésimes.**

	n <sup>a</sup>	$\delta\text{CH}_2$ (‰)	$\delta\text{CH}_3$ (‰)	$\Lambda$ (‰) <sup>b</sup>	$\delta_g$ (‰)	T <sub>Max</sub> (°C) <sup>c</sup>	Précipitations (mm) <sup>d</sup>	Ensoleillement (kJ/m <sup>2</sup> ) <sup>e</sup>
<b>RU 2003</b>	4	<b>-26,6</b>	<b>-28,8</b>	<b>2,2</b>	<b>-27,7</b>	<b>20,9</b>	<b>87,5</b>	<b>531214</b>
		<i>0,4</i>	<i>0,2</i>	<i>0,3</i>	<i>0,3</i>	<i>0,7</i>	<i>25,4</i>	<i>19782</i>
<b>RU 2005</b>	1	<b>-25,9</b>	<b>-28,7</b>	<b>2,8</b>	<b>-27,3</b>	<b>20,7</b>	<b>69,3</b>	<b>571242</b>
<b>Grèce 2003</b>	2	<b>-23,8</b>	<b>-28,2</b>	<b>4,4</b>	<b>-26,0</b>	<b>31,5</b>	<b>0,7</b>	<b>750401</b>
		<i>0,8</i>	<i>0,6</i>	<i>0,3</i>	<i>0,7</i>	<i>0,7</i>	<i>0,9</i>	<i>40069</i>
<b>Grèce 2005</b>	3	<b>-23,4</b>	<b>-28,2</b>	<b>4,9</b>	<b>-25,8</b>	<b>31,2</b>	<b>7,6</b>	<b>717999</b>
		<i>1,2</i>	<i>0,3</i>	<i>1,3</i>	<i>0,6</i>	<i>0,8</i>	<i>6,6</i>	<i>54814</i>
<b>Luxembourg 2003</b>	2	<b>-25,4</b>	<b>-28,9</b>	<b>3,5</b>	<b>-27,1</b>	<b>25,4</b>	<b>45,3</b>	<b>605553</b>
		<i>0,1</i>	<i>0,2</i>	<i>0,3</i>	<i>0,0</i>	-	-	-
<b>Luxembourg 2005</b>	2	<b>-28,0</b>	<b>-30,6</b>	<b>2,6</b>	<b>-29,3</b>	<b>23,5</b>	<b>123,2</b>	<b>539932</b>
		<i>0,3</i>	<i>0,1</i>	<i>0,4</i>	<i>0,1</i>	-	-	-
<b>Autriche 2003</b>	4	<b>-23,9</b>	<b>-28,5</b>	<b>4,6</b>	<b>-26,2</b>	<b>27,7</b>	<b>65,0</b>	<b>648366</b>
		<i>0,7</i>	<i>0,3</i>	<i>0,6</i>	<i>0,5</i>	-	-	-
<b>Autriche 2005</b>	4	<b>-27,5</b>	<b>-29,9</b>	<b>2,4</b>	<b>-28,7</b>	<b>26,8</b>	<b>70,2</b>	<b>598506</b>
		<i>0,5</i>	<i>1,0</i>	<i>1,5</i>	<i>0,3</i>	-	-	-

Les valeurs en italique sont les écarts types sur n échantillons pour les différents paramètres mesurés.

<sup>a</sup>Nombre d'échantillons analysés par pays et par année. <sup>b</sup>Le paramètre  $\Lambda$  est la différence de déviation isotopique entre le site méthylène  $\delta^{13}\text{C}$  (CH<sub>2</sub>) et le site méthyle  $\delta^{13}\text{C}$  (CH<sub>3</sub>) de l'éthanol. <sup>c</sup>Moyenne des températures maximales (en °C) relevées au mois de juillet. <sup>d</sup>Somme des précipitations (en mm) relevées au mois de juillet. <sup>e</sup>Somme de l'ensoleillement (en kJ/m<sup>2</sup>) relevées au mois de juillet.

### 2.3.2 Impact de la zone géographique

Pour conforter les observations faites dans le paragraphe précédent, des échantillons d'éthanol provenant de la fermentation de raisins récoltés la même année (1998) dans des zones géographiques différentes en Europe ont été analysés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Les moyennes des paramètres isotopiques mesurés ( $\delta\text{CH}_2$ ,  $\delta\text{CH}_3$ ,  $\Lambda$  et  $\delta_g$ ) ainsi que les paramètres climatiques pour le mois de Juillet ont été reportés dans le Tableau 29.

**Tableau 29. Paramètres climatiques et déviations isotopiques globales  $\delta_g^{13}\text{C}$  (‰) et sur chaque site carboné  $\delta_i^{13}\text{C}$  (‰) de molécules d'éthanol de vin de différentes origines géographiques récoltés dans l'année 1998.**

	n <sup>a</sup>	$\delta\text{CH}_2$ (‰)	$\delta\text{CH}_3$ (‰)	$\Lambda$ (‰) <sup>b</sup>	$\delta_g$ (‰)	T <sub>Max</sub> (°C) <sup>c</sup>	Précipitations (mm) <sup>d</sup>	Ensoleillement (kJ/m <sup>2</sup> ) <sup>e</sup>
Italie	14	<b>-24,6</b>	<b>-29,0</b>	<b>4,3</b>	<b>-26,8</b>	<b>29,8</b>	<b>29,9</b>	<b>785371</b>
		<i>2,0</i>	<i>1,3</i>	<i>1,2</i>	<i>1,6</i>	<i>3,0</i>	<i>31,9</i>	<i>93073</i>
Allemagne	5	<b>-28,1</b>	<b>-30,4</b>	<b>2,3</b>	<b>-29,2</b>	<b>23,2</b>	<b>44,2</b>	<b>500442</b>
		<i>1,0</i>	<i>0,8</i>	<i>0,4</i>	<i>0,9</i>	<i>1,4</i>	<i>11,2</i>	<i>55829</i>
France	9	<b>-24,5</b>	<b>-28,4</b>	<b>3,9</b>	<b>-26,4</b>	<b>25,8</b>	<b>42,5</b>	<b>608674</b>
		<i>1,5</i>	<i>1,3</i>	<i>0,4</i>	<i>1,4</i>	<i>2,1</i>	<i>18,5</i>	<i>106872</i>
Grèce	2	<b>-23,2</b>	<b>-28,1</b>	<b>4,8</b>	<b>-25,6</b>	<b>31,3</b>	<b>0,0</b>	<b>688417</b>
		<i>1,1</i>	<i>0,2</i>	<i>0,9</i>	<i>0,6</i>	<i>2,3</i>	-	<i>51574</i>
Espagne	15	<b>-23,4</b>	<b>-28,0</b>	<b>4,6</b>	<b>-25,7</b>	<b>31,1</b>	<b>4,9</b>	<b>816841</b>
		<i>1,7</i>	<i>1,2</i>	<i>0,9</i>	<i>1,4</i>	<i>2,9</i>	<i>8,2</i>	<i>48998</i>
Portugal	7	<b>-26,1</b>	<b>-28,9</b>	<b>2,9</b>	<b>-27,5</b>	<b>29,9</b>	<b>7,3</b>	<b>804472</b>
		<i>0,8</i>	<i>1,3</i>	<i>1,0</i>	<i>1,0</i>	<i>0,9</i>	<i>0,8</i>	<i>15689</i>

Les valeurs en italique sont les écarts types sur n échantillons pour les différents paramètres mesurés.

<sup>a</sup>Nombre d'échantillons analysés par pays et par année. <sup>b</sup>Le paramètre  $\Lambda$  est la différence de déviation isotopique entre le site méthylène  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\text{CH}_2$ ) et le site méthyle  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\text{CH}_3$ ) de l'éthanol. <sup>c</sup>Moyenne des températures maximales (en °C) relevées au mois de juillet. <sup>d</sup>Somme des précipitations (en mm) relevées au mois de juillet. <sup>e</sup>Somme de l'ensoleillement (en kJ/m<sup>2</sup>) relevées au mois de juillet.

Les pays méditerranéens (Italie, Grèce, Espagne) montrent un  $\Lambda$  plus grand que les pays situés plus au nord (Allemagne et France), suggérant une distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  sur les sucres différente selon le climat. La valeur intermédiaire observée pour le Portugal ne suit pas cette tendance. Il est possible que d'autres facteurs tels que la salinité du sol ou l'altitude rende ce groupe atypique par rapport aux autres.

### 2.3.3 Relations entre paramètres isotopiques : $\delta^{13}\text{C}_g$ , $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$ , $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$ de l'éthanol et $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau du vin

Pour les corrélations effectuées par la suite, 14 groupes seront considérés, chaque groupe correspondant aux valeurs moyennes des paramètres (paramètres isotopiques et climatiques) pour une année et un pays donnés. Ces groupes sont ceux présentés dans le Tableau 28 et le Tableau 29 (exemples : Autriche 2003, Espagne 1998).

L'objectif étant d'évaluer des tendances générales, le regroupement des échantillons permet de s'affranchir des disparités existant entre les différents vignobles d'un même pays et d'un même millésime. Dans le cadre d'une étude qualitative, ces groupes seront utilisés pour estimer l'influence des paramètres considérés ( $\delta^{18}\text{O}$ , paramètres climatiques) sur la valeur du paramètre  $\Lambda$ .

#### 2.3.3.1 Relation entre $\delta_g^{13}\text{C}$ , $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$ , et $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$

La variation de  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$  en fonction de  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$  pour les groupes d'éthanol mesurés ( $n = 14$ ) est représentée sur la Figure 54. Une corrélation significative est observée entre les deux valeurs ( $R^2 = 0,85$ ). La pente de la droite de corrélation (1,92), suggère une variation deux fois plus importante pour le site méthylène que pour le site méthyle.

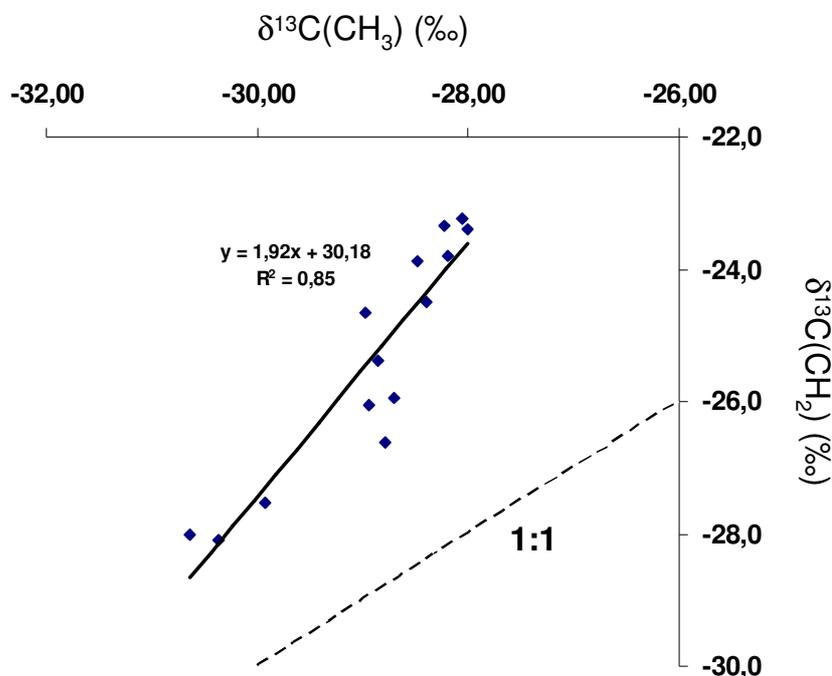


Figure 54. Corrélation entre la déviation isotopique du site méthylène  $\delta\text{CH}_2$  (‰) et celle du site méthyle  $\delta\text{CH}_3$  (‰) mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  des éthanol de vins d'Europe récoltés pendant les années 1998, 2003 et 2005.

La ligne en pointillés représente la relation de type 1:1.

Cette variation plus importante pour le site méthylène est corroborée par la représentation graphique des déviations isotopiques intramoléculaires  $\delta_i^{13}\text{C}$  des sites méthyle et méthylène de l'éthanol en fonction de la déviation isotopique globale  $\delta_g^{13}\text{C}$  obtenue par SMRI (Figure 55). La pente est deux fois plus grande pour la corrélation concernant le site méthylène (1,36) que pour celle concernant le site méthyle (0,64).

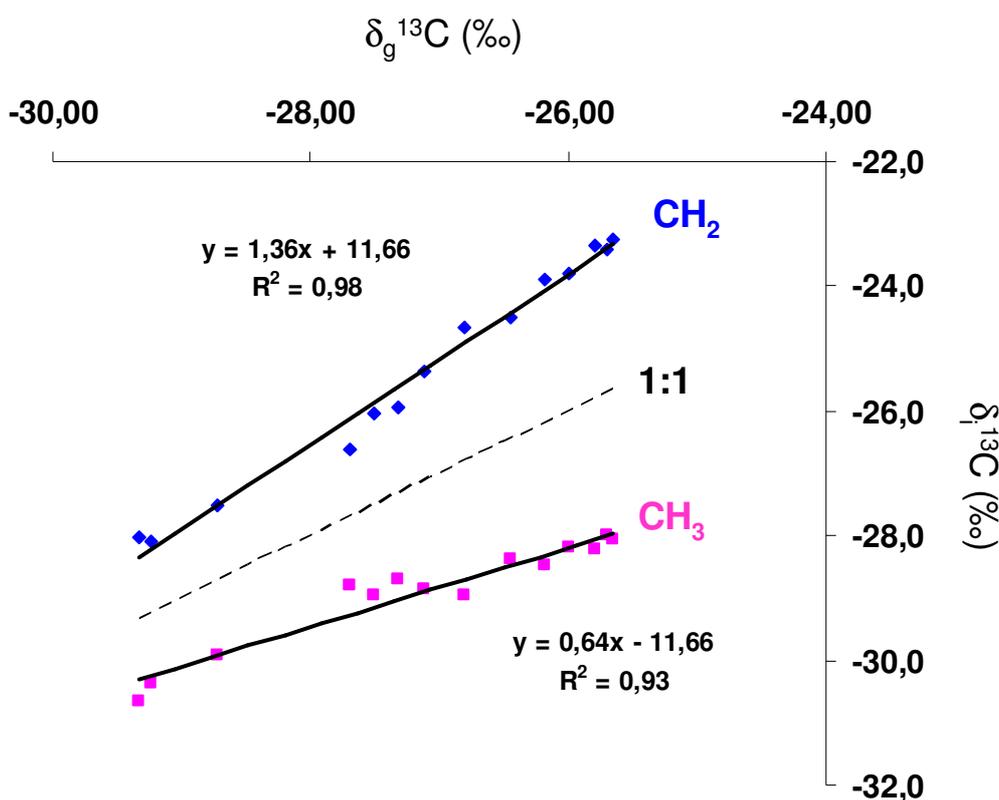


Figure 55. Corrélation entre la déviation isotopique du site méthylène  $\delta\text{CH}_2$  (‰), celle du site méthyle  $\delta\text{CH}_3$  (‰) mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  et la valeur globale  $\delta_g^{13}\text{C}$  (‰) mesurée par SMRI des éthanols de vin d'Europe récoltés pendant les années 1998, 2003 et 2005.

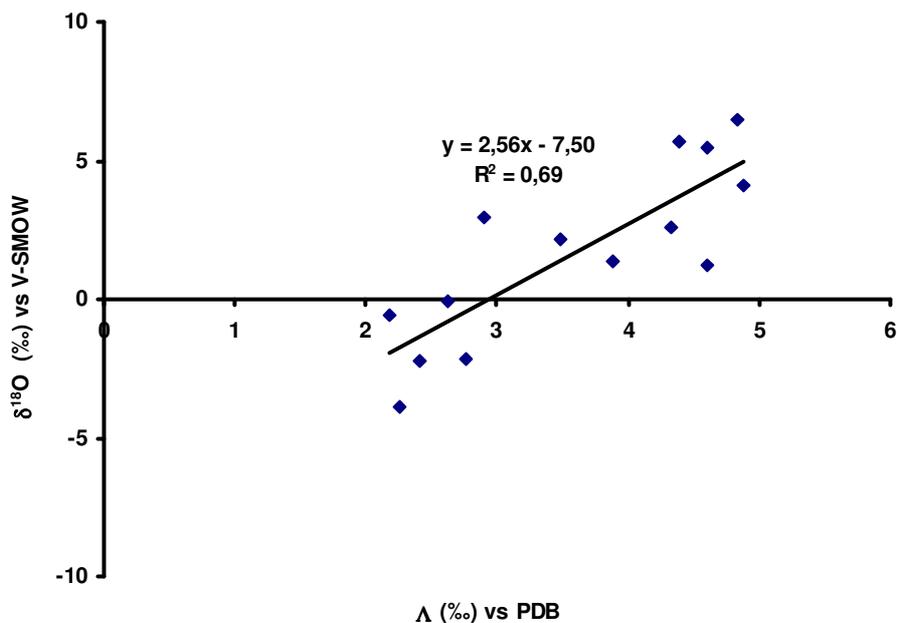
La ligne en pointillés représente la relation de type 1:1.

Ce graphique met en avant le fait que, lorsque la teneur isotopique globale  $\delta^{13}\text{C}_g$  des éthanols augmente, l'écart entre les déviations isotopiques des sites méthyle et méthylène augmente. La déviation isotopique globale des sucres formés augmentant avec le stress hydrique, la corrélation entre  $\Delta$  et  $\delta_g^{13}\text{C}$  suggère que l'écart entre les  $\delta_i^{13}\text{C}$  des sites méthyle et méthylène augmente avec le stress hydrique.

### 2.3.3.2 Relation entre $\Lambda$ et $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau du vin

Les isotopes de l'oxygène, et notamment le rapport  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  de l'eau du vin, est largement influencé par les paramètres climatiques de culture de la vigne. La teneur en  $^{18}\text{O}$  de l'eau de la vigne est influencée par (i) la teneur en  $^{18}\text{O}$  de l'eau de pluie (celle-ci est plus importante dans les pays chauds et secs que dans les pays froids et humides [93]), (ii) l'ouverture des stomates de la feuille (iii) l'humidité de l'air et (iv) la température foliaire [94]. Ces quatre phénomènes impliquent une teneur en  $^{18}\text{O}$  de l'eau assimilée par plantes qui augmente avec la température et l'aridité du pays de culture.

En prenant en compte les groupes utilisés dans le Tableau 28 et le Tableau 29, une forte tendance ( $R^2 = 0,69$  ;  $p < 0,01$ ) est observée entre la teneur en oxygène 18,  $\delta^{18}\text{O}$ , et le paramètre  $\Lambda$  (Figure 56). Le paramètre  $\Lambda$  apparaît varier de la même manière que la teneur en  $^{18}\text{O}$  de l'eau du vin.



**Figure 56. Corrélation entre le paramètre  $\delta^{18}\text{O}$  et  $\Lambda$  pour les échantillons d'éthanol de vin de différentes origines géographiques récoltés dans les années 1998, 2003 et 2005.**

Cette observation met en avant le fait que l'écart entre les déviations isotopiques entre les sites méthyle et méthylène des éthanols de vin,  $\Lambda$ , augmente avec la température et l'aridité du pays de culture.

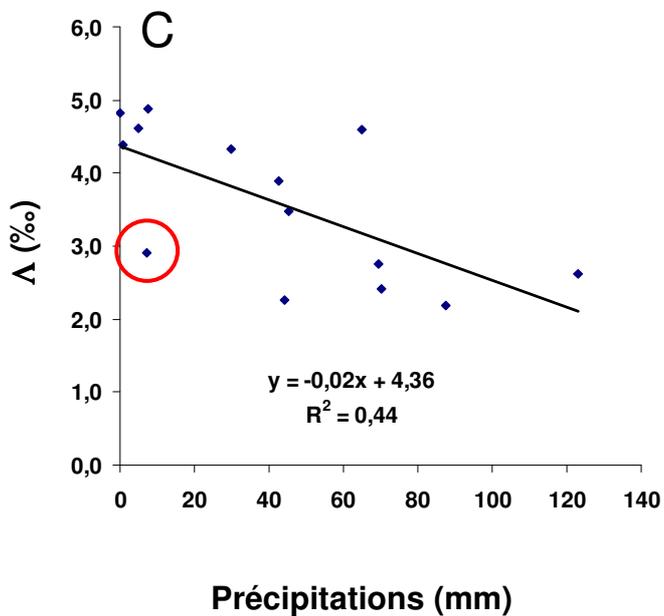
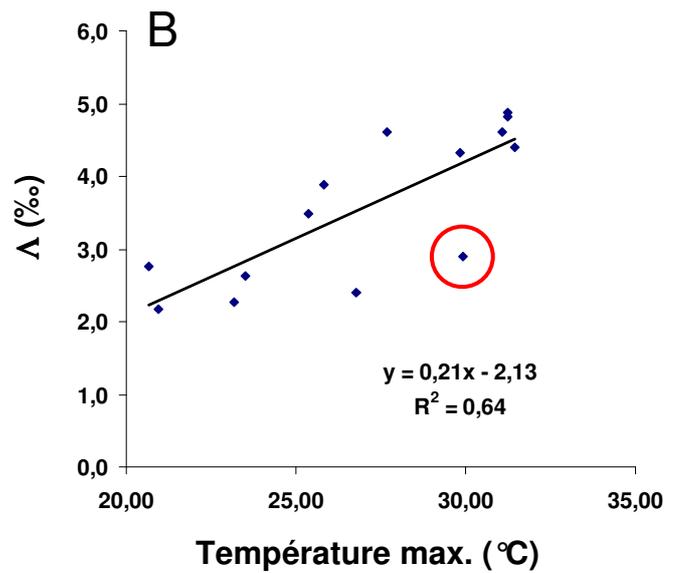
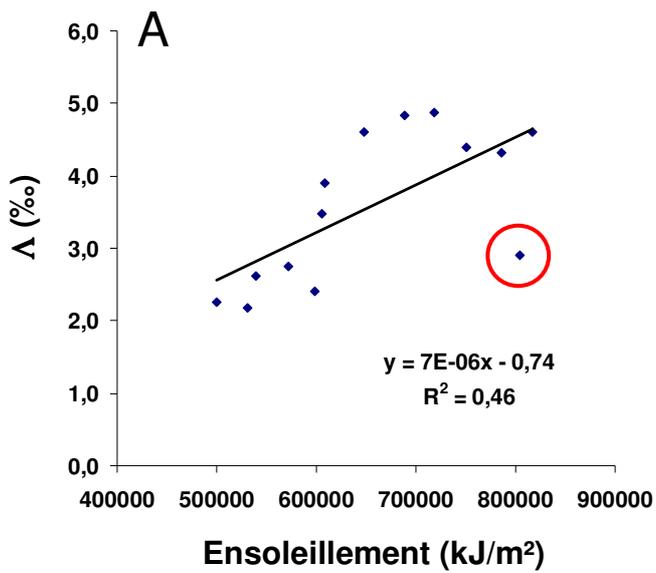
### 2.3.4 Relations entre paramètres isotopiques et paramètres climatiques

Les différents paramètres climatiques ont été reportés en fonction du paramètre  $\Lambda$ , pour les groupes définis dans les paragraphes précédents. Les valeurs de température et d'ensoleillement reportées sur la Figure 57 sont la moyenne des maxima relevés pour le mois de juillet de l'année de récolte. Les valeurs de précipitations reportées sur la Figure 57 sont la somme des précipitations relevées pour le mois de juillet de l'année de récolte.

Une tendance est observée entre le paramètre  $\Lambda$  et l'ensoleillement ( $R^2 = 0,46$  ;  $p < 0,01$ ) la température maximale ( $R^2 = 0,64$  ;  $p < 0,001$ ) et les précipitations ( $R^2 = 0,44$  ;  $p < 0,01$ ). Les données concernant le Portugal pour l'année 1998 apparaissent atypiques (Figure 57 ; cercles rouges), notamment concernant la corrélation de  $\Lambda$  avec le taux d'ensoleillement.

Lorsque le groupe « Portugal 1998 » n'est pas pris en compte, le coefficient de corrélation est amélioré pour les trois droites de corrélation ( $R^2 = 0,75$  pour la corrélation de  $\Lambda$  avec la température,  $R^2 = 0,71$  pour la corrélation de  $\Lambda$  avec l'ensoleillement et  $R^2 = 0,57$  pour la corrélation de  $\Lambda$  avec les précipitations). Un nombre plus important de données (collecte d'échantillons de plusieurs millésimes et de plusieurs régions du Portugal) permettraient de une meilleure compréhension du caractère atypique de ce groupe.

La tendance générale observée sur la Figure 57 est une augmentation de  $\Lambda$  lorsque la température et l'ensoleillement augmentent et lorsque les précipitations diminuent. Ces données suggèrent une augmentation de  $\Lambda$  lorsque la disponibilité en eau de la plante diminue.



**Figure 57. Corrélation entre le paramètre  $\Delta$  et les différents paramètres climatiques relevés au mois de juillet (température maximale (A), ensoleillement (B), précipitations (C)) pour les échantillons d'éthanol de vin de différentes origines géographiques récoltés dans les années 1998, 2003 et 2005.**

Les cercles rouges indiquent les points correspondant au groupe « Portugal 1998 ».

### 2.3.5 Discussion sur l'origine des variations observées

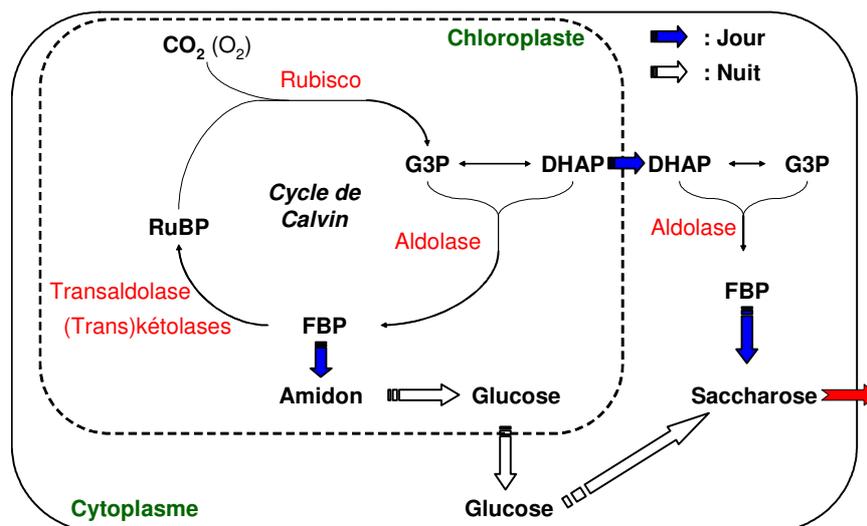
Les résultats présentés dans les paragraphes précédents permettent de montrer une tendance du paramètre  $\Lambda$  à augmenter avec la température et l'ensoleillement et à diminuer avec les précipitations. Cette tendance suggère un enrichissement des sites carbonés C-2 et C-5 et/ou un appauvrissement des sites carbonés C-1 et C-6 des sucres de la baie (glucose, fructose, principalement [95]) lorsque la disponibilité en eau de la plante diminue.

Les échantillons d'éthanol analysés proviennent des sucres issus du raisin, organe hétérotrophe de la vigne, lorsque celui-ci est à maturité. La variation de distribution intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  sur les éthanol en fonction du climat, observée dans les paragraphes précédents, peut donc provenir d'un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à des processus photosynthétiques (ayant lieu dans la feuille) et/ou à des processus post-photosynthétiques (ayant lieu dans le fruit). Parmi ces processus figurent :

(i) la photorespiration, dont la proportion croît avec le stress hydrique [96]. Celle-ci induirait une teneur isotopique en  $^{13}\text{C}$  sur les sites C-2 et C-5 du glucose plus grande que celle des sites carbonés C-1 et C-6. Cette hypothèse peut être reliée au fait que chez les plantes en C4, pour lesquelles la photorespiration est inexistante, la teneur en  $^{13}\text{C}$  sur les sites carbonés C-1 et C-6 du glucose est plus grande que celle des sites carbonés C-2 et C-5. Cependant, le modèle mathématique élaboré par Tcherkez *et al.*(2004) [48] ne prédit pas de changement de distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  sur les sites carbonés C-1, C-2, C-5 et C-6 du glucose en fonction du taux de photorespiration (en considérant un effet isotopique de 1,020 lors de ce processus). Ce point particulier nécessite un approfondissement. L'analyse de glucides (saccharose, amidon) provenant de plantes à métabolismes C3 et C4 permettrait d'obtenir des éléments de réponse concernant l'implication de la photorespiration dans la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des glucides d'une plante.

(ii) la partition entre la formation du saccharose et de l'amidon dans la feuille [97]. Cette partition implique l'export du triose phosphate DHAP du chloroplaste vers le cytoplasme (cf. Chapitre 1 – paragraphe 3.2.2.1, Annexe 3 et Figure page suivante). Le calcul des  $\beta$ -facteurs permet de prédire un effet isotopique de 1,01 en  $^{13}\text{C}$  associé à l'isomérisation du DHAP en G3P (cf. Chapitre 1 – paragraphe 3.2.2.1 et ref. [48]). A l'équilibre, le DHAP est enrichi de 10‰ sur la position C-2 et appauvri de 10‰ sur la position C-3 par rapport au G3P. Le fait que, en cas de stress hydrique, la formation du saccharose dans le cytoplasme soit favorisée par rapport à la formation de l'amidon dans le chloroplaste [97] implique une proportion de DHAP exportée le jour plus importante, et potentiellement des sites carbonés C-2 et C-5 du fructose (formé après adolisation des trioses phosphates) plus riches en  $^{13}\text{C}$ . Cependant, le saccharose formé dans les feuilles et exporté vers les organes hétérotrophes provient à la fois de l'amidon chloroplastique (hydrolysé puis transformé en saccharose la nuit)

et du saccharose cytoplasmique (formé le jour à partir du DHAP exporté dans le cytoplasme) (cf. Figure ci-dessous et Annexe 3). Il est probable que l'enrichissement des sites carbonés C-2 et C-5 des parties glucosyle et fructosyle du saccharose cytoplasmique dû au stress hydrique soit compensé par un appauvrissement en  $^{13}\text{C}$ , du même ordre de grandeur, du saccharose provenant de l'amidon chloroplastique. L'implication de la partition entre le DHAP exporté le jour et la nuit est donc peu probable pour expliquer la variation de teneur isotopique intramoléculaire observée sur les éthanol.



**Reproduction de la Figure 10. Schéma représentant la formation des trioses phosphates, de l'amidon et du saccharose dans la feuille.**

Le saccharose exporté peut être formé soit à partir des trioses phosphates dans le cytoplasme de la cellule, soit à partir de la dégradation de l'amidon transitoire.

(iii) la voie des pentoses phosphates, qui est source de fractionnement isotopique sur le C-1 du glucose (effet isotopique cinétique de 1,016 dans le sens de l'oxydation du glucose-6-phosphate ; cf. Chapitre 1 – paragraphe 3.3.4) : plus la proportion de glucose empruntant cette voie augmente, plus le site carboné C-1 du glucose restant est riche en  $^{13}\text{C}$ . Une variation du flux métabolique du glucose empruntant cette voie, causé par une variation des paramètres environnementaux de la plante, par exemple, conduirait donc à une variation de la teneur isotopique du site carboné C-1 du glucose et par là même du site méthyle de l'éthanol formé à partir de ce glucose.

(iv) l'invertase, dont l'activité augmente avec le stress hydrique [95, 98]. En supposant un effet isotopique de 1,012 sur le C-2 de la partie fructosyle du saccharose lors de son hydrolyse par l'invertase (dans le sens saccharose  $\rightarrow$  glucose + fructose) [59], un accroissement de l'activité de l'invertase conduirait à un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  sur le site carboné C-2 du fructose formé en conditions de stress hydrique par rapport au fructose formé en l'absence de stress hydrique.

### 3 Conclusion

La répétabilité de la chaîne analytique lors de la fermentation de sucres (glucose, fructose, saccharose) en éthanol a été évaluée. Un écart type sur répétabilité de la fermentation de 0,3‰ au maximum sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  des éthanol est obtenu. La fermentation n'apparaissant pas être source d'un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$ , le seul point délicat dans la préparation de l'échantillon est la distillation, qui est source de fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  [99] et qui doit donc être effectuée de manière à obtenir un taux de recouvrement le plus proche possible de 100% de l'échantillon à analyser.

Les mesures effectuées par RMN  $^{13}\text{C}$  sur des éthanol d'origines géographiques et botaniques différentes ont permis de mettre en évidence des variations isotopiques intramoléculaires en carbone 13 des glucides selon:

- le **type d'assimilation** du  $\text{CO}_2$  (C3, C4 ou CAM) ;
- les **paramètres environnementaux** (température, précipitations, ensoleillement).

De plus, les valeurs de  $\delta_i^{13}\text{C}$  entre les sucres précurseurs (fructose, glucose et saccharose) et les éthanol formés par glycolyse semblent cohérentes, ce qui conforte l'intérêt de la détermination de la teneur isotopique site-spécifique sur les sucres.

L'inconvénient majeur de la molécule d'éthanol est que l'information obtenue via celle-ci est incomplète par rapport à celle qui pourrait être obtenue sur les sucres : les sites carbonés C-3 et C-4 des sucres ne sont pas pris en compte et une valeur moyenne est obtenue pour les sites carbonés C-1/C-6 (site méthyle) et C-2/C-5 (site méthylène). La dérivation de sucres de différentes origines botaniques pour leur analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique est envisageable pour vérifier les données obtenues sur les éthanol et augmenter l'information obtenue. C'est l'objet du chapitre suivant (chapitre 7).

En revanche, une telle étude sur un nombre élevé d'échantillons (> 70, comme c'est le cas ici) n'est pas envisageable. Pour étudier l'influence du climat (température, humidité, ensoleillement) sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des sucres, il conviendra dès lors d'établir un plan d'expériences visant à mettre en évidence le phénomène responsable des variations observées. Pour cela, des sucres provenant de plantes ayant poussé dans des conditions contrôlées (température, humidité, pression en  $\text{CO}_2$ , rapport  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ , ...) pourraient être dérivés, puis analysés par RMN  $^{13}\text{C}$ .

## 4 Partie expérimentale

### 4.1 Produits utilisés

Le glucose, le fructose et le saccharose utilisés proviennent de chez VWR. Le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et la peptone proviennent de chez Merck. Le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d6) est fourni par Eurisotop. Le tris(2,4-pentadionato)chrome-III  $\text{Cr}(\text{Acac})_3$  provient de chez Acros Organics. Les levures *Saccharomyces Cerevisiae* et *Saccharomyces Bayanus* sont fournies par Val-Oeno. Les bandelettes Clinitest ont été achetées dans une pharmacie locale.

### 4.2 Origine des éthanols

Pour la fermentation des jus de fruits, 2 g/L de *Saccharomyces cerevisiae* et 2 g/L de *Saccharomyces bayanus* sont ajoutés directement dans le jus. Pour les sucres commerciaux, la même quantité de levure est ajoutée à un milieu synthétique composé de 100 g/L de sucre (fructose, glucose ou saccharose) ; 4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ; 3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 2 g/L de peptone.

Les fermentations se déroulent à 30°C sous faible agitation (50 rpm) jusqu'à la disparition totale des sucres, vérifiée à l'aide d'un Clinitest. Les fermentations sont terminées en 3 jours environ. L'éthanol est ensuite extrait du milieu par distillation sur colonne à bande tournante Cadiot, selon le protocole de la méthode officielle[100].

Les échantillons d'éthanol de vins d'Europe ont été fournis par le Bureau Européen des vins, spiritueux et alcools (BEVABS, EC-JRC, Ispra, Italie).

### 4.3 Analyse RMN $^{13}\text{C}$

#### 4.3.1 Préparation des tubes

A 600  $\mu\text{L}$  d'éthanol à analyser sont ajoutés 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de  $\text{Cr}(\text{Acac})_3$  à 0,1 M dans du DMSO-d6. Les préparations sont laissées au moins 3 heures à température ambiante, pour permettre un éventuel dépôt du relaxant, puis filtrées sur papier ( de marque Kimwipes®) dans un tube de 5 mm de diamètre externe.

#### 4.3.2 Acquisition

Les expériences RMN ont été réalisées soit :

- sur le spectromètre Bruker Avance DRX500 opérant à la fréquence  $^1\text{H}$  de 500,13 MHz et  $^{13}\text{C}$  de 125,76 MHz équipé d'une sonde double accord 5 mm (Dual

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) avec lock  $^2\text{H}$ , avec une vitesse de rotation des tubes de 20 Hz ;

- sur le spectromètre Bruker Avance I opérant à la fréquence  $^1\text{H}$  de 400,13 MHz et  $^{13}\text{C}$  de 100,63 MHz équipé d'une sonde double accord 5 mm (Dual +  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) avec lock  $^2\text{H}$ , sans rotation des tubes.

Dans les deux cas, la température de la sonde est maintenue à 303 K.

Les paramètres pour l'acquisition sont les suivants : angle d'impulsion de  $90^\circ$ , durée d'acquisition (AQ) : 1 s ; Délai de relaxation (D1) : 25 s ; nombre de scans (NS) : 40. Le rapport S/B obtenu dans ces conditions est de 2500 environ. Cinq spectres sont acquis pour chaque échantillon et la valeur donnée est la moyenne des 5 spectres.

### 4.3.3 Traitement

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  des éthanols obtenus dans les conditions décrites dans les paragraphes précédents sont traités à l'aide d'une fonction d'apodisation de type exponentielle décroissante avec un facteur d'élargissement des raies (lb) de 2 Hz. Un phasage et une correction de la ligne de base sont effectués sur le spectre obtenu après transformée de Fourier.

L'intégration des raies des signaux d'intérêt est effectuée à l'aide du logiciel Perch (Université de Kuopio, Finlande). Ce logiciel permet de lisser les raies par des lorentziennes tout en ajustant les déplacements chimiques, la largeur à mi-hauteur, l'amplitude ainsi qu'une correction de la phase des pics.

## 4.4 Analyse SMRI

Les mesures SMRI sur les sucres ont été effectuées en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2. Les mesures SMRI pour la détermination de la déviation isotopique  $\delta^{13}\text{C}$  des éthanols ont été réalisées par le Bureau Européen des vins, spiritueux et alcools (BEVABS, EC-JRC, Ispra, Italie).

Les mesures SMRI pour la détermination de la déviation isotopique  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau du vin ont été réalisées par le Bureau Européen des vins, spiritueux et alcools (BEVABS, EC-JRC, Ispra, Italie) selon la méthode officielle [100].

# Chapitre 7 - Application de la méthodologie d'analyse des sucres par RMN $^{13}\text{C}$ isotopique : évaluation de l'outil pour l'étude de métabolismes

## 1 Introduction

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence une influence de l'origine botanique (C3, C4, ou CAM) sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  sur les molécules de glucose, de fructose et/ou de saccharose, *via* l'analyse des éthanols. Ces différences sont dues soit à la différence de mécanisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  (photorespiration, par exemple), soit à des flux métaboliques différents lors des réactions permettant la formation ou l'utilisation des glucides. Cependant, l'information obtenue *via* la molécule d'éthanol est incomplète : seules les moyennes des déviations isotopiques  $^{13}\text{C}$  des sites carbonés C-1 et C-6 et celles des sites carbonés C-2 et C-5 des sucres sont accessibles.

L'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique de glucoses d'amidon et de saccharoses (métabolites de stockage chez les végétaux) provenant de plantes à métabolisme C3 et C4 apparaît indispensable pour approfondir les connaissances sur le fractionnement isotopique photosynthétique et post-photosynthétique. Cette analyse est envisageable avec la méthodologie mise au point dans le chapitre 4 (dérivation en glucose en TAMAGF et du fructose en MADAFP puis analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique des molécules dérivées).

L'objet de ce chapitre est, dans un premier temps, de présenter les résultats obtenus sur des glucoses d'amidon et des saccharoses provenant de plantes à métabolisme C3 ou C4, en utilisant la méthodologie décrite dans le chapitre 4. Ces résultats seront confrontés avec ceux relevés dans la littérature. Nous dresserons ensuite une liste d'hypothèses pour tenter d'expliquer les différents profils isotopiques en  $^{13}\text{C}$  obtenus sur ces échantillons.

Enfin, les résultats de la méthodologie appliquée à un glucose provenant d'amidon foliaire d'une plante à métabolisme C3 seront présentés. Là encore, des hypothèses seront formulées concernant l'implication des réactions responsables de la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  de cette molécule.

## 2 Analyse d'échantillons de glucoses d'amidon de diverses origines

### 2.1 Etude préliminaire : répétabilité associée à l'hydrolyse enzymatique de l'amidon

Les échantillons de glucose analysés dans ce paragraphe proviennent de l'hydrolyse enzymatique d'amidons commerciaux.

La répétabilité lors du processus d'hydrolyse enzymatique de l'amidon par l'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) doit être évaluée. Pour cela, l'hydrolyse du même amidon de blé (cf. partie expérimentale – paragraphe 7.2) a été réalisée trois fois et le glucose obtenu a été dérivé en TAMAGF (cf. partie expérimentale – paragraphe 7.2). Les résultats des  $\delta_i^{13}\text{C}$  moyens et les écarts types sur ces  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur trois répétitions sont regroupés dans le Tableau 30. L'écart type de répétabilité sur les valeurs de  $\delta_i^{13}\text{C}$  lors de l'hydrolyse de l'amidon est de 1,2‰ au maximum pour le carbone C-3. Cette valeur est en accord avec la précision de la méthodologie (de l'ordre de 1‰).

Tableau 30. Moyennes des déviations isotopiques site spécifique  $\delta_i^{13}\text{C}$  et écarts types sur le TAMAGF obtenu à partir de l'hydrolyse du même amidon commercial (n=3).

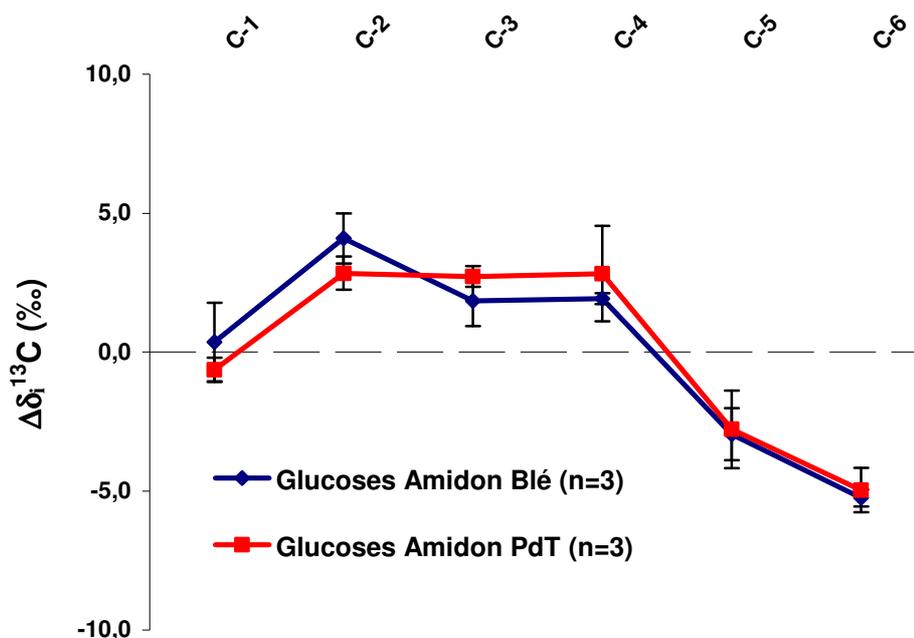
TAMAGF	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\delta_i$ moyen (‰) n=3	-26,3	-23,0	-24,4	-25,9	-29,4	-32,9
Ecart type (‰)	1,0	0,7	1,2	0,6	0,7	0,8

La robustesse associée à l'hydrolyse enzymatique de l'amidon en terme de fractionnement isotopique n'a pas encore été évaluée par notre méthodologie. D'après les données de la littérature, un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  apparaît peu probable lors de ce processus [101, 102]. De plus, le taux de conversion lors de la transformation de l'amidon en glucose par l'amyloglucosidase est supérieur à 90% [103], ce qui laisse à penser qu'un fractionnement isotopique négligeable est attendu.

### 2.2 Amidons de plantes à métabolisme C3

Plusieurs glucoses provenant de l'hydrolyse d'amidons issus de plantes à métabolisme C3 (pomme de terre et blé) ont été dérivés puis analysés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Pour comparer les

valeurs, les résultats sont présentés en écart à la déviation isotopique globale du glucose  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  (cf. Chapitre 4 – paragraphe 4). Les moyennes de l'écart à la valeur globale  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur ces six échantillons ( $n = 3$  pour le blé et  $n = 3$  pour la pomme de terre) sont regroupées sur la Figure 58, ainsi que les écarts types sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur les 3 échantillons pour chaque origine (blé et pomme de terre).



**Figure 58. Moyennes des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné de glucoses provenant de l'hydrolyse d'amidons de pomme de terre « PdT » ( $n = 3$ ) et de blé ( $n=3$ ).**

Les écarts types sont ceux obtenus sur trois échantillons différents d'amidon pour chaque espèce (pomme de terre et blé).

Les positions C-2, C-3 et C-4 sont enrichies en  $^{13}\text{C}$  par rapport à la valeur globale alors que les positions C-5 et C-6 sont appauvries. Globalement, il n'y a pas de différence significative entre les glucoses provenant de l'amidon de pomme de terre ( $n=3$ ) et ceux provenant de l'amidon de blé ( $n=3$ ). Nous pouvons donc regrouper ces valeurs pour déterminer une valeur moyenne des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  de glucose d'amidon C3 que nous utiliserons par la suite.

Les moyennes et écarts types sur les  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  obtenus sur les 6 échantillons réunis de glucoses d'amidon de plantes en C3 (pomme de terre et blé) sont regroupés dans le Tableau 31. L'écart type maximal sur les  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  obtenu (1,2‰ pour le C-4) est du même

ordre de grandeur que l'écart type sur la répétabilité de l'hydrolyse de l'amidon. Nous utiliserons donc ces valeurs que nous nommerons « Amidon C3 » par la suite.

**Tableau 31. Moyennes et écarts types des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné de la molécule de glucose provenant d'amidons C3 (n=3).**

TAMAGF	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\delta_i^{13}\text{C}$ moyen (‰)	-0,1	3,5	2,3	2,4	-2,9	-5,1
Ecart type (‰)	1,1	1,0	0,8	1,2	1,1	0,6

### 2.3 Amidons de plantes à métabolisme C4

Quatre échantillons de glucose de maïs (C4) ont été dérivés puis analysés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Les moyennes de l'écart à la valeur globale obtenue par SMRI,  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ , sur ces quatre échantillons sont regroupées sur la Figure 59, ainsi que les écarts types sur les  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  de ces quatre échantillons. Les glucoses d'amidon de maïs présentent un enrichissement relatif en  $^{13}\text{C}$  sur le site carboné C-1 (3,5‰ par rapport à la valeur globale) et un appauvrissement relatif sur les sites carbonés C-5 et C-6 (-3,4‰ et -3,0‰ par rapport à la valeur globale, respectivement). Un écart type relativement élevé est obtenu sur les sites carbonés C-5 et C-6 (écart type de 1,3‰ et 1,4‰, respectivement). L'analyse d'autres échantillons de glucoses d'amidon de maïs permettrait de confirmer ou d'infirmer ces écarts types relativement élevés.

Les valeurs des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  obtenues par Rossmann *et al.* (dégradation par microorganismes) (1991) [49] sur un glucose provenant de l'hydrolyse d'amidon de maïs sont également reportées sur la Figure 59, pour comparaison. Les valeurs des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sont différentes entre les échantillons analysés par Rossmann *et al.* (1991) [49] et ceux analysés par la méthodologie développée dans le Chapitre 4, notamment concernant les positions C-1, C-4 et C-5. Les raisons permettant d'expliquer de telles différences ne sont pas encore clairement établies.

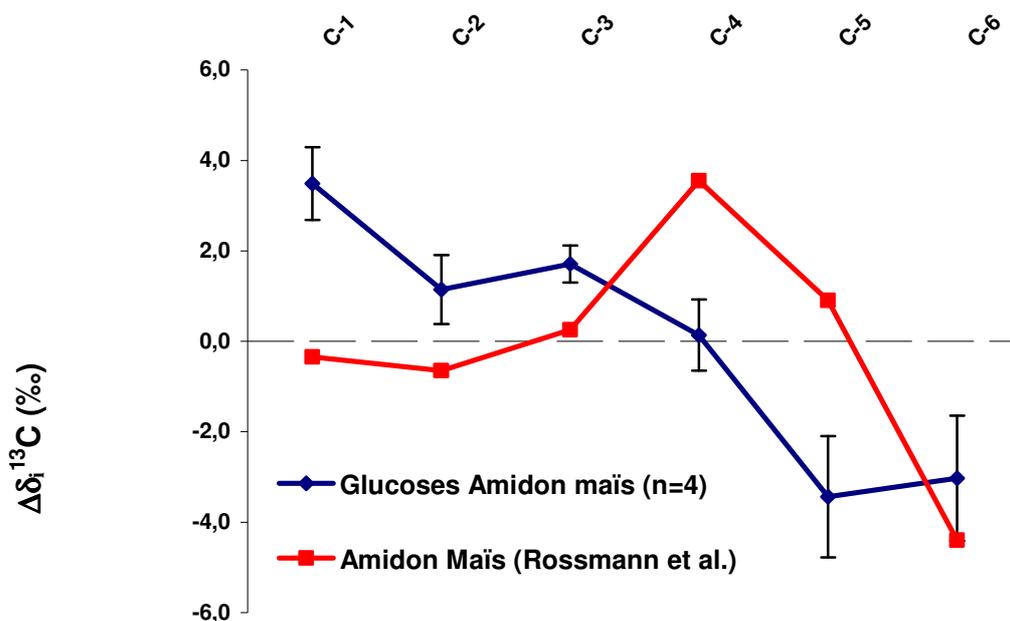


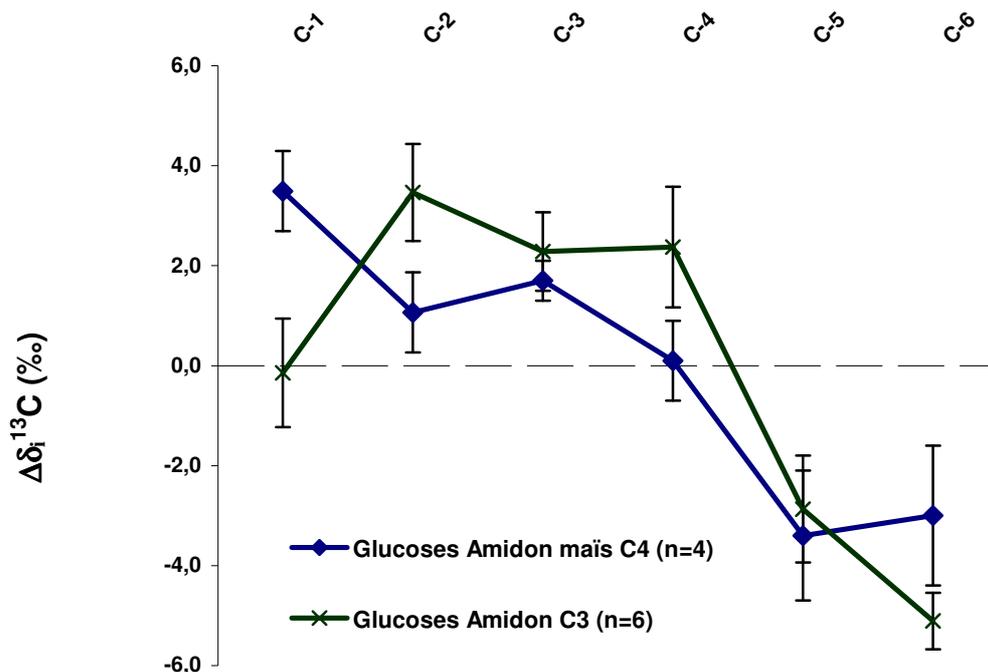
Figure 59. Moyennes de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques  $\Delta\delta_i$  ( $^{13}\text{C}$ ) sur chaque site carboné de glucoses obtenus à partir de 4 amidons de maïs commerciaux différents et résultats de la méthode enzymatique utilisée par Rossmann *et al.* sur un glucose de maïs (dégradation par microorganismes).

Les écarts types sont ceux obtenus sur les quatre échantillons différents d'amidon de maïs.

## 2.4 Différence de distribution intramoléculaire en $^{13}\text{C}$ dans le glucose provenant d'amidons C3 et d'amidons C4

Les résultats obtenus sur les glucoses d'amidon provenant de plantes ayant un métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  différent (C3, C4) sont regroupés sur la Figure 60. Chez les espèces de type C3, l'amidon formé est enrichi en C-2 et C-4 et appauvri en C-1 et C-6 par rapport à l'amidon provenant de plantes en C4.

Ces résultats sont cohérents avec les mesures effectuées sur la molécule d'éthanol provenant de différentes origines botaniques (Chapitre 6 – paragraphe 2.2). Pour cette dernière, le site méthylène est enrichi par rapport au site méthyle chez les espèces de type C3 et la tendance inverse est observée chez les espèces de type C4. Ces données sont corroborées par l'enrichissement en C-1 et C-6 (enrichissement relatif du site méthyle) et l'appauvrissement en C-2 (appauvrissement relatif du site méthylène) chez les plantes en C4.



**Figure 60. Moyenne de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné de glucoses provenant de plantes à métabolisme C3 (pomme de terre et blé) et de plantes à métabolisme C4 (maïs).**

Les écarts types sont ceux obtenus sur six échantillons différents d'amidon pour chaque espèce C3 (pomme de terre et blé) et quatre échantillons pour l'espèce C4 (maïs).

Les valeurs théoriques du paramètre  $\Lambda$  (différence de déviation isotopique en  $^{13}\text{C}$  entre le site méthylène et le site méthyle de la molécule d'éthanol ; cf. Chapitre 6 – paragraphe 2.2) peuvent être calculées à partir des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  mesurés sur les glucoses d'amidon C3 et C4. Ces valeurs sont reportées dans le Tableau 32. Un bon accord est observé entre les valeurs de  $\Lambda$  théoriques calculées et les valeurs expérimentales effectivement mesurées (Tableau 32).

Le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  lors d'une fermentation totale du glucose en éthanol peut être estimé en mesurant la teneur isotopique en  $^{13}\text{C}$  du glucose de départ et celle de l'éthanol formé [54]. Théoriquement, ce fractionnement peut être calculé à partir des valeurs de sites carbonés C-1, C-2, C-5 et C-6, les carbones C-3 et C-4 étant perdus sous forme de  $\text{CO}_2$  lors de la fermentation glycolytique. Les données issues de la littérature concernant le fractionnement isotopique lors de la fermentation glycolytique de glucoses d'amidons C3 et C4 sont regroupées dans le Tableau 33 [54].

**Tableau 32.** Valeur du paramètre  $\Lambda$  de la molécule d'éthanol calculée théoriquement à partir des valeurs obtenues sur les sucres (paragraphes 2.2 et 2.3) et mesurée expérimentalement sur les éthanolis provenant des sucres après fermentation (moyenne des résultats sur les échantillons de pomme de terre et blé (C3) et de maïs (C4) présentés dans le Tableau 27 (chapitre 6 – paragraphe 2.2)).

Métabolisme	Valeur théorique <sup>a</sup>		Valeur mesurée	
	C3	C4	C3	C4
$\Lambda$ (‰)	3,2	-1,5	2,2	-3

<sup>a</sup>Calculée à partir des  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  obtenus sur les sucres

Ces valeurs ont aussi été calculées à partir des valeurs des  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné des glucoses d'amidon issus de plantes à métabolisme C3 et C4, analysés dans ce chapitre (Tableau 33).

**Tableau 33.** Différence de déviation isotopique entre amidons et éthanolis produits lors de la fermentation alcoolique mesurée par SMRI (d'après Hobbie et Werner (2003) [54]) et calculée théoriquement sur les amidons analysés dans le paragraphe 2.

Métabolisme	Valeur théorique <sup>a</sup>		Valeur mesurée	
	C3	C4	C3	C4
Amidon - EtOH	1,2	1,0	1,7	0,3

<sup>a</sup>Valeur théorique = moyenne des  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  des sites carbonés C-3 et C-4

Les données issues de la littérature sont concordantes avec les données calculées en utilisant les valeurs obtenues sur les glucoses d'amidons issus de plantes à métabolisme C3 et C4. Les données sur les éthanolis suggéraient un couple C-3/C-4 plus riche en  $^{13}\text{C}$  chez les plantes en C3. L'analyse des glucoses d'amidon de plantes à métabolisme C3 et C4 permet de montrer que la différence entre plantes C3 et C4 est liée essentiellement au site carboné C-4.

### 3 Analyse d'échantillons de saccharoses de plantes à métabolisme C3 et C4

La méthodologie décrite dans le Chapitre 4 permet l'obtention, à partir du saccharose, de deux molécules analysables par RMN  $^{13}\text{C}$  : l'une dérivée du glucose (TAMAGF) et l'autre dérivée du fructose (MADAFP). L'étude de la répartition intramoléculaire en carbone 13 sur la molécule de saccharose est donc envisageable.

### 3.1 Mise en évidence d'une différence de distribution isotopique intramoléculaire en carbone 13 entre la partie glucosyle et la partie fructosyle du saccharose

Deux saccharoses ont été dérivés puis analysés par RMN  $^{13}\text{C}$  : un saccharose de betterave (C3) et un saccharose de canne (C4). Les résultats obtenus sur le TAMAGF et sur le MADAFP sont regroupés sur la Figure 61.

Quelque soit l'origine botanique (betterave ou canne), une différence importante entre les groupements fructosyle et glucosyle est observée sur les  $\delta_i^{13}\text{C}$  des sites carbonés C-2 et C-1. La position C-1 est appauvrie en  $^{13}\text{C}$  et la position C-2 enrichie en  $^{13}\text{C}$  sur la partie fructosyle par rapport à la partie glucosyle.

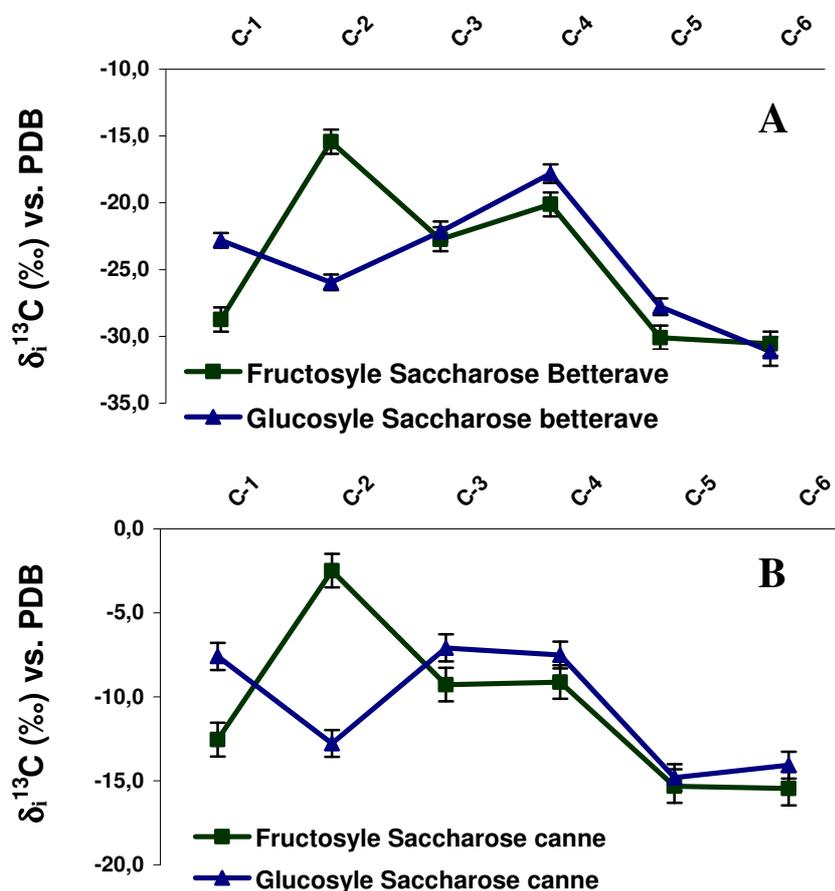


Figure 61. Déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné des parties glucosyle (courbe bleue) et fructosyle (courbe verte) d'un saccharose de betterave C3 (A) et d'un saccharose de canne C4 (B).

Les écarts types reportés pour les parties glucosyles sont ceux obtenus lors de la répétabilité de synthèse du TAMAGF : 0,8‰. Les écarts types reportés pour les parties fructosyles sont ceux obtenus lors de la répétabilité RMN  $^{13}\text{C}$  sur le MADAFP : 1‰.

### 3.2 Comparaison avec les valeurs obtenues par Rossmann et al . sur un saccharose de betterave

Les résultats obtenus par Rossmann *et al.* (1991)[49] sur le saccharose de betterave sont reportés sur la Figure 62 ainsi que les valeurs obtenues par notre méthodologie (moyenne des  $\delta_i^{13}\text{C}$  des parties glucosyle et fructosyle du saccharose).

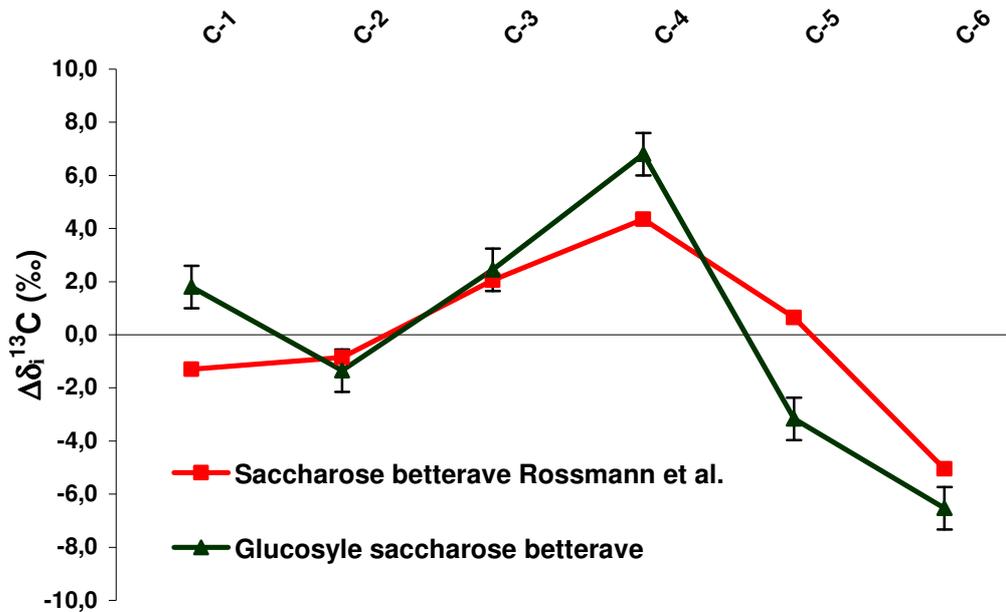


Figure 62. Comparaison de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné de la partie glucosyle d'un saccharose de betterave (C3) obtenu par la méthodologie décrite au chapitre 4 et obtenu par Rossmann *et al.* (dégradation par microorganismes)(1991) [49].

Les écarts types reportés pour les parties glucosyles sont ceux obtenus lors de la répétabilité de synthèse du TAMAGF : 0,8‰.

En comparant les valeurs obtenues par Rossmann *et al.* (par dégradation à l'aide de microorganismes)(1991) [49] sur un saccharose de betterave et la partie glucosyle d'un saccharose de betterave obtenue par la méthodologie présentée dans le Chapitre 4, la même tendance est observée. Curieusement, l'accord trouvé sur un saccharose de betterave par les deux méthodologies (dégradation enzymatique et dérivation + analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique) n'est pas retrouvé pour un glucose de maïs. Aucune explication claire ne permet d'expliquer cette observation.

### 3.3 Influence du métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub> sur la distribution isotopique intramoléculaire en <sup>13</sup>C du saccharose

Pour mettre en évidence une différence éventuelle de profil isotopique <sup>13</sup>C entre les saccharoses de canne et de betterave en terme de distribution isotopique intramoléculaire en carbone 13, les moyennes des parties glucosyle et fructosyle de ces saccharoses ont été calculées et les résultats sont regroupés sur la Figure 63.

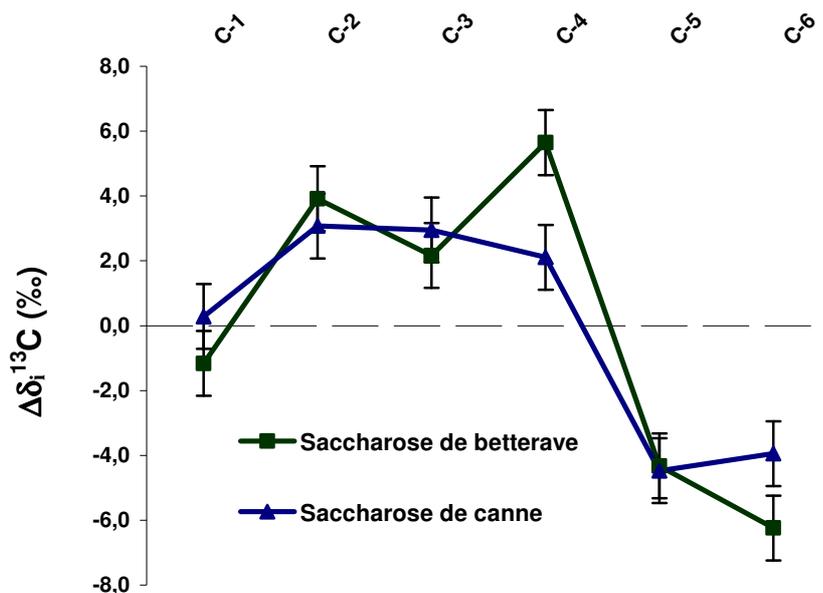


Figure 63. Comparaison de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques  $\Delta\delta_i$  (<sup>13</sup>C) sur chaque site carboné d'un saccharose de betterave (C<sup>3</sup> ; courbe verte) et d'un saccharose de canne (C<sup>4</sup> ; courbe bleue) obtenu par la méthodologie décrite dans le Chapitre 4.

Les valeurs reportées sont la moyenne des parties fructosyle et glucosyle du saccharose

Les écarts types reportés sont ceux obtenus lors de la répétabilité RMN <sup>13</sup>C sur le MADAFP : 1‰.

L'enrichissement relatif sur le site carboné C-4 et l'appauvrissement relatif sur le site carboné C-6 chez les plantes en C<sub>3</sub> (betterave) par rapport aux plantes en C<sub>4</sub> (canne) sont du même ordre de grandeur que ceux observés sur les glucoses d'amidon (paragraphe 2.4). En revanche, les positions C-1 et C-2 ne sont pas statistiquement différentes d'un métabolisme à l'autre.

## **4 Discussion sur l'origine du fractionnement isotopique en $^{13}\text{C}$ observé sur les amidons et saccharoses de plantes à métabolisme C3 et C4**

Ce paragraphe va permettre d'exposer des hypothèses permettant d'expliquer les différences observées sur les différents échantillons analysés par RMN  $^{13}\text{C}$  et dont les résultats figurent dans les paragraphes 2 et 3 de ce chapitre. En premier lieu, rappelons que les glucoses d'amidon et les saccharoses analysés dans ce chapitre sont des réserves glucidiques et proviennent des organes hétérotrophes des plantes. Les hypothèses que nous formulerons doivent donc prendre en compte cet aspect.

Trois points seront abordés dans ce paragraphe : (i) la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  dans la molécule de saccharose ; (ii) l'impact du métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des glucides analysés (amidons et saccharoses de plantes à métabolisme C3 et C4) ; (iii) les effets isotopiques en  $^{13}\text{C}$  associés aux réactions post-photosynthétiques potentiellement responsables des profils isotopiques en  $^{13}\text{C}$  mesurés sur les glucides.

## 4.1 Bilan des échantillons analysés

Les valeurs des écarts à la valeur globale  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  pour les différents échantillons analysés et dont les résultats apparaissent dans les paragraphes 2 et 3 sont regroupés dans le Tableau 34.

Tableau 34. Récapitulatif des valeurs des écarts à la valeur globale  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ , exprimés en ‰, obtenues sur les sucres de différentes origines.

	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<b>Glucoses amidon C3</b>	<b>-0,1</b>	<b>3,5</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>-2,9</b>	<b>-5,1</b>
<b>Glucoses amidon C4</b>	<b>3,5</b>	<b>1,1</b>	<b>1,7</b>	<b>0,1</b>	<b>-3,4</b>	<b>-3,0</b>
Glucosyle saccharose C3	1,8	-1,4	2,4	6,8	-3,2	-6,5
Fructosyle saccharose C3	-4,1	9,2	1,9	4,5	-5,5	-5,9
<b>Moyenne glc+frc saccharose C3</b>	<b>-1,2</b>	<b>3,9</b>	<b>2,2</b>	<b>5,6</b>	<b>-4,3</b>	<b>-6,2</b>
Glucosyle saccharose C4	3,1	-2,1	3,6	3,2	-4,1	-3,4
Fructosyle saccharose C4	-1,9	8,2	1,4	1,6	-4,6	-4,8
<b>Moyenne glc+frc saccharose C4</b>	<b>0,6</b>	<b>3,0</b>	<b>2,5</b>	<b>2,4</b>	<b>-4,4</b>	<b>-4,1</b>

## 4.2 Distribution isotopique intramoléculaire en $^{13}\text{C}$ dans la molécule de saccharose

La première constatation nouvelle de ce chapitre est la différence de profil isotopique en  $^{13}\text{C}$  entre les parties glucosyle et fructosyle du saccharose (paragraphe 3.1). Dans le saccharose de betterave, la différence de  $\delta_i^{13}\text{C}$  entre la partie fructosyle et la partie glucosyle est de 10,6‰ sur le site carboné C-2 et -5,9‰ sur le site carboné C-1. Dans le saccharose de canne elle est de 10,3‰ sur le site carboné C-2 et de -5‰ sur le site carboné C-1.

Cet écart au sein de la molécule de saccharose peut s'expliquer par un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à la réaction d'isomérisation transformant le fructose-6-phosphate F6P en glucose-6-phosphate G6P. Le calcul à l'aide des  $\beta$ -facteurs prédit des effets de 1,020 sur le site carboné C-1 et 0,98 sur le site carboné C-2 associés à l'équilibre  $\text{G6P} = \text{F6P}$  (cf. Chapitre 1 – paragraphe 3.3.2 et Annexe 3). Les  $\beta$ -facteurs prédisent donc qu'à l'équilibre, le site carboné C-1 du glucose est enrichi de 20‰ et le site carboné C-2 appauvri de 20‰ par rapport au fructose. Cette tendance est observée sur les saccharoses analysés dans ce chapitre (enrichissement en C-1 et appauvrissement en C-2 de la partie glucosyle du saccharose) mais celle-ci est moins prononcée.

## 4.3 Influence potentielle du métabolisme d'assimilation du $\text{CO}_2$

Les  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  obtenus sur les saccharoses et amidons provenant de plantes à métabolisme C3 ou C4 sont différents sur les sites carbonés C-1, C-2, C-4 et C-6.

Concernant les sites carbonés C-1 et C-2, le profil isotopique de l'amidon de maïs (C4) diffère de celui obtenu sur le saccharose de canne (C4), lui-même très proche des valeurs obtenues sur les glucides C3 (saccharose de betterave, amidons de blé et de pomme de terre). Autrement dit, la valeur des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur les sites carbonés C-1 et C-2 sur les glucoses d'amidon de maïs doit s'expliquer plutôt par un fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  différent entre espèces (canne et maïs par exemple) que par la différence de métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  (C3 ou C4).

Seule la teneur isotopique en  $^{13}\text{C}$  des carbones C-4 et C-6 peut potentiellement être sensible au mode d'assimilation du  $\text{CO}_2$ . Pour un même métabolite de stockage (amidon ou saccharose) le site carboné C-4 est enrichi (de 2,3‰ et 3,2‰ pour l'amidon et le saccharose, respectivement) et le site carboné C-6 appauvri (de 2,1‰ pour l'amidon et le saccharose) chez les plantes en C3 par rapport aux plantes en C4.

Comme mentionné dans le Chapitre 6 – paragraphe 2.2, le mécanisme d'assimilation du CO<sub>2</sub> (C3 ou C4) pourrait avoir une influence sur la distribution isotopique des sucres formés par la photosynthèse. Chez les plantes en C3, le taux de photorespiration est élevé (le taux de fixation du dioxygène peut représenter 50% du taux de carboxylation) alors que chez les plantes en C4, la photorespiration est inexistante. Le modèle mathématique mis au point par Tcherkez *et al.* (2004) [48] montre un enrichissement relatif sur le site carboné C-4 lorsque le taux de photorespiration augmente (en estimant un effet isotopique de 1,020 associé à ce processus). Cette prédiction concorde avec nos observations sur les glucides analysés dans ce chapitre. Ce modèle considère la teneur isotopique en <sup>13</sup>C sur le site carboné C-6 est égale à celle du site carboné C-1 (les positions C-1 et C-6 sont équilibrées par l'isomérisation des trioses phosphates ; cf. paragraphe 4.4). L'influence de la photorespiration sur la teneur en <sup>13</sup>C sur le site carboné C-6 n'est donc pas déterminée. De plus, l'équilibre de ces deux positions carbonées (C-1 et C-6) lors de l'isomérisation des trioses phosphates (cf. paragraphe 4.4) induit une teneur isotopique en <sup>13</sup>C identique pour ces deux sites carbonés, ce qui n'est pas observé sur les échantillons analysés. Ceci suggère un appauvrissement en <sup>13</sup>C du site carboné C-6 et/ou un enrichissement en <sup>13</sup>C du site carboné C-1 associés à d'autres réactions que celles impliquées dans le processus de photorespiration.

La concentration en CO<sub>2</sub> au niveau du site de la carboxylation par la Rubisco, élevée chez les plantes en C4 et plus faible chez les plantes en C3, ne permet pas d'expliquer les différences observées : dans ces deux types de métabolisme, le glucose est synthétisé *via* le cycle de Calvin et dans les deux cas, les enzymes impliquées sont les mêmes.

#### **4.4 Influence potentielle des flux métaboliques et effets isotopiques en <sup>13</sup>C associés**

Les données reportées dans le Tableau 34 montrent des différences de  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur certains sites carbonés pour les glucides (amidon et saccharose) issus de plantes à métabolisme d'assimilation du CO<sub>2</sub> similaire. Ces différences peuvent être expliquées par des flux métaboliques, et donc des fractionnements isotopiques en <sup>13</sup>C, différents selon les espèces.

#### ➤ Variabilité des $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ du site carboné C-4

Quel que soit le métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$ , un appauvrissement en  $^{13}\text{C}$  sur le site carboné C-4 du glucose d'amidon est observé (de 3,2‰ et 2,3‰ pour les espèces de type C3 et C4, respectivement) par rapport au saccharose. Celui-ci peut s'expliquer par la formation de l'amidon par la starch synthase dans les organes hétérotrophes, impliquant les carbones C-1 et C-4 du glucose. Les fractionnements isotopiques en  $^{13}\text{C}$  associé à la formation ou à la dégradation de l'amidon ne sont cependant pas connus.

Le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à la réaction d'aldolisation des trioses phosphates DHAP et G3P en FBP (catalysée par l'aldolase) peut aussi être responsable de la variabilité observée sur le C-4. Si la réaction d'aldolisation est à l'équilibre (expression de l'effet isotopique d'équilibre : 1,0036 pour le C-3 et 1,0049 pour le C-4 dans le sens de la formation des trioses phosphates [52]), les carbones C-3 et C-4 du FBP sont enrichis par rapport aux trioses phosphates (Figure 64). Cet enrichissement est effectivement observé sur le saccharose de betterave analysé par notre méthodologie (Tableau 34) mais aussi sur les valeurs des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  obtenues par Rossmann *et al.* (1991) [49]. En revanche, un déplacement de l'équilibre conduirait à l'expression de l'effet isotopique cinétique, normal pour le C-3 (1,016) et inverse pour le C-4 (0,997) [52] dans le sens du clivage du FBP, provoquant un appauvrissement relatif en  $^{13}\text{C}$  du site carboné C-4 par rapport au site carboné C-3, ce qui est effectivement observé pour le maïs (Tableau 34).

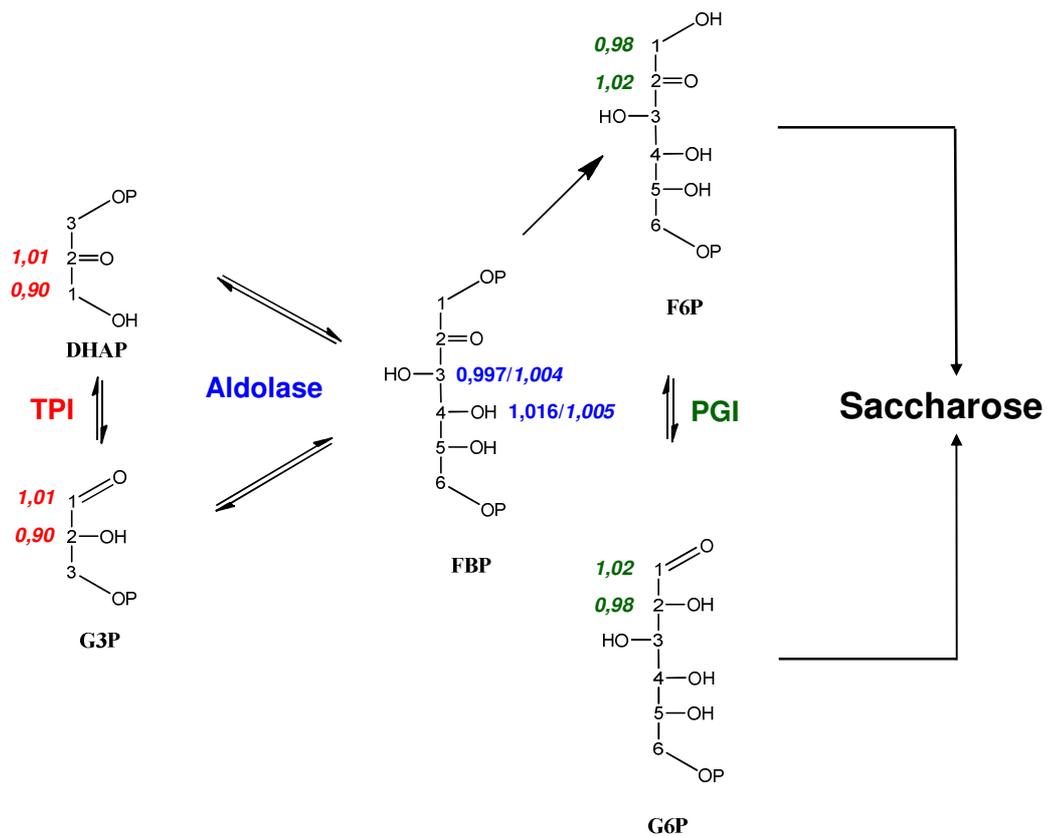
#### ➤ Inversion des $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ des sites carbonés C-1 et C-2 dans le glucose d'amidon de maïs

La différence de  $\delta_i^{13}\text{C}$  des carbones C-1 et C-2 entre les glucoses d'amidon de maïs et les glucoses d'amidon C3 ne peut pas être expliquée par la différence de métabolisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  C3 vs. C4 (cf. paragraphe 4.3). Dès lors, des réactions, autres que la photorespiration et impliquant ces carbones, doivent être à l'origine de cette différence.

Chez le maïs, le saccharose peut être partiellement hydrolysé en glucose et fructose avant de rentrer dans la cellule du grain (lieu de formation et de stockage de l'amidon) [104, 105] contrairement à la betterave [106], la canne [107] ou le blé [108], pour lesquels le saccharose entre intact (sans hydrolyse préalable) dans la cellule. De plus, l'entrée du glucose dans les cellules du grain de maïs s'effectue plus rapidement que celle du fructose [105]. Deux hypothèses sont alors plausibles:

(i) l'hydrolyse du saccharose par l'invertase entraîne un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  sur le site carboné C-2 du fructose avant son entrée dans la cellule et donc un enrichissement potentiel sur le site carboné C-2 du glucose d'amidon ;

(ii) La partition entre glucose et fructose avant la formation de l'amidon n'est pas la même pour le blé et le maïs, induisant un fractionnement isotopique différent sur les positions C-1 et C-2 si un effet isotopique est associé à l'isomérisation des hexoses (équilibre glucose=fructose). Le fractionnement isotopique  $^{13}\text{C}$  associé à l'isomérisation des hexoses n'a cependant jamais été déterminé.



**Figure 64.** Réaction d'isomérisation des trioses phosphates DHAP et G3P (catalysée par la triose phosphate isomérase TPI), d'aldolisation de ces derniers en FBP (catalysée par l'aldolase) et isomérisation du G6P en F6P (catalysée par la phosphoglucose isomérase PGI). Les effets isotopiques en  $^{13}\text{C}$  associés à ces réactions sont indiqués sur les carbones impliqués (en bleu : effets isotopiques associés au clivage du FBP en trioses phosphates déterminés par Gleixner *et al.* (1997) [52] ; en rouge : effets isotopiques associés à l'isomérisation des trioses phosphates calculés à l'aide des  $\beta$ -facteurs ; en vert : effets isotopiques associés à l'isomérisation du F6P en G6P calculés à l'aide des  $\beta$ -facteurs sur les formes cycliques). Les nombres en italique indiquent un effet isotopique d'équilibre.

### ➤ Appauvrissement relatif du site carboné C-6

L'appauvrissement relatif en  $^{13}\text{C}$  du carbone C-6 reste à élucider. Toutefois, il est probable, comme le soulignent Rossmann *et al.* (1991) [49], que le C-6 soit le site carboné le moins sensible aux effets isotopiques (le moins impliqué dans les différentes réactions du métabolisme des glucides dans la plante). Le fait que les positions carbonées C-1 et C-6 soient échangées dans les organes hétérotrophes par le biais des trioses phosphates (Figure 64) implique que la déviation isotopique sur ces deux positions devrait être la même. Or cette égalité C-1/C-6 n'est pas observée, quels que soient les échantillons considérés. Un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à l'isomérisation des trioses phosphates sur une de ces deux positions est très peu probable (le calcul  $\beta$ -facteurs pour les sites carbonés C-3 du DHAP donne un effet isotopique inférieur à 1,001). Une autre réaction doit donc être responsable de cette différence. L'implication de la voie des pentoses phosphates est une explication potentielle des différences observées entre les sites C-1 et C-6 [48]. La transformation du glucose en gluconate, catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, est associée à un effet isotopique cinétique normal en  $^{13}\text{C}$  : le site carboné C-1 du glucose restant est enrichi en  $^{13}\text{C}$  par rapport au glucose métabolisé par cette voie. Le résultat est donc un enrichissement relatif en  $^{13}\text{C}$  sur le site carboné C-1 par rapport au site carboné C-6.

L'enrichissement relatif en  $^{13}\text{C}$  du site carboné C-1 par rapport au site carboné C-6 pourrait aussi s'expliquer par la formation ou la dégradation de l'amidon, impliquant les sites carbonés C-1 et C-4 du glucose.

### ➤ Enrichissement relatif du C-2 par rapport au C-5

Théoriquement, et en suivant le même raisonnement que celui tenu pour les sites C-1 et C-6 dans le paragraphe précédent, les sites carbonés C-2 et C-5 des sucres devraient avoir la même teneur isotopique en  $^{13}\text{C}$  si l'isomérisation des trioses phosphates n'est pas source de fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  (Figure 64). L'enrichissement relatif du C-2 par rapport au C-5 (enrichissement relatif en  $^{13}\text{C}$  de 4,5‰ à 8,2‰ selon les types de plantes considérées ; cf. Tableau 34), quels que soient les échantillons considérés, suggère un effet isotopique associé à l'isomérisation des trioses phosphates. Lors de l'isomérisation du DHAP en G3P, le carbone C-2 passe d'un état d'hybridation  $sp^2$  à un état d'hybridation  $sp^3$ . Le calcul par les  $\beta$ -facteurs permet de prédire un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  de 0,90 et 1,01 sur les sites carbonés C-1 et C-2 du DHAP, respectivement (à l'équilibre, le site carboné C-2 du DHAP est enrichi de 10‰ par rapport au C-2 du G3P ; Figure 64). Les effets isotopiques associés à l'isomérisation des trioses phosphates peuvent potentiellement conduire à un enrichissement relatif du site

carboné C-4 du glucose par rapport au site carboné C-3 (Figure 64). Cet enrichissement n'est observé que sur le saccharose de betterave, suggérant une surimposition des effets isotopiques associés à l'aldolisation des trioses phosphates à ceux induits par leur isomérisation.

L'effet isotopique lors de l'isomérisation des trioses phosphates n'a jamais été mesuré, mais il apparaît d'une importance capitale pour la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  du glucose et du fructose, qui sont eux-mêmes les précurseurs de nombreux autres métabolites [48, 54].

#### 4.5 Conclusion - perspectives

Les résultats présentés dans les paragraphes précédents impliqueraient des effets isotopiques associés aux réactions d'isomérisation (G6P=F6P ; DHAP=G3P). Ces effets pourraient être une source non négligeable de fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  permettant d'expliquer la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des glucides étudiés.

La formation ou la dégradation de l'amidon peut être potentiellement source de fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$ . Ce fractionnement pourrait être estimé par la méthodologie décrite dans le chapitre 4.

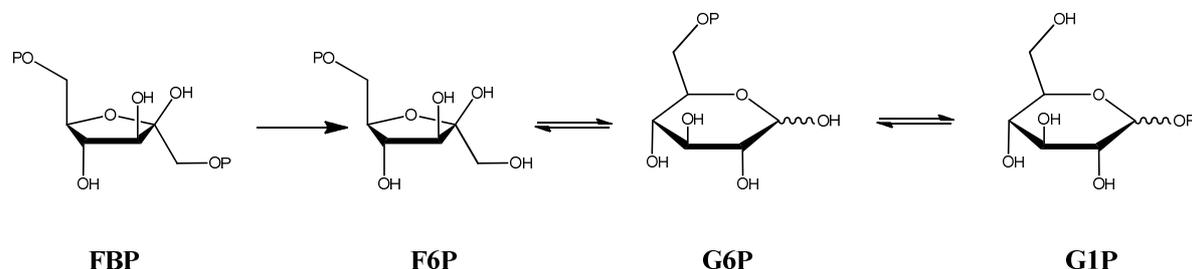
Les réactions dont les implications sont discutées dans ce paragraphe impliquent le remaniement des carbones *via* les trioses phosphates dans les organes secondaires (lieu de formation et du stockage du saccharose et de l'amidon). Le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  sur ces échantillons peut provenir à la fois de processus photosynthétiques (réactions dans la feuille) et de processus post-photosynthétiques (réactions dans les organes hétérotrophes).

Pour étayer les hypothèses évoquées dans ce paragraphe, un glucose provenant de l'amidon de feuille de *Xanthium strumarium* (plante à métabolisme C3) a été analysé. Ce dernier est formé *via* le FBP, dont les précurseurs sont les trioses phosphates formés dans le cycle de Calvin (dans le chloroplaste). L'analyse de cet amidon pourrait apporter des éclaircissements concernant l'implication des réactions photosynthétiques et post-photosynthétiques sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des glucides analysés dans les paragraphes précédents.

### 5 Amidon foliaire

L'amidon formé dans la feuille provient de la formation du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) dans le chloroplaste, lui-même formé à partir des trioses phosphates DHAP et G3P (réaction catalysée par l'aldolase). Une fois le FBP formé, il est déphosphorylé en position 1 par la FBP-phosphatase. Le F6P ainsi formé est isomérisé en G6P, puis ce dernier est

transformé en glucose-1-phosphate par la phosphoglucomutase pour servir à la formation de l'amidon (Figure 65). Les hypothèses qui seront formulées concernant la distribution isotopique intramoléculaire en carbone 13 du glucose d'amidon foliaire se situent donc au niveau des réactions impliquées dans le chloroplaste de la feuille.



**Figure 65. Formation du glucose-1-phosphate, précurseur de l'amidon dans le chloroplaste dans le chloroplaste.** FBP : fructose-1,6-bisphosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; G1P : glucose-1-phosphate.

L'hydrolyse de l'amidon foliaire et la transformation du glucose résultant en TAMAGF (partie expérimentale – paragraphe 7.2) a été effectuée deux fois. Les valeurs des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  reportées dans le Tableau 35 sont la moyenne des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  obtenus sur le TAMAGF provenant de ces deux expériences. La différence des  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  par rapport à la valeur moyenne est également présentée dans le Tableau 35.

**Tableau 35. Ecarts à la valeur globale des déviations isotopiques  $\Delta\delta_i$  ( $^{13}\text{C}$ ) sur chaque site carboné d'un glucose provenant de l'hydrolyse d'amidon foliaire de *Xanthium strumarium*.**

Amidon foliaire	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ Moyen (‰) <sup>a</sup>	3,7	0,2	3,2	4,2	-4,0	-7,2
Ecarts à la moyenne (‰) <sup>b</sup>	0,8	0,8	0,5	0,9	1,0	1,0

<sup>a</sup>L'hydrolyse de l'amidon et la dérivation du glucose résultant en TAMAGF ont été effectuées deux fois.

<sup>b</sup>Différence entre une des deux valeurs obtenues et la valeur moyenne

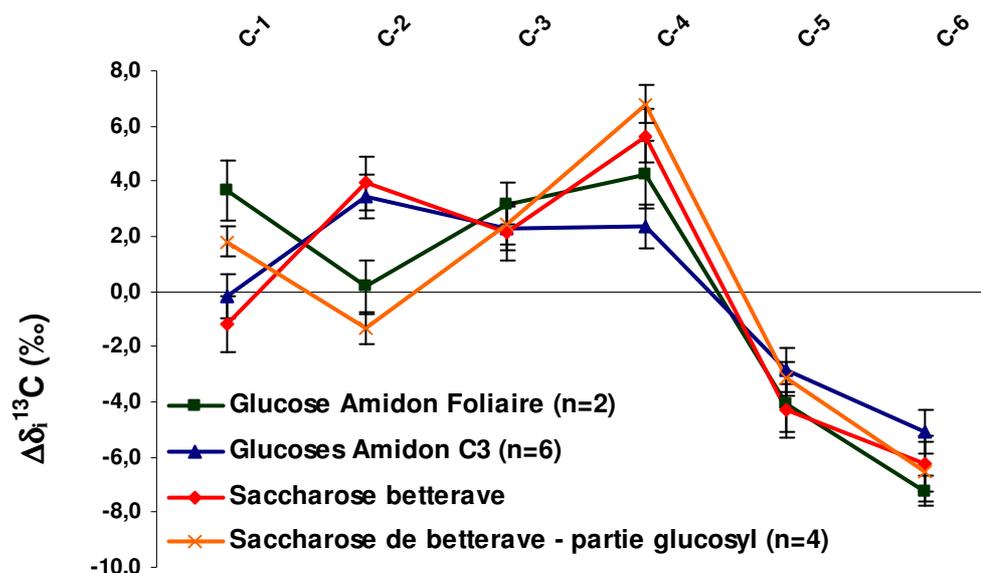
En premier lieu, nous remarquerons l'accord entre les teneurs isotopiques des sites C-3 et C-4 et les valeurs de l'effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  à l'équilibre mesurées par Gleixner *et al.*(1997) [52] lors du clivage du FBP en DHAP et G3P. Ce dernières montrent un effet isotopique normal à l'équilibre dans le sens de la formation des trioses phosphates (FBP enrichi de 3,6‰ et 4,9‰ sur les positions C-3 et C-4, respectivement, par rapport aux trioses phosphates). Les positions C-3 et C-4 du glucose provenant d'amidon foliaire sont enrichies

de 3,2‰ et 4,2‰, respectivement, par rapport à la valeur globale. Ces résultats suggèrent que l'équilibre  $\text{FBP} = \text{G3P} + \text{DHAP}$  est atteint dans le cycle de Calvin.

En théorie, et en négligeant un éventuel effet isotopique lors de l'isomérisation du DHAP en G3P, les positions C-1/C-6 et C-2/C-5 du FBP formé dans le cycle de Calvin devraient avoir la même teneur isotopique (cf. paragraphe 4.4). Ceci n'est pas observé sur l'amidon foliaire et peut être expliqué par un effet isotopique lors de l'isomérisation des trioses phosphates, qui serait responsable de l'enrichissement relatif du C-2 par rapport au C-5 (cf. paragraphe 4.4). Un effet isotopique associé à l'isomérisation des trioses phosphates conduirait néanmoins à un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  du site carboné C-4 plus important que celui observé (Figure 64) et remettrait donc en question l'état d'équilibre de la réaction d'aldolisation des trioses phosphates DHAP et G3P en FBP dans le cycle de Calvin. En revanche, un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à l'isomérisation des trioses phosphates ne peut pas expliquer l'enrichissement relatif important en  $^{13}\text{C}$  de la position C-1 (par rapport à la position C-6) : les carbones C-1 du DHAP et du G3P ne subissent pas de modification chimique suffisamment importante permettant de supposer un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  sur ces positions (cf. paragraphe 4.4).

De plus, l'enrichissement relatif du site carboné C-1 par rapport au site carboné C-6 ne peut pas être expliqué par un enrichissement en C-1 par la voie des pentoses phosphates. En effet, la glucose-6-phosphate est inhibée à la lumière dans le chloroplaste, limitant fortement le flux de glucose empruntant cette voie et donc le fractionnement isotopique associé à cette voie.

En comparant les profils isotopiques en  $^{13}\text{C}$  du glucose d'amidon foliaire avec les saccharoses C3 et les glucoses d'amidon C3 (Figure 66), des similitudes sont observées sur tous les carbones, exceptés les sites carbonés C-1 et C-2 dont les teneurs isotopiques en  $^{13}\text{C}$  semblent « inversées ». De plus, le profil isotopique de l'amidon foliaire est le même que celui de la partie glucosyle du saccharose de betterave (Figure 66).



**Figure 66. Comparaison des écarts à la moyenne des déviations isotopiques  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné d'un glucose provenant de l'hydrolyse d'amidon foliaire de *Xanthium strumarium*, d'amidon C3, d'un saccharose C3 et de la partie glucosyle d'un saccharose de betterave C3.**

Les écarts types reportés sont ceux obtenus lors de la répétabilité d'hydrolyse de l'amidon (paragraphe 2.1 de ce chapitre) pour l'amidon foliaire, ceux obtenus sur six échantillons d'amidons de plantes en C3 (blé et pomme de terre) et quatre échantillons de différents glucoses de betterave et la répétabilité de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur le MADAFP pour le saccharose de betterave).

Un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à la transformation du F6P en G6P dans le chloroplaste de la feuille (réaction catalysée par la phosphoglucose isomérase PGI) pourrait expliquer cette tendance, qui est d'ailleurs retrouvée sur la partie glucosyle du saccharose de betterave (Figure 66). L'enrichissement relatif du C-1 par rapport au C-6 peut donc être expliqué en partie par l'isomérisation du F6P en G6P dans le chloroplaste.

Lors de la formation de l'amidon, le glucose-6-phosphate G6P est transformé réversiblement en glucose-1-phosphate par la phosphoglucomutase, impliquant les carbones C-1 et C-6 du glucose (Figure 65). Un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à cette transformation pourrait conduire à l'enrichissement relatif observé du site carboné C-1 par rapport au site carboné C-6. L'hydrolyse de l'amidon chloroplastique pourrait *a priori* former un glucose exporté appauvri en C-1 (si un effet isotopique normal en  $^{13}\text{C}$  dans le sens Amidon  $\rightarrow$  Glucose est supposé). L'amidon restant pourrait donc être enrichi en C-1 par rapport au glucose exporté. A notre connaissance, aucune étude n'a montré d'effets isotopiques au cours de l'hydrolyse de l'amidon. Cependant, des études sur des méthyl-glucosides ont permis de

mettre en évidence un effet isotopique normal (1,010) sur le site carboné C-1 du glucose associé à la scission de la liaison osidique reliant le glucose au groupement méthyle dans ces composés [109]. A l'opposé, des études *in vivo* chez la pomme de terre ont montré que le fractionnement isotopique  $^{13}\text{C}$  associé à l'hydrolyse de l'amidon étant négligeable [110].

## 6 Conclusion

Les hypothèses formulées dans ce chapitre pour tenter d'expliquer les différences sur les  $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$  sur les glucides analysés ne forment pas une liste exhaustive. Le but de ces travaux n'est pas tant d'expliquer la différence de profil isotopique entre métabolites de stockage ou entre glucides issus de différentes plantes, que de montrer l'apport de la méthodologie mise en place pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  des sucres pour l'étude du métabolisme.

Au début de mes travaux de thèse, les déviations isotopiques site-spécifique sur la molécule d'éthanol semblaient suggérer un impact du mode d'assimilation du  $\text{CO}_2$  (C3, C4 et CAM) sur la distribution interne en  $^{13}\text{C}$  des glucides. Les résultats obtenus sur les glucides (amidon et saccharose) de plantes à métabolisme C3 et C4 montrent que cette affirmation apparaît incomplète, puisque certaines des différences observées pourraient être dues à des réactions qui ne sont pas influencées par le mode d'assimilation du  $\text{CO}_2$ . Parmi les réactions pouvant expliquer les différents profils isotopiques en  $^{13}\text{C}$  observés figurent :

- L'**adolisation** des trioses phosphates en fructose-1,6-bisphosphate, dont le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  peut dépendre de l'état d'équilibre ou non de la réaction ;
- La photorespiration, qui conduirait à des différences de profil isotopique en  $^{13}\text{C}$  entre glucides issus de plantes en C3 (photorespiration importante) et glucides issus de plantes en C4 (photorespiration inexistante)
- La formation et/ou la dégradation de l'**amidon** ;
- L'**isomérisation** (i) des trioses phosphates (DHAP = G3P) et (ii) des hexoses phosphates (F6P = G6P). Pour ces dernières, aucun effet isotopique n'a été déterminé ; une estimation peut cependant être obtenue à l'aide des  $\beta$ -facteurs.

L'isomérisation des oses (hexoses phosphates et trioses phosphates) est d'une importance capitale pour confirmer ou infirmer les hypothèses proposées dans ce chapitre. Cette réaction permettrait d'expliquer non seulement la différence de profil isotopique en  $^{13}\text{C}$  entre la partie glucosyle et la partie fructosyle du saccharose, mais aussi celle entre l'amidon extrait de feuille et les amidons et saccharoses C3. Le chapitre 8 fait l'objet d'une étude

concernant les effets isotopiques en  $^{13}\text{C}$  associés à la réaction transformant le glucose en fructose catalysée par la glucose isomérase.

## 7 Partie expérimentale

### 7.1 Provenance des produits

L'amidon de *Xanthium strumarium* a été fourni par l'Institut de Biotechnologie des Plantes (IBP) d'Orsay (France). L'amyloglucosidase (*Aspergillus niger*) provient de chez Sigma.

### 7.2 Hydrolyse enzymatique de l'amidon et dérivation du glucose obtenu

1 g d'amidon est placé dans 10 mL de solutions tampon acétate (pH = 4,6). Le mélange ainsi obtenu est placé 30 minutes à l'autoclave à 120°C. Le gel obtenu est ensuite dilué avec 10 mL de la solution tampon et le mélange est placé à 60°C en présence de 20 mg d'amyloglucosidase. La réaction est suivie par CCM (Eluant AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O 7:2:1, R<sub>f</sub>(amidon) = 0 et R<sub>f</sub>(glucose) = 0,7) et un test à l'iode. La solution obtenue est filtrée à l'aide d'un fritté sur un lit de 1 cm contenant de la célite et de la silice (63-200 µm). Le filtrat est ensuite évaporé puis coévaporé à l'éthanol absolu. Le rendement est de l'ordre de 95% mais des traces d'eau peuvent être présentes dans le sirop obtenu. Ce dernier est mis en présence d'acétone (30 mL) et d'acide sulfurique (0,5 mL). La réaction est suivie par CCM (cf. chapitre 2 – paragraphe 4.2). Une fois la réaction terminée (environ 16 heures), une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> est ajoutée pour neutraliser l'acide sulfurique. Le milieu réactionnel est évaporé à l'évaporateur rotatif pour éliminer l'acétone. Le résidu est repris dans 50 mL d'eau distillée et extrait avec 2 x 25 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 50 mL d'eau distillée, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées à l'évaporateur rotatif. Le rendement en DAGF est de l'ordre de 60% à 70% de l'amidon. Le MAGF est ensuite obtenu à l'aide du protocole décrit dans le chapitre 2 – paragraphe 4.2.2. Le TAMAGF est ensuite obtenu par acétylation, purifié sur colonne chromatographique de gel de silice et recristallisé dans l'éther de pétrole (cf. Chapitre 4 – paragraphe 6.3).

### 7.3 Analyse RMN $^{13}\text{C}$ et SMRI

Les mesures RMN  $^{13}\text{C}$  des dérivés TAMAGF et MADAFP sont effectuées en suivant le protocole décrit dans le chapitre 4. Les mesures SMRI ont été effectuées en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2

# Chapitre 8 - Détermination des effets isotopiques en $^{13}\text{C}$ associés à la transformation du glucose en fructose par la glucose isomérase

## 1 Introduction

L'isomérisation de deux composés glucidiques est un processus primordial dans le métabolisme animal ou végétal. Dans le métabolisme végétal, ce type de réaction a lieu dans le cycle de Calvin (DHAP=G3P, G6P=F6P, R5P=Ru5P), lors de la glycolyse (DHAP=G3P) et dans la voie des pentoses phosphates (R5P=Ru5P).

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les distributions isotopiques intramoléculaires en  $^{13}\text{C}$  des glucides peuvent être différentes selon le type de plante considéré. Les résultats obtenus sur les glucides (amidon, saccharose) de différentes origines suggèrent un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  de la triose phosphate isomérase (TPI) et de la phosphoglucose isomérase (PGI). Le calcul des  $\beta$ -facteurs permet de prédire un effet isotopique en carbone 13 à l'équilibre lors de l'isomérisation de trioses phosphates et des hexoses phosphates (cf. Chapitre 7 – paragraphe 4.4). Cependant, la mesure de l'effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à ces transformations n'a jamais été effectuée.

Le but de ce chapitre est de déterminer les effets isotopiques en  $^{13}\text{C}$  associés à la transformation du glucose en fructose, en utilisant la méthodologie mise en place dans le chapitre 4. Dans un premier temps, la méthode d'obtention du dérivé du glucose doit être reconsidérée afin d'obtenir un produit suffisamment pur pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique. Ensuite, les effets isotopiques en  $^{13}\text{C}$  associés à l'équilibre glucose=fructose et les effets isotopiques cinétiques lors de la transformation du fructose en glucose seront déterminés. Enfin, les hypothèses concernant la source de ces effets isotopiques et l'implication de ceux-ci vis-à-vis des résultats obtenus dans le chapitre 7 seront discutées.

## 2 Nécessité d'adaptation de la méthode aux matrices étudiées

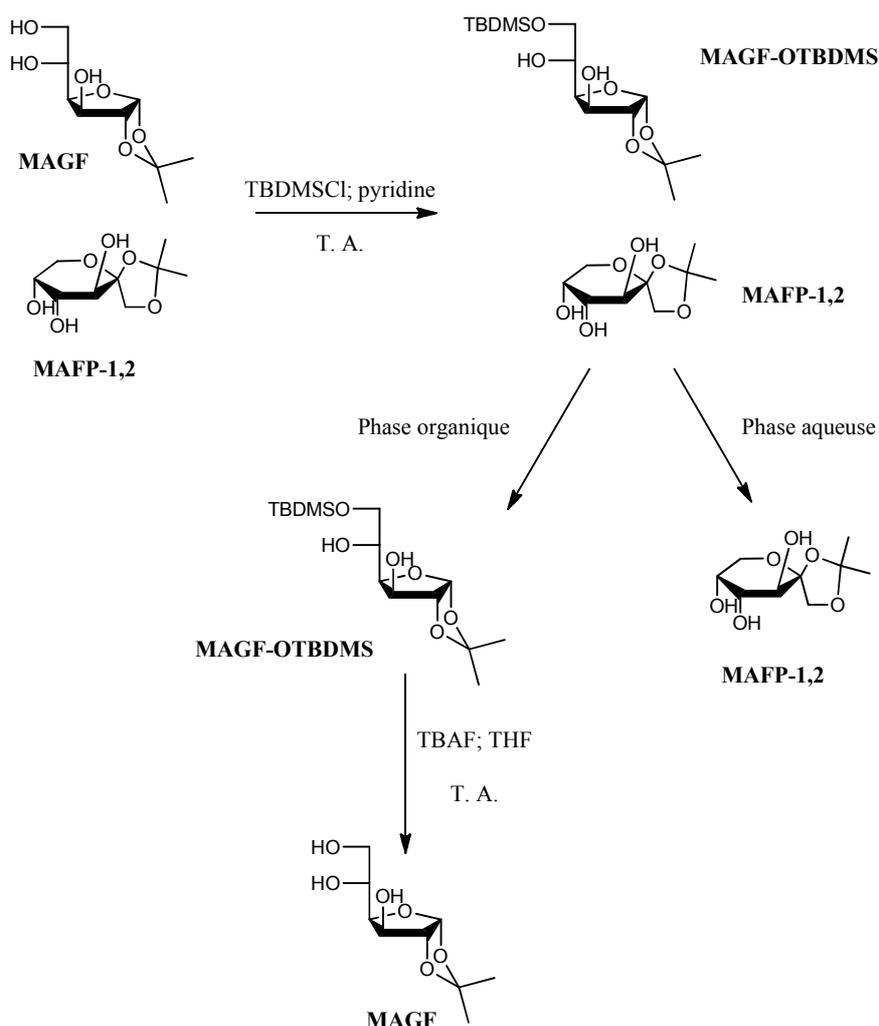
### 2.1 Introduction

Un des points importants lors de la mise en place de cette étude concernant les effets isotopiques associés à l'isomérisation du glucose en fructose a été la prise en compte des temps de mesure RMN  $^{13}\text{C}$  des composés étudiés. La durée pour une mesure sur le dérivé du fructose MADAFP, est de 30 heures pour 1 échantillon. Dès lors, nous avons choisi le dérivé du glucose (TAMAGF) comme molécule de travail (10 heures par échantillon pour une mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique).

La formation du sous-produit issu du fructose (DAFP-1,2) lors de la première étape (Chapitre 2 – paragraphe 2.5) pose problème au niveau de l'obtention des produits pour l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique. Une fois formé, ce composé est hydrolysé lors de l'étape d'hydrolyse à l'acide acétique, puis acétylé par l'anhydride acétique. Autrement dit, le DAFP-1,2 a le même cheminement lors de dérivation que le glucose transformé en TAMAGF. Les deux composés (TAMAGF et TAMAFP-1,2) sont donc présents dans l'échantillon à mesurer (rappelons que nous serons amenés à travailler sur la sonde glucose). Ces derniers ne sont pas séparables par colonne chromatographique. De plus, en trop grande proportion dans le produit final, le TAMAFP-1,2 empêche la recristallisation du TAMAGF et le produit n'est donc plus exploitable pour la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique (diminution trop importante du rapport signal sur bruit). La proportion finale de TAMAFP-1,2 dans la fraction contenant le TAMAGF varie en fonction de la proportion en eau dans le produit de départ et de la proportion de fructose par rapport au glucose de départ. Dans la mesure où des expériences sont planifiées sur un mélange qui peut contenir jusqu'à 90% de fructose par rapport au glucose, et où la proportion en eau dans les matrices contenant les sucres à dériver (glucose + fructose) peut être importante (jusqu'à 10%), il est absolument nécessaire de trouver un procédé permettant d'éliminer ce sous produit.

### 2.2 Choix du protocole pour l'obtention du MAGF pur

L'élimination du sous-produit issu du fructose peut se faire après la deuxième étape (après l'extraction liquide-liquide permettant l'obtention du MAGF et MAFP-1,2 en mélange). Pour éliminer le sous-produit issu du fructose (MAFP-1,2) à cette étape, une silylation sélective de l'alcool primaire du MAGF (situé sur le C-6) avec le chlorure de tert-butyl-diméthylsilyl (TBDMSCl) a été envisagée (Figure 67).



**Figure 67. Schéma du protocole pour l'isolement du MAGF à partir d'un mélange MAFP-1,2 + MAGF.** TBDMSCl : « Tert-butyldiméthylsilyl chloride » ; TBAF : « Tétrabutylammonium Fluoride » ; THF : tétrahydrofurane ; T. A. : température ambiante.

Cet agent de dérivation a pour avantage d'être sélectif des alcools primaires [111] : le MAFP-1,2 ne serait donc pas *a priori* dérivé par cet agent. L'isolement du MAGF pourrait alors être effectué. Après séparation des deux composés (MAGF-OTBDMS et MAFP-1,2) par extraction liquide-liquide, le dérivé du glucose peut être déprotégé sélectivement en C-6 par action du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) dans le tétrahydrofurane (THF).

En premier lieu, afin de vérifier la sélectivité de la silylation, celle-ci a été effectuée sur un mélange modèle de MAGF + MAFP-1,2 en proportion 20:80 (w:w). Le rendement final en MAGF est de 90% par rapport au MAGF de départ en utilisant le protocole décrit Figure 67. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du MAGF ainsi formé montre la présence du MAFP-1,2 résiduel à environ 2%. Pour s'assurer que cette méthode pour l'isolement du MAGF est bien applicable

dans le cas d'une étude sur la teneur isotopique en  $^{13}\text{C}$  des produits formés, une expérience a été réalisée en portant le rendement de silylation du MAGF commercial à 50%. Le MAGF-OTBDMS formé a ensuite été totalement hydrolysé en MAGF (TBAF/THF ; Figure 67) et transformé ensuite en TAMAGF (cf. paragraphe 6.4). Les déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  du TAMAGF ainsi obtenu ont été comparées avec celles du TAMAGF obtenu par acétylation directe du MAGF commercial (TAMAGF de référence ; Tableau 36). Aucun fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  n'est observé ; nous pouvons donc utiliser cette méthode d'isolement pour la suite de l'étude.

**Tableau 36. Déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  sur chaque site carboné du TAMAGF obtenu après silylation sélective du MAGF commercial à 50% et sur le TAMAGF de référence (TAMAGF ref.) obtenu par acétylation du même MAGF commercial.**

TAMAGF	Site carboné					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) Rdt = 50%	-20,0	-23,6	-23,6	-25,0	-27,7	-29,5
$\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) TAMAGF ref.	-20,8	-22,2	-23,9	-24,7	-29,0	-28,8

### 3 Résultats : effets isotopiques d'équilibre et cinétique associés à la glucose isomérase

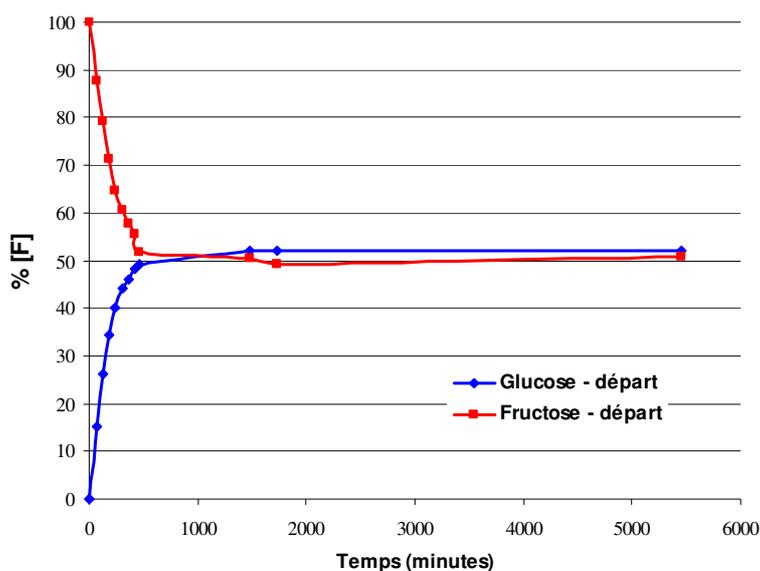
#### 3.1 Hypothèse préliminaire

Comme mentionné dans le paragraphe 2.1, la molécule de travail choisie est le glucose. Lors des réactions d'isomérisation du glucose en fructose, les valeurs de la déviation isotopique globale  $\delta_g^{13}\text{C}$  du glucose restant, nécessaires pour la détermination des déviations isotopiques  $\delta_i^{13}\text{C}$  par RMN  $^{13}\text{C}$ , peuvent être obtenues après déprotection du MAGF en glucose en utilisant une résine échangeuse de cations  $\text{H}^+$ . Cependant, ces valeurs ne sont pas encore connues, et la déprotection du MAGF en glucose n'a pas été complètement évaluée en terme de fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$ . Nous estimerons donc dans un premier temps que lors de l'isomérisation du glucose en fructose, le carbone C-4 (le plus éloigné des sites carbonés susceptibles de subir un effet isotopique en  $^{13}\text{C}$ ) ne subit pas d'effet isotopique notable en  $^{13}\text{C}$ . La déviation isotopique globale sur la molécule de glucose, utilisée pour

l'obtention des déviations isotopiques site-spécifique par RMN<sup>13</sup>C du TAMAGF, est donc obtenue théoriquement en utilisant cette hypothèse. Cette approche est celle développée par Singleton (1995) [112] et est utilisé pour l'étude de déterminations d'effets isotopiques par RMN <sup>13</sup>C [109, 112].

### 3.2 Cinétique de la réaction d'isomérisation

La cinétique de la réaction d'isomérisation du glucose en fructose à 60°C (cf. partie expérimentale – paragraphe 6.3) a été déterminée par HPLC en effectuant des prélèvements du milieu tout au long de cette réaction. Deux suivis de cinétique ont été effectués : l'un en utilisant le glucose comme molécule de départ (« Glucose – départ ») et l'autre en utilisant le fructose comme molécule de départ (« Fructose – départ »). Les valeurs de la composition en fructose par rapport à la somme des concentrations totales en fructose et glucose (% [F]) en fonction du temps sont représentés sur la Figure 68.



**Figure 68. Evolution du pourcentage de fructose % [F] en fonction du temps lorsque la glucose isomérase est mise en présence de glucose (« Glucose – départ ») ou de fructose (« Fructose – départ »).**

A l'équilibre, la fraction molaire de fructose (% [F]) est de 50% à 60°C ce qui est cohérent avec les données issues de la littérature [113].

### 3.3 Détermination de l'effet isotopique à l'équilibre

L'effet isotopique d'équilibre en  $^{13}\text{C}$  a été déterminé en analysant le TAMAGF du glucose provenant de quatre expériences:

- isomérisation du glucose commercial de référence par la glucose isomérase, au bout de 3 jours (« glucose 1 ») ou 7 jours (« glucose 2 ») de réaction ;
- isomérisation du fructose commercial de référence par la glucose isomérase, au bout de 3 jours (« fructose 1 ») ou 7 jours (« fructose 2 ») de réaction ;

Le calcul de l'effet isotopique à l'équilibre (exprimé en ‰) a été effectué selon l'équation :

$$EIE = \left( \frac{R_{F,\text{éq}}}{R_{G,\text{éq}}} - 1 \right) \times 1000 = \frac{{}^{12}K}{{}^{13}K} \quad (34)$$

$R_{G,\text{éq}}$  et  $R_{F,\text{éq}}$  : rapports isotopiques en  $^{13}\text{C}$  du glucose et du fructose à l'équilibre, respectivement.

Le rapport isotopique en  $^{13}\text{C}$  pour chaque site carboné du glucose à l'équilibre est déterminé grâce aux déviations isotopiques du TAMAGF (mesurées par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique) par l'équation :

$$R_i^{13}\text{C} = \left( \frac{\delta_i^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right) \times R_{\text{PDB}} \quad (35)$$

$R_{\text{PDB}}$  : rapport isotopique de la référence internationale en  $^{13}\text{C}$  ( $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$ ) ;

$R_i^{13}\text{C}$  : rapport isotopique en  $^{13}\text{C}$  sur le site carboné  $i$  ;

$\delta_i^{13}\text{C}$  : déviations isotopique en  $^{13}\text{C}$  sur le site carboné  $i$  donnée par la RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique.

Le rapport isotopique en  $^{13}\text{C}$  du fructose à l'équilibre a été déterminé comme suit :

$$R_{iF,\text{éq}} = \frac{R_{iF,0} - f_G R_{iG,\text{éq}}}{1 - f_G} \quad (36)$$

$f_G$  : fraction molaire de glucose à l'équilibre déterminée par HPLC ( $f_G = 0,50$  pour les quatre expériences);

$R_{iF,0}$  : rapport isotopique sur le site carboné  $i$  du fructose de départ (déterminée par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur le dérivé du fructose MADAFP) ;

$R_{iG,\text{éq}}$  : rapport isotopique sur le site carboné  $i$  du glucose à l'équilibre (déterminée par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur le dérivé du glucose TAMAGF).

Les résultats des quatre expériences sont regroupés dans le Tableau 37.

**Tableau 37. Effets isotopiques d'équilibre (EIE) exprimés en ‰ sur chaque site carboné du glucose lors d'un équilibre fructose-glucose établi par la glucose isomérase. Deux expériences ont été effectuées pour chaque sucre de départ (glucose et fructose). Les  $\beta$ -facteurs calculés pour cet équilibre sont aussi présentés.**

EIE = $^{12}\text{K}/^{13}\text{K}^a$		Site carboné					
Expérience	Durée	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<b>Fructose 1</b>	3 jours	-14,0	10,4	-2,7	0,0	-4,5	4,6
<b>Fructose 2</b>	7 jours	-17,9	6,2	-3,8	0,0	-6,3	4,6
<b>Glucose 1</b>	3 jours	-9,5	4,8	0,9	0,0	-1,7	3,2
<b>Glucose 2</b>	7 jours	-10,4	6,0	2,2	0,0	-0,4	2,9
<b>Moyenne (‰)</b>		<b>-12,9</b>	<b>6,8</b>	<b>-0,9</b>	<b>0,0</b>	<b>-3,2</b>	<b>3,8</b>
Ecart type (‰)		3,8	2,5	2,8	0,0	2,6	0,9
<b><math>\beta</math>-facteurs</b>		<b>-20,9</b>	<b>20,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

<sup>a</sup>Effets isotopiques calculés dans le sens de la formation du glucose

Des effets isotopiques d'équilibre inverse (-12,9‰) et normal (6,8‰) contre le  $^{13}\text{C}$  sont mesurés sur les sites carbonés C-1 et C-2 respectivement, dans le sens de la formation du glucose. Un effet isotopique plus faible est également observé sur le site C-6 (3,8‰).

La moyenne de l'EIE ( $^{12}\text{K}/^{13}\text{K}$ ) calculée pour ces quatre expériences sur chaque site carboné du glucose est aussi indiquée dans le Tableau 37, ainsi que les écarts types sur les quatre déterminations. L'écart type maximal est de 3,8‰ sur le C-1. Cet écart type important pourrait être expliqué par un biais sur la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique du dérivé du fructose MADAFP, ce qui expliquerait la divergence observée entre les valeurs des EIE obtenues à partir du fructose et celles obtenues à partir du glucose (écarts pouvant aller jusqu'à 8,4‰). La tendance observé sur les EIE est cependant la même (enrichissement du site carboné C-1 et appauvrissement du site carboné C-2 du glucose), quelque soit le substrat de départ.

Les valeurs des EIE pour les réactions de 3 ou 7 jours ne sont pas différentes sur le substrat glucose (« glucose 1 » et « glucose 2 »), suggérant que l'équilibre isotopique en  $^{13}\text{C}$  est atteint au bout de 3 jours. En revanche, des écarts de 4‰ sont obtenus sur les deux valeurs des EIE lorsque le fructose est utilisé comme substrat (« fructose 1 » et « fructose 2 »). Le fait de travailler sur deux produits différents (MADAFP pour le fructose de départ et TAMAGF pour le glucose à l'équilibre), et d'utiliser la valeur de  $\delta_i^{13}\text{C}$  du site carboné C-4 comme

référence est une explication probable de cette variation.

Les valeurs des EIE mesurées sur les sites carbonés C-3 et C-5 du glucose à l'équilibre en utilisant le fructose comme substrat suggèrent plutôt une erreur dans la détermination des effets isotopiques (comme expliqué plus haut) que l'existence d'effets isotopiques en tant que tels.

### 3.4 Détermination de l'effet isotopique cinétique lors de la transformation du fructose en glucose

Pour déterminer les effets isotopiques cinétiques associés à la transformation du fructose en glucose, le fructose commercial de référence a été mis en présence de la glucose isomérase et la réaction arrêtée au bout de une à deux heures. L'effet isotopique cinétique en  $^{13}\text{C}$  lors d'une telle expérience peut être calculé comme suit :

$$\frac{{}^{12}k}{{}^{13}k} = \frac{\ln(1-f_G)}{\ln\left[1 - \left(\frac{f_G \times R_{G,t}}{R_{F,0}}\right)\right]} \quad (37)$$

$f_G$  : facteur d'avancement de la réaction ( $=[\text{Glucose}]/([\text{Fructose}]+[\text{Glucose}])$ ) déterminé par HPLC (partie expérimentale – paragraphe 6.2) ;

$R_{G,t}$  : rapport isotopique site-spécifique en  $^{13}\text{C}$  du glucose au temps t, déterminé par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur le dérivé du glucose TAMAGF ;

$R_{F,0}$  : rapport isotopique site-spécifique en  $^{13}\text{C}$  du fructose de départ déterminé par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique sur le dérivé du fructose MADAFP).

Les effets isotopiques cinétiques en  $^{13}\text{C}$  calculés pour trois réactions à différents taux d'avancement ( $f_G$ ) sont regroupés dans le Tableau 38.

Un effet isotopique cinétique en  $^{13}\text{C}$  important sur le site carboné C-2 (18,5‰) est mesuré. Des effets isotopiques plus faibles sont observés sur les sites C-1 et C-6 (effets isotopiques de 6,9‰ et 8,6‰, respectivement). Les écarts types sur trois expériences sont satisfaisants compte tenu de la précision de la méthode RMN  $^{13}\text{C}$  et des biais qui peuvent être apportés lors de la mesure (cf. paragraphe 3.3).

**Tableau 38. Effet isotopique cinétique exprimé en ‰ sur chaque site carboné du glucose lors de la transformation partielle du fructose en glucose par la glucose isomérase.**

EIC = $^{12}\text{k}/^{13}\text{k}^{\text{a}}$	Site carboné					
	$f_{\text{G}}$ (%)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
17,7	8,8	19,1	3,2	0,0	3,6	8,6
20,8	8,1	21,0	2,8	0,0	2,3	9,6
29,1	4,0	15,3	1,1	0,0	-1,0	7,5
<b>EIC Moyen (‰)</b>	<b>6,9</b>	<b>18,5</b>	<b>2,4</b>	<b>0,0</b>	<b>1,6</b>	<b>8,6</b>
<b>Ecart type (‰)</b>	2,6	2,9	1,1	0,0	2,4	1,1

<sup>a</sup>Effets isotopiques calculés dans le sens de la formation du glucose

## 4 Discussion et implications des effets isotopiques observés

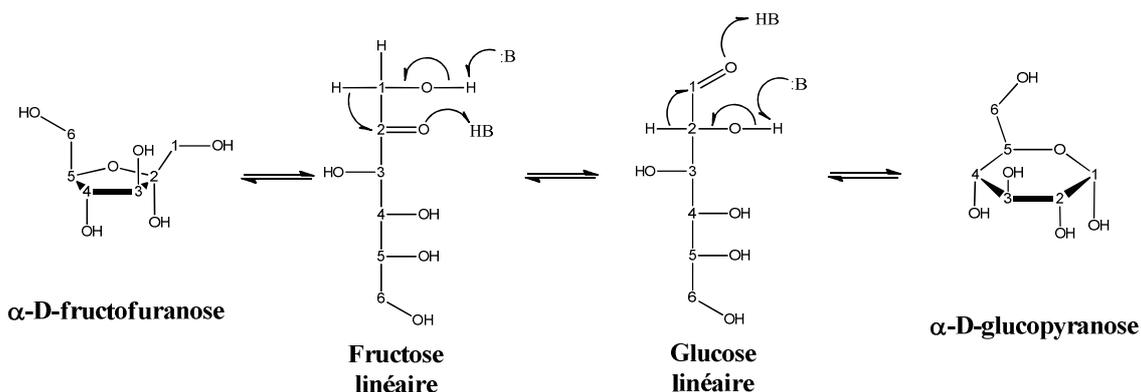
Les effets isotopiques en  $^{13}\text{C}$  à l'équilibre suivent la même tendance que les valeurs obtenues avec les  $\beta$ -facteurs (1,020 et 0,98 pour les C-1 et C-2 respectivement, dans le sens de la formation du fructose). Cette tendance se retrouve sur les saccharoses de canne et de betterave. Dans le saccharose de betterave, la différence de  $\delta_i^{13}\text{C}$  entre la partie fructosyle et la partie glucosyle est de 10,6‰ sur le C-2 et -5,9‰ sur le C-1. Dans le saccharose de canne elle est de 10,3‰ sur le C-2 et -5‰ sur le C-1 (cf. chapitre 7 – paragraphe 4.2). Les effets isotopiques à l'équilibre mesurés dans le paragraphe 3.3 sont plus importants sur le site carboné C-1 (12,9‰) et plus faibles sur le site carboné C-2 (6,8‰) des saccharoses. La différence entre le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  observé sur les groupements fructosyle et glucosyle des saccharoses (betterave et canne) et l'effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  lors de la transformation du glucose en fructose mesuré à l'équilibre suggère :

- que l'effet isotopique cinétique contribue à l'effet isotopique apparent ; c'est-à-dire que la réaction d'isomérisation des hexoses phosphates n'est pas à l'équilibre dans la plante avant la formation du saccharose ;
- que la phosphoglucose isomérase, responsable du fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  entre les groupements fructosyle et glucosyle du saccharose n'a pas la même

discrimination isotopique en  $^{13}\text{C}$  que la glucose isomérase que nous avons utilisée ;

- que l'effet isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à l'hydrolyse du saccharose par l'invertase [59] dans la plante provoque un enrichissement sur le site carboné C-2 du saccharose restant (= saccharose analysé).

L'effet isotopique cinétique en  $^{13}\text{C}$  mesuré sur le site carboné C-2 indique que le carbone 2 du fructose de départ est impliqué dans l'étape limitante. Celle-ci pourrait être le transfert d'hydrure [114], ou l'ouverture du cycle [115] (Figure 69). L'effet isotopique cinétique en  $^{13}\text{C}$  mesuré sur le site carboné C-6 (8,6‰) est plus difficile à expliquer, étant donné que ce carbone n'est impliqué ni dans l'ouverture du cycle, ni dans l'isomérisation en elle-même. Il est possible que cet atome interagisse avec le site actif de l'enzyme d'une manière non covalente, et que cette interaction induise une discrimination entre les isotopomères. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des calculs théoriques.



**Figure 69. Etapes principales de la transformation réversible du fructose en glucose par la glucose isomérase (d'après Fenn *et al.* (2004) [116]).**

**B:** : accepteur de protons

**BH:** : donneur de protons

Cette étude montre que le passage du fructose en glucose n'est pas négligeable d'un point de vue isotopique. Le fait que le glucose et le fructose soient impliqués dans différentes voies métaboliques (la voie de pentoses phosphates pour le glucose et la glycolyse pour le fructose, par exemple) implique que les produits formés par ces voies vont être porteurs du fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à la réaction d'isomérisation des hexoses phosphates. Une étude plus approfondie est nécessaire pour comprendre l'effet isotopique en C-6 et pour déterminer l'impact de l'effet isotopique associé à la mutarotation sur les mesures effectuées.

## 5 Conclusion

Les effets isotopiques d'équilibre et cinétique lors de la transformation du fructose en glucose par la glucose isomérase ont été déterminés. Un effet isotopique d'équilibre de -12,9‰, 6,8‰ sur les sites C-1 et C-2 dans le sens fructose → glucose, respectivement, ont été mesurés. L'apport de la RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative associée à la méthodologie mise au point lors de ces travaux de thèse permet de mettre en évidence des effets isotopiques qui n'auraient pas pu être déterminés par SMRI. En effet, la déviation isotopique globale du glucose à l'équilibre lors de cette réaction est *a priori* la même que celle du fructose. Dès lors, la valeur de l'effet isotopique global en  $^{13}\text{C}$  mesuré par SMRI aurait été atténuée par l'existence d'un effet normal et d'un effet inverse.

L'effet isotopique cinétique en  $^{13}\text{C}$  est important sur le C-2 : (18,5‰ dans le sens frc → glc), suggérant que l'étape limitante du processus de transformation implique le C-2 du fructose. Cependant, l'origine de l'effet isotopique cinétique en  $^{13}\text{C}$  de 8,6‰ sur le site carboné C-6 reste à élucider.

Les effets isotopiques déterminés ici ne peuvent pas strictement être reliés aux isomérisations des oses (trioses, pentoses, hexoses) qui s'effectuent dans la plante. D'une part, certains glucides (et notamment les trioses phosphates) ne peuvent pas exister sous forme cyclique, limitant ainsi le fractionnement isotopique potentiel associé à l'ouverture/fermeture des cycles. D'autre part, l'enzyme utilisée par les plantes pour l'isomérisation des hexoses (phosphoglucose isomérase) n'est pas la même que celle que nous avons utilisée (Glucose Isomérase) et n'utilise pas les mêmes substrats (hexoses phosphorylés sur la position C-6 dans la plante) ; il est donc possible que le fractionnement isotopique  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  soit différent dans la plante (*in vivo*) de celui mesuré *in vitro* dans ce chapitre. Cependant, cette première étude montre clairement que l'isomérisation a un impact sur la distribution isotopique intramoléculaire des sucres et, potentiellement, sur celle des produits dont ils sont les précurseurs.

## 6 Partie expérimentale

### 6.1 Produits utilisés

La solution de fluorure de tétrabutylammonium TBAF en solution à 1 M dans le tétrahydrofurane THF a été obtenue par Alfa-Aesar. Le chlorure de tert-butyldiméthylsilyle TBDMSCl a été fourni par Sigma. L'enzyme utilisée est une glucose isomérase (EC 5.3.1.5) de *Streptomyces murinus* immobilisée. Elle a été fournie par Sigma.

## 6.2 Expériences Chromatographie Liquide Haute Performance

La détermination de la concentration en glucose et fructose dans les milieux réactionnels a été effectuée par Chromatographie en phase Liquide Haute Performance, équipée d'une colonne Phenomenex NH<sub>2</sub> (Luna 250 x 4,6 mm ; 5 μm), d'un détecteur à indice de réfraction Agilent 1100 Series, d'une pompe isocratique HP 1050 Series et d'une boucle d'injection de 20 μL. L'éluant utilisé est un mélange acétonitrile/eau (80/20 v:v) avec un débit de 2 mL/minute. La colonne est thermostatée à 40°C. Dans ces conditions, les temps de rétention du glucose et du fructose sont de 4,9 minutes et 4,0 minutes, respectivement. Une courbe d'étalonnage a été effectuée pour une gamme de concentrations en glucose et fructose de 0 à 50 mg/L. Les coefficients de distribution R<sup>2</sup> obtenus sont de 0,9981 et 0,9977 pour le glucose et le fructose, respectivement.

## 6.3 Réaction enzymatique

Le milieu pour la réaction du glucose et du fructose catalysée par la glucose isomérase est préparé comme suit : dans 500 mL d'eau distillés sont dissous 1,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Le pH de la solution ainsi obtenue est ajusté à 7,5 par ajout de NaHCO<sub>3</sub>.

Dans 100 mL du milieu préalablement préparés sont dissous 17 g de sucre (glucose ou fructose). Le mélange est porté à 60°C au bain-marie pendant 30 minutes et 400 mg de glucose isomérase sont alors ajoutés. L'arrêt de la réaction est effectué en filtrant le mélange sur filtre 0,22 μm.

Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif, puis coévaporé à l'éthanol jusqu'à l'obtention d'un sirop. Ce dernier est mis en présence d'acétone (200 mL) et d'acide sulfurique (3 mL) sous forte agitation à température ambiante pour la première étape de dérivation. La réaction est suivie par CCM (cf. chapitre 4 – paragraphe 6.2). Une fois la réaction terminée (environ 16 heures), une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> est ajoutée pour neutraliser l'acide sulfurique. Le milieu réactionnel est évaporé à l'évaporateur rotatif pour éliminer l'acétone. Le résidu est repris dans 50 mL d'eau distillée et extrait avec 2 x 25 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 50 mL d'eau distillée, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées à l'évaporateur rotatif. Le rendement en DAGF est de l'ordre de 60 à 70% du produit brut. Le produit est ensuite traité comme décrit dans le chapitre 2 – paragraphe 4.2.2 , jusqu'à l'obtention du mélange MAGF + MAFP-1,2 sous forme de poudre blanche.

## 6.4 Dérivation – étape de silylation

La poudre obtenue à l'étape précédente (MAGF + MAFP-1,2) est séchée au dessiccateur contenant du  $P_2O_5$  pendant une nuit sous vide. Le produit est alors dissous dans la pyridine (2 mL/g de produit) et 1,2 éq. de TBDMSCl sont ajoutés. La proportion de MAGF par rapport au MAFP-1,2 pour la détermination de la masse de TBDMSCl à ajouter est estimée par rapport à la proportion de glucose par rapport au fructose de départ. Pour les réactions arrêtées à environ 1 heure (détermination de l'effet isotopique cinétique), la proportion de MAGF par rapport au MAFP-1,2 est estimée à 50% du mélange. Pour les réactions à l'équilibre, elle est estimée à 70% du mélange. La réaction est suivie par CCM (Eluant Cyclohexane/AcOEt 1:1). Elle est arrêtée lorsque la totalité du MAGF a disparu (environ 3 heures). Le milieu réactionnel est alors évaporé puis coévaporé au toluène pour éliminer la pyridine. 100 mL d'eau distillée sont alors ajoutés et le MAGF-OTBDMS est extrait par 2 x 50 mL de dichlorométhane. La phase aqueuse contient le MAFP-1,2 alors que la phase organique contient le MAGF-OTBDMS (vérifié par CCM ; éluant Cyclohexane/AcOEt 1:1).

Les phases organiques rassemblées sont ensuite lavées par 100 mL d'une solution de HCl à 0,1 M, séchées sur  $MgSO_4$ , filtrées puis évaporées à l'évaporateur rotatif.

L'huile translucide obtenue est mise en présence de 10 mL de TBAF à 1 M dans le THF pour déprotéger le MAGF-OTBDMS. La réaction est suivie par CCM (Eluant Cyclohexane/AcOEt 1:1). Au bout de 2 heures, tout le MAGF-OTBDMS est hydrolysé en MAGF. 100 mL d'eau distillée sont ajoutés au milieu réactionnel et les traces éventuelles de MAGF-OTBDMS sont éliminées par extraction avec 2 x 50 mL de dichlorométhane. La phase aqueuse contenant le MAGF est évaporée à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un sirop. Le MAGF doit ensuite être purifié pour éliminer les traces de TBAF et de TBDMSH éventuelles restantes : l'huile obtenue à l'étape précédente est reprise dans un mélange AcOEt/EtOH 95 :5 et le mélange obtenu est déposé sur une colonne chromatographique de gel de silice (63-200  $\mu m$  ; 70 g) préalablement conditionnée avec le mélange AcOEt/EtOH 95 :5. L'élution s'effectue avec un éluant AcOEt/EtOH 95 :5. Les fractions sont récoltées, évaporées à l'évaporateur rotatif et le MAGF obtenu est alors séché une nuit au dessiccateur sous  $P_2O_5$  sous vide avant d'être acétylé en TAMAGF (cf. chapitre 4 - paragraphe 6.3.1).

Ce dernier est purifié par une colonne chromatographique de gel de silice et une recristallisation dans l'éther de pétrole (cf. chapitre 4 ; - paragraphe 6.3.3).

## 6.5 Analyse RMN $^{13}\text{C}$

Les mesures RMN  $^{13}\text{C}$  du dérivé TAMAGF sont effectuées en suivant le protocole décrit dans le chapitre 4 – paragraphe 6.5. Les échantillons de TAMAGF peuvent contenir une proportion de sous-produit issu de la dérivation du fructose (TAMAFP-1,2) de l'ordre de 0,5%. Rappelons que, dans ces proportions, ce sous produit n'est pas pénalisant pour la mesure RMN  $^{13}\text{C}$ .

## CONCLUSION GENERALE

La RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique nécessite la prise en compte de nombreuses exigences (pureté des échantillons, propriétés intrinsèques des échantillons). Celles-ci sont parfois difficiles à atteindre, ce qui est d'autant plus vrai que le nombre d'étapes de la transformation de l'échantillon à analyser est grand. Nous avons dû faire face à différents problèmes lors de la mise en place de la méthodologie pour l'analyse des sucres par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique (échange H/D ; sous-produit(s) ; déformation des raies). Ces problèmes s'appliquent non seulement à nos molécules dérivées mais aussi à tout produit susceptible de montrer les mêmes propriétés, et leur étude est une contribution à l'avancement de la technique RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique.

Les études menées sur les différents produits (éthanol, fructose, glucose, saccharose) montrent une bonne cohérence globale (filiation isotopique lors de la transformation des sucres en éthanol). La RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique apparaît comme étant un outil adapté à la filiation isotopique, si les problèmes inhérents à l'analyse de chaque molécule analysée par RMN  $^{13}\text{C}$  sont compris.

Pour résumer, les travaux se présentent principalement sous deux volets : (i) apport méthodologique et (ii) application de la méthodologie développée. Au sein de ces deux volets, ma contribution peut être résumée comme suit :

### ① Apport méthodologique

Lors de la mise au point de la méthodologie d'analyse du glucose, du fructose et du saccharose, par RMN  $^{13}\text{C}$ , nous avons pu mettre en évidence :

- La détermination de la teneur isotopique sur chaque site carboné des molécules de glucose, fructose et saccharose, par RMN  $^{13}\text{C}$ . La précision de cette technique avec les molécules dérivées étudiées est de l'ordre de 1‰, ce qui est satisfaisant par rapport aux attentes de cette technique dans les conditions de rapport signal sur bruit obtenues ( $S/B > 700$ ). Le fractionnement isotopique est estimé comme étant négligeable lors des différentes étapes conduisant à la formation des dérivés à analyser.

- Des effets isotopiques  $H \rightleftharpoons D$  sur le déplacement chimique en RMN  $^{13}C$ . Cet effet est effectif sur les carbones en  $\beta$  et en  $\gamma$  des hydrogènes/deutériums échangés. Ce phénomène est d'une importance capitale dans la mesure où les solvants deutérés, utilisés comme substance de lock, contiennent pour la plupart des traces de HDO et  $D_2O$ . Ces dernières peuvent provoquer un dédoublement des pics d'intérêt et fausser ainsi la mesure effectuée.
- Des effets associés à la déformation des pics et leur correction avec un mode de lissage adapté. Cette étude nécessite des travaux plus approfondis pour comprendre les raisons de la déformation de ces pics (problèmes de shims, échange de conformères, etc.)

## ② Apport de la technique RMN $^{13}C$ et de la méthodologie d'analyse des $\delta_i^{13}C$ des sucres pour l'étude du métabolisme végétal

Grâce à la RMN  $^{13}C$  isotopique appliquée aux éthanols et aux sucres, via la méthodologie présentée dans cette thèse, nous avons pu montrer :

- Des variations de la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}C$  des glucides selon l'origine botanique et, pour la vigne, selon le climat de culture. Cette étude a été réalisée *via* la molécule d'éthanol. Cette variation nécessite des plus amples approfondissements, notamment avec l'étude des glucides formés par une plante dans des conditions contrôlées.
- Un profil isotopique caractéristique pour l'amidon ou le saccharose de chaque type d'espèce. Ces résultats sont cohérents avec les observations effectuées sur les éthanols, suggérant que l'utilisation de la RMN  $^{13}C$  isotopique peut être utilisée pour la filiation isotopique en abondance naturelle. Des bases pour une discussion sont posées et, bien que non exhaustives, celles-ci suggèrent l'implication de flux métaboliques différents d'une espèce à l'autre.
- Des effets isotopiques d'équilibre et cinétique en  $^{13}C$  lors de l'équilibre glucose=fructose et de la transformation du fructose en glucose par la glucose isomérase. Un effet isotopique d'équilibre de -12,9‰ et 6,8‰ a été observé pour les carbones C-1 et C-2, respectivement, dans le sens de formation du glucose.

Un effet isotopique cinétique en  $^{13}\text{C}$  important sur le site carboné C-2 (18,5‰) et plus faible sur les sites carbonés C-1 et C-6 (6,7‰ et 8,1‰, respectivement) a été mesuré lors de la transformation du fructose en glucose. Ces effets impliquent une distribution intramoléculaire différente pour les produits issus du métabolisme du fructose (glycolyse) ou du glucose (voie des pentoses phosphates) dans la plante.

Les échantillons analysés dans ces travaux montrent l'intérêt de la RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique en tant qu'outil pour l'étude de métabolismes. Bien que les échantillons analysés dans ces travaux soient, pour la plupart, d'origine commerciale, les informations obtenues et les hypothèses formulées grâce à leur analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique montrent un intérêt certain pour l'analyse de sucres issus de différents compartiments de la plante, étude qui a commencé avec l'analyse de l'amidon foliaire de *Xanthium strumarium*. Pour approfondir la compréhension des phénomènes responsables de la différence de distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des sucres, des études concernant le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à des réactions unitaires telles que l'hydrolyse du saccharose par l'invertase, la phosphorylation des hexoses par les hexoses kinases ou la formation et la dégradation de l'amidon pourront être menées.

L'application de la méthodologie à d'autres types d'échantillons, (acides organiques, par exemple) permettrait une meilleure compréhension du fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  dans la plante, notamment sur les points qui nécessitent un éclaircissement, tels que le fractionnement isotopique en  $^{13}\text{C}$  associé à la respiration mitochondriale.

D'un point de vue des applications potentielles, des études menées au laboratoire ont montré l'intérêt de la RMN  $^{13}\text{C}$  pour la détermination de fraudes sur les principes actifs [8] et pour la détermination de l'origine d'arômes, comme la vanilline par exemple [34, 117]. Une des applications potentielles de la mesure RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique développée dans ces travaux provient de la différence de teneur isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  entre éthanol de plantes C4 et CAM. Cette différence permettrait une détection d'adultération par ajout de sucre issu de plante C4 (saccharose de canne, glucose d'amidon de maïs, par exemple) à un produit naturel issu d'une plante CAM (jus d'ananas ou jus d'agave, dont la fermentation permet l'obtention de la tequila).

## Références bibliographiques

1. Brugnoli, E. and Farquhar, G. D., in *Photosynthesis: physiology and metabolism*. 2000, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p. 399-434.
2. Farquhar, G. D., O'Leary, M. H. and Berry, J. A., *Aust. J. Plant Physiol.*, *On the Relationship Between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves*, 1982. **9**: p. 121.
3. Ghashghaie, J., Badeck, F.-W., Lanigan, G., Nogués, S., Tcherkez, G., Deléens, E., Cornic, G. and Griffiths, H., *Phytochem. Rev.*, *Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C3 plants*, 2003. **2**: p. 145.
4. Cernusak, L. A., Tcherkez, G., Keitel, C., Cornwell, W. K., Santiago, L. S., Knohl, A., Barbour, M. M., Williams, D. G., Reich, P. B., Ellsworth, D. S., Dawson, T. E., Griffiths, H. G., Farquhar, G. D. and Wright, I. J., *Functional Plant Biology*, *Why are non-photosynthetic tissues generally  $^{13}\text{C}$  enriched compared with leaves in C3 plants? Review and synthesis of current hypotheses*, 2009. **36**: p. 199.
5. Badeck, F. W., Tcherkez, G., Nogués, S., Piel, C. and Ghashghaie, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs - a widespread phenomenon*, 2005. **19**: p. 1381-1391.
6. Schmidt, T. C., Zwank, L., Elsner, M., Berg, M., Meckenstock, R. U. and Haderlein, S. B., *Anal. Bioanal. Chem.*, *Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges*, 2004. **378**: p. 283-300.
7. Jasper, J. P., Westenberger, B. J., Spencer, J. A., Buhse, L. F. and Nasr, M., *J. Pharmaceut. Biomed.*, *Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients*, 2004. **35**: p. 21-30.
8. Silvestre, V., Mboula, V. M., Jouitteau, C., Akoka, S., Robins, R. J. and Remaud, G. S., *J. Pharmaceut. Biomed.*, *Isotopic  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry to assess counterfeiting of active pharmaceutical ingredients: Site-specific  $^{13}\text{C}$  content of aspirin and paracetamol*, 2009. **50**: p. 336-341.
9. Remaud, G. S., Martin, Y. L., Martin, G. G. and Martin, G. J., *J. Agric. Food Chem.*, *Detection of sophisticated adulterations of natural vanilla flavors and extracts: Application of the SNIF-NMR method to vanillin and p-hydroxybenzaldehyde*, 1997. **45**: p. 859-866.

10. Rossmann, A., Food Rev. Int., *Determination of stable isotope ratios in food analysis*, 2001. **17**: p. 347-381.
11. Sharp, Z. D., Atudorei, V., Panarello, H. O., Fernandez, J. and Douthitt, C., J. Archaeol. Sci., *Hydrogen isotope systematics of hair: archeological and forensic applications*, 2003. **30**: p. 1709-1716.
12. Horita, J. and Vass, A. A., J Forensic Sci., *Stable-isotope fingerprints of biological agents as forensic tools*, 2003. **48**: p. 122-126.
13. Seibt, U., Rajabi, A., Griffiths, H. and Berry, J., Oecologia, *Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity*, 2008. **155**: p. 441.
14. Loreto, F., Harley, P. C., Di Marco, G. and Sharkey, T. D., Plant Physiol., *Estimation of Mesophyll Conductance to CO<sub>2</sub> Flux by Three Different Methods*, 1992. **98**: p. 1437-1443.
15. Tcherkez, G., Nogues, S., Bleton, J., Cornic, G., Badeck, F. and Ghashghaie, J., Plant Physiol., *Metabolic Origin of Carbon Isotope Composition of Leaf Dark-Respired CO<sub>2</sub> in French Bean*, 2003. **131**: p. 237-244.
16. Adams, M. A. and Grierson, P. F., Plant Biology, *Stable Isotopes at Natural Abundance in Terrestrial Plant Ecology and Ecophysiology: An Update*, 2001. **3**: p. 299-310.
17. O'Leary, M. H., Phytochemistry, *Carbon isotope fractionation in plants*, 1981. **20**: p. 553-567.
18. O'Leary, M. H., Madhavan, S. and Paneth, P., Plant, Cell Environ., *Physical and chemical basis of carbon isotope fractionation in plants*, 1992. **15**: p. 1099-1104.
19. Bigeleisen, J. and Wolfsberg, M., Adv. Chem. Phys., *Theoretical and experimental aspects of isotope effects in chemical kinetics*, 1958. **1**: p. 15-76.
20. Melander, L. and Saunders, W. H. 1982, New York: John Wiley & Sons.
21. Mook, W. G., Bommerson, J. C. and Staverman, W. H., Earth Planet. Sci. Lett., *Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide*, 1974. **22**: p. 169.
22. Galimov, E. M., Org. Geochem., *Isotope organic geochemistry*, 2006. **37**: p. 1200.
23. Galimov, E. M. 1985: Academic Press, New York, Toronto, Orlando. 262 pp.
24. Urey, H. C., Journal of the Chemical Society (Resumed), *The thermodynamic properties of isotopic substances*, 1947.
25. Bigeleisen, J. and Mayer, M. G., The Journal of Chemical Physics, *Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions*, 1947. **15**: p. 261.

26. Martin, G. J. and Martin, M. L., *Tetrahedron Lett.*, *Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative  $^2\text{H}$  NMR*, 1981. **22**: p. 3525-3528.
27. Martin, G. J., Sun, X. Y., Guillou, C. and Martin, M. L., *Tetrahedron*, *NMR determination of absolute site-specific natural isotope ratios of hydrogen in organic molecules. Analytical and mechanistic applications*, 1985. **41**: p. 3285-3296.
28. Martin, G. J. and Martin, M. L., *Journal de chimie physique*, *Détermination par résonance magnétique nucléaire du deutérium du fractionnement isotopique spécifique naturel. Application à la détection de la chaptalisation des vins*, 1983. **80**: p. 293-297.
29. Martin, G. and Martin, M., *Tetrahedron Lett.*, *Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative  $^2\text{H}$  NMR*, 1981. **22**: p. 3525-3528.
30. Martin, G. J., Martin, M. and Remaud, G., in *Modern Magnetic Resonance*, G. Webb, Editor. 2006, Springer: Berlin. p. 1647-1658.
31. Tenailleau, E., *Développement de la RMN quantitative du carbone  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle*, in *Faculté des Sciences et Techniques*. 2005, Université de Nantes: Nantes.
32. Caytan, E., *Détermination de la distribution intramoléculaire du  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle par RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative*, in *Faculté des Sciences et Techniques*. 2007, Université de Nantes: Nantes.
33. Menditto, A., Patriarca, M. and Magnusson, B., *Accredit. Qual. Assur.*, *Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision*, 2007. **12**: p. 45-47.
34. Botosoa, E. P., *Protocoles analytiques pour l'étude de la vanilline par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique en abondance naturelle: reproductibilité méthodologique; purification; origines du fractionnement isotopique*, in *Chemistry*. 2008, University of Nantes: Nantes. p. 172.
35. Tenailleau, E., Remaud, G. and Akoka, S., *Instrum. Sci. Technol.*, *Quantification of the H-1-decoupling effects on the accuracy of C-13-NMR measurements*, 2005. **33**: p. 391-399.
36. Tenailleau, E., Lancelin, P., Robins, R. J. and Akoka, S., *Anal. Chem.*, *NMR Approach to the Quantification of Nonstatistical  $^{13}\text{C}$  Distribution in Natural Products: Vanillin*, 2004. **76**: p. 3818-3825.
37. Caytan, E., Botosoa, E. P., Silvestre, V., Robins, R. J., Akoka, S. and Remaud, G. S., *Anal. Chem.*, *Accurate Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific  $^{13}\text{C}$  Isotope Ratio Determination*, 2007. **79**: p. 8266-8269.

38. Botosoa, E. P., Blumenstein, C., MacKenzie, D. A., Silvestre, V., Remaud, G. S., Kwiecień, R. A. and Robins, R. J., *Anal. Biochem.*, *Quantitative isotopic <sup>13</sup>C NMR at natural abundance to probe enzyme reaction mechanisms via site-specific isotope fractionation: The case of the chain-shortening reaction for the bioconversion of ferulic acid to vanillin*, 2009. **393**: p. 182-188.
39. Bender, M. M., *Phytochemistry*, *Variations in the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation*, 1971. **10**: p. 1239.
40. Craig, H., *Geochim. Cosmochim. Acta*, *The geochemistry of the stable carbon isotopes*, 1953. **3**: p. 53.
41. Roeske, C. and O'Leary, M. H., *Biochemistry*, *Carbon isotope effects on enzyme-catalyzed carboxylation of ribulose bisphosphate*, 1984. **23**: p. 6275–6284.
42. Tcherkez, G., *Funct. Plant Biol.*, *How large is the carbon isotope fractionation of the photorespiratory enzyme glycine decarboxylase?* 2006. **33**: p. 911.
43. Sage, R. F., *Plant Biol (Stuttg)*, *Environmental and Evolutionary Preconditions for the Origin and Diversification of the C4 Photosynthetic Syndrome*, 2001. **3**: p. 202.
44. Henderson, S. A., Caemmerer, S. V. and Farquhar, G. D., *Funct. Plant Biol.*, *Short-Term Measurements of Carbon Isotope Discrimination in Several C4 Species*, 1992. **19**: p. 263-285.
45. Farquhar, G. D., *Aust. J. Plant Physiol.*, *On the Nature of Carbon Isotope Discrimination in C4 Species*, 1983. **10**: p. 205.
46. Osmond, C. B., Allaway, W. G., Sutton, B. G., Troughton, J. H., Queiroz, O., Luttge, U. and Winter, K., *Nature*, *Carbon Isotope Discrimination in Photosynthesis of CAM Plants*, 1973. **246**: p. 41.
47. Griffiths, H., *Plant, Cell Environ.*, *Carbon isotope discrimination and the integration of carbon assimilation pathways in terrestrial CAM plants*, 1992. **15**: p. 1051-1062.
48. Tcherkez, G., Farquhar, G., Beadeck, F. and Ghashghaie, J., *Funct. Plant Biol.*, *Theoretical considerations about carbon isotope distribution in glucose of C3 plants*, 2004. **31**: p. 857-877.
49. Rossmann, A., Butzenlechner, M. and Schmidt, H. L., *Plant Physiol.*, *Evidence for a nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose*, 1991. **96**: p. 609-614.
50. Weber, D., Kexel, H. and Schmidt, H. L., *J. Agric. Food Chem.*, *<sup>13</sup>C-Pattern of Natural Glycerol: Origin and Practical Importance*, 1997. **45**: p. 2042-2046.

51. Schmidt, H.-L., Kexel, H., Butzenlechner, M., Schwarz, S., Gleixner, G., Thimet, S., Werner, R. and Gensler, M., in *Stable Isotope in the Biosphere*, E. Wada, et al., Editors. 1995, Kyoto University Press: Kyoto, Japan. p. 17-35.
52. Gleixner, G. and Schmidt, H.-L., J. Biol. Chem., *Carbon isotope effects on the fructose-1,6-bisphosphate aldolase reaction: origin for non-statistical <sup>13</sup>C distribution in carbohydrates*, 1997. **272**: p. 5382-5387.
53. Gessler, A., Tcherkez, G., Peuke, A. D., Ghashghaie, J. and Farquhar, G. D., Plant, Cell & Environment, *Experimental evidence for diel variations of the carbon isotope composition in leaf, stem and phloem sap organic matter in Ricinus communis*, 2008. **31**: p. 941-953.
54. Hobbie, E. A. and Werner, R. A., New Phytol., *Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C3 and C4 plants: a review and synthesis*, 2003. **161**: p. 371-385.
55. Zhang, B.-L., Buddrus, S., Trierweiler, M. and Martin, G., J. Agric. Food Chem., *Characterization of glycerol from different origins by <sup>2</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR studies of site-specific natural isotope fractionation*, 1998. **46**: p. 1374-1380.
56. Rauschenbach, P., Simon, H., Stichler, W. and Moser, H., Zeitschrift für Naturforschung, *Comparison of the deuterium and carbon-13 contents of ethanol obtained by fermentation and chemical synthesis*, 1979. **34c**: p. 1-4.
57. Scrimgeour, C. M., Bennet, W. M. and Connacher, A. A., Biol. Mass Spectrom., *A convenient method of screening glucose for <sup>13</sup>C:<sup>12</sup>C ratio for use in stable isotope tracer studies*, 1988. **17**: p. 265-266.
58. Roitsch, T. and González, M.-C., Trends Plant Sci., *Function and regulation of plant invertases: sweet sensations*, 2004. **9**: p. 606.
59. Mauve, C., Bleton, J., Bathellier, C., Lelarge-Trouverie, C., Guérard, F., Ghashghaie, J., Tchaplal, A. and Tcherkez, G., Rapid Commun. Mass Spectrom., *Kinetic <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C isotope fractionation by invertase: evidence for a small in vitro isotope effect and comparison of two techniques for the isotopic analysis of carbohydrates*, 2009. **23**: p. 2499-2506.
60. Ehleringer, J. R., Buchmann, N. and Flanagan, L. B., Ecological Applications, *Carbon isotope ratios in belowground carbon cycle processes*, 2000. **10**: p. 412-422.
61. Melzer, E. and Schmidt, H.-L., J. Biol. Chem., *Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids*, 1987. **262**: p. 8159-8164.

62. DeNiro, M. J. and Epstein, S., *Science*, *Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis*, 1977. **197**: p. 261-263.
63. Duranceau, M., Ghashghaie, J., Badeck, F., Deleens, E. and Cornic, G., *Plant, Cell & Environment*,  *$\delta^{13}C$  of  $CO_2$  respired in the dark in relation to  $\delta^{13}C$  of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L. under progressive drought*, 1999. **22**: p. 515-523.
64. Bathellier, C., Badeck, F. W., Couzi, P., Harscoët, S., Mauve, C. and Ghashghaie, J., *New Phytol.*, *Divergence in  $\delta^{13}C$  of dark respired  $CO_2$  and bulk organic matter occurs during the transition between heterotrophy and autotrophy in *Phaseolus vulgaris* plants*, 2008. **177**: p. 406-418.
65. Hermes, J. D., Roeske, C. A., O'Leary, M. H. and Cleland, W. W., *Biochemistry*, *Use of multiple isotope effects to determine enzyme mechanisms and intrinsic isotope effects. Malic enzyme and glucose 6-phosphate dehydrogenase*, 1982. **21**: p. 5106.
66. Rendina, A. R., Hermes, J. D. and Cleland, W. W., *Biochemistry*, *Use of multiple isotope effects to study the mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase*, 1984. **23**: p. 6257.
67. Hayes, J. M., *Rev. Mineral. Geochem.*, *Fractionation of Carbon and Hydrogen Isotopes in Biosynthetic Processes*, 2001. **43**: p. 225-277.
68. Rossmann, A., Butzenlechner, M. and Schmidt, H.-L., *Plant Physiol.*, *Evidence for nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose*, 1991. **96**: p. 609-614.
69. Gonzalez, J., Remaud, G., Jamin, E., Naulet, N. and Martin, G. G., *J. Agric. Food Chem.*, *Specific Natural Isotope Profile Studied by Isotope Ratio Mass Spectrometry (SNIP-IRMS):  $^{13}C/^{12}C$  Ratios of Fructose, Glucose, and Sucrose for Improved Detection of Sugar Addition to Pineapple Juices and Concentrates*, 1999. **47**: p. 2316-2321.
70. Hayashi, F., *J Biochem*, *The adsorption of sugars on charcoal*, 1932. **16**: p. 1-16.
71. Whistler, R. L. and Durso, D. F., *J. Am. Chem. Soc.*, *Chromatographic Separation of Sugars on Charcoal*, 1950. **72**: p. 677-679.
72. Alves, L. A., Almeida e Silva, J. o. B. and Giulietti, M., *Journal of Chemical & Engineering Data*, *Solubility of d-Glucose in Water and Ethanol/Water Mixtures*, 2007. **52**: p. 2166.
73. Flood, A. E. and Puagsa, S., *Journal of Chemical & Engineering Data*, *Refractive Index, Viscosity, and Solubility at 30 oC, and Density at 25 oC for the System Fructose + Glucose + Ethanol + Water*, 2000. **45**: p. 902.

74. Yamabe, S. and Ishikawa, T., *J. Org. Chem.*, *Theoretical Study of Mutarotation of Glucose*, 1999. **64**: p. 4519-4524.
75. Shallenberger, R. S., *Pure Appl. Chem.*, *Intrinsic chemistry of Fructose*, 1978. **50**: p. 1409-1420.
76. Le Barc'h, N., Gossel, J.-M., Looten, P. and Mathlouthi, M., *Food Chem.*, *Kinetic study of the mutarotation of D-glucose in concentrated aqueous solution by gas-liquid chromatography*, 2001. **74**: p. 119-124.
77. Qrtiz, P., Reguera, E. and Fernández-Bertrán, J., *J. Fluorine Chem.*, *Study of the interaction of KF with carbohydrates in DMSO-d<sub>6</sub> by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy*, 2002. **113**: p. 7.
78. Schleucher, J., Vanderveer, P., Markley, J. L. and Sharkey, T. D., *Plant, Cell Environ.*, *Intramolecular deuterium distributions reveal disequilibrium of chloroplast phosphoglucose isomerase*, 1999. **22**: p. 525-533.
79. Zhang, B.-L., Billault, I., Li, X.-B., Mabon, F., Remaud, G. and Martin, M. L., *J. Agric. Food Chem.*, *Hydrogen isotopic profile in the characterization of sugars. Influence of the metabolic pathway*, 2002. **50**: p. 1574-1580.
80. Botosoa, E. P., Silvestre, V., Robins, R. J., Rojas, J. M. M., Guillou, C. and Remaud, G. S., *J. Chromatogr. A*, *Evidence of <sup>13</sup>C non-covalent isotope effects obtained by quantitative <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy at natural abundance during normal phase liquid chromatography*, 2009. **1216**: p. 7043.
81. Verhart, C. G. J., Caris, B. M. G., Zwanenburg, B. and Chittenden, G. J. F., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, *Acetalation studies. Part IX. Reaction of sucrose and some related sugars with acetone in the presence of iodine; a novel cleavage-isopropylideneation method*, 1992. **111**: p. 348-352.
82. Kang, J., Lim, G. J., Yoon, S. K. and Kim, M. Y., *The Journal of Organic Chemistry*, *Asymmetric Cyclopropanation Using New Chiral Auxiliaries Derived from D-Fructose*, 1995. **60**: p. 564.
83. Tenailleau, E. and Akoka, S., *J. Magn. Reson.*, *Adiabatic <sup>1</sup>H decoupling scheme for very accurate intensity measurements in <sup>13</sup>C NMR*, 2007. **185**: p. 50-58.
84. Caytan, E., Cherghaoui, Y., Barril, C., Jouitteau, C., Rabiller, C. and Remaud, G., *Tetrahedron: Asymmetry*, *Strategy for specific isotope ratio determination by quantitative NMR on symmetrical molecules: application to glycerol*, 2006. **17**: p. 1622-1624.

85. Luboradzki, R. and Pakulski, Z., *Tetrahedron, Novel class of saccharide-based organogelators: glucofuranose derivatives as one of the smallest and highly efficient gelators*, 2004. **60**: p. 4613-4616.
86. Luboradzki, R., Pakulski, Z. and Sartowska, B., *Tetrahedron, Glucofuranose derivatives as a library for designing and investigating low molecular mass organogelators*, 2005. **61**: p. 10122-10128.
87. Reuben, J., *J. Am. Chem. Soc., Isotopic multiplets in the carbon-13 NMR spectra of polyols with partially deuterated hydroxyls. 3. Fingerprints of molecular structure and hydrogen bonding effects in the carbon-13 NMR spectra of monosaccharides with partially deuterated hydroxyls*, 1984. **106**: p. 6180-6186.
88. Reuben, J., *J. Am. Chem. Soc., Isotopic multiplets in the carbon-13 NMR spectra of polyols with partially deuterated hydroxyls. 4. Molecular structure as reflected in the carbon-13 NMR spectra of oligosaccharides with partially deuterated hydroxyls*, 1985. **107**: p. 1747-1755.
89. Tiwari, P., Kumar, R., Maulik, P. and Kumar Misra, A., *Eur. J. Org. Chem., Efficient Acetylation of Carbohydrates Promoted by Imidazole13*, 2005. **2005**: p. 4265-4270.
90. Caytan, E., Remaud, G. S., Tenailleau, E. and Akoka, S., *Talanta, Precise and accurate quantitative 13C NMR with reduced experimental time*, 2007. **71**: p. 1016-1021.
91. Steel, C. C., Grbin, P. R. and Nichol, A. W., *Biochemistry and Molecular Biology Education, The pentose phosphate pathway in the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Kloeckera apiculata, an exercise in comparative metabolism for food and wine science students*, 2001. **29**: p. 245.
92. Gaudillère, J.-P., Van Leeuwen, C. and Ollat, N., *J. Plant Physiol., Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status*, 2002. **53**: p. 757-763.
93. Bowen, G. J. and Wilkinson, B., *Geology, Spatial distribution of  $\delta^{18}O$  in meteoric precipitation*, 2002. **30**: p. 315-318.
94. Yakir, D., DeNIRO, M. J. and Ephrath, J. E., *Plant, Cell Environ., Effects of water stress on oxygen, hydrogen and carbon isotope ratios in two species of cotton plants*, 1990. **13**: p. 949-955.
95. Chaves, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J. M., Santos, T., Regalado, A. P., Rodrigues, M. L. and Lopes, C. M., *Ann Bot, Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data*. **105**: p. 661-676.

96. Perry, S. W., Krieg, D. R. and Hutmacher, R. B., *Plant Physiol.*, *Photosynthetic Rate Control in Cotton: Photorespiration*, 1983. **73**: p. 662-665.
97. Vassey, T. L. and Sharkey, T. D., *Plant Physiol.*, *Mild Water Stress of Phaseolus vulgaris Plants Leads to Reduced Starch Synthesis and Extractable Sucrose Phosphate Synthase Activity*, 1989. **89**: p. 1066-1070.
98. Kim, J.-Y., Mahe, A., Brangeon, J. and Prioul, J.-L., *Plant Physiol.*, *A Maize Vacuolar Invertase, IVR2, Is Induced by Water Stress. Organ/Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression*, 2000. **124**: p. 71-84.
99. Botosoa, E. P., Caytan, E., Silvestre, V., Robins, R. J., Akoka, S. and Remaud, G. S., *J. Am. Chem. Soc.*, *Unexpected Fractionation in Site-Specific <sup>13</sup>C Isotopic Distribution Detected by Quantitative <sup>13</sup>C NMR at Natural Abundance*, 2008. **130**: p. 414-415.
100. Calderone, G., Guillou, C. and Naulet, N., *Actualité chimique*, *Utilisation réglementaire des analyses isotopiques des aliments. Dix ans d'expérience européenne.*, 2003. **août-septembre**: p. 22-24.
101. Wanek, W., Heintel, S. and Richter, A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *Preparation of starch and other carbon fractions from higher plant leaves for stable carbon isotope analysis*, 2001. **15**: p. 1136-1140.
102. Richter, A., Wanek, W., Werner, R., A., Ghashghaie, J., Jäggi, M., Gessler, A., Brugnoli, E., Hettmann, E., Göttlicher, S., G., Salmon, Y., Bathellier, C., Kodama, N., Nogués, S., Sørensen, A., Volders, F., Sörgel, K., Blöchl, A., Siegwolf, R. T. W., Buchmann, N. and Gleixner, G., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *Preparation of starch and soluble sugars of plant material for the analysis of carbon isotope composition: a comparison of methods*, 2009. **23**: p. 2476-2488.
103. Selmi, B., Marion, D., Perrier Cornet, J. M., Douzals, J. P. and Gervais, P., *J. Agric. Food Chem.*, *Amyloglucosidase Hydrolysis of High-Pressure and Thermally Gelatinized Corn and Wheat Starches*, 2000. **48**: p. 2629.
104. Shannon, J. C. and Dougherty, C. T., *Plant Physiol.*, *Movement of <sup>14</sup>C-Labeled Assimilates into Kernels of Zea mays L: II. Invertase Activity of the Pedicel and Placento-Chalazal Tissues*, 1972. **49**: p. 203-206.
105. Griffith, S. M., Jones, R. J. and Brenner, M. L., *Plant Physiol.*, *In Vitro Sugar Transport in Zea mays L. Kernels: I. Characteristics of Sugar Absorption and Metabolism by Developing Maize Endosperm*, 1987. **84**: p. 467-471.
106. Wyse, R., *Plant Physiol.*, *Sucrose Uptake by Sugar Beet Tap Root Tissue*, 1979. **64**: p. 837-841.

107. Lingle, S. E., *Plant Physiol.*, *Evidence for the Uptake of Sucrose Intact into Sugarcane Internodes*, 1989. **90**: p. 6-8.
108. Jenner, C. F., *Aust. J. Plant Physiol.*, *An investigation of the association between the hydrolysis of sucrose and its absorption by grains in wheat*, 1974. **1**: p. 319-329.
109. Lee, J. K., Bain, A. D. and Berti, P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, *Probing the Transition States of Four Glucoside Hydrolyses with  $^{13}\text{C}$  Kinetic Isotope Effects Measured at Natural Abundance by NMR Spectroscopy*, 2004. **126**: p. 3769.
110. Maunoury-Danger, F., Bathellier, C., Laurette, J., Fresneau, C., Ghashghaie, J., Damesin, C. and Tcherkez, G., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *Is there any  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  fractionation during starch remobilisation and sucrose export in potato tubers?* 2009. **23**: p. 2527-2533.
111. Lehtilä, R. L., Lehtilä, J. O., Roslund, M. U. and Leino, R., *Tetrahedron*, *Selectively protected galactose derivatives for the synthesis of branched oligosaccharides*, 2004. **60**: p. 3653.
112. Singleton, D. A. and Thomas, A. A., *J. Am. Chem. Soc.*, *High-precision simultaneous determination of multiple small kinetic isotope effects at natural abundance*, 1995. **117**: p. 9357-9358.
113. Bhosale, S. H., Rao, M. B. and Deshpande, V. V., *Microbiol. Rev.*, *Molecular and industrial aspects of glucose isomerase*, 1996. **60**: p. 280-300.
114. Rangarajan, M. and Hartley, B. S., *Biochem. J.*, *Mechanism of D-fructose isomerization by *Arthrobacter* D-xylose isomerase*, 1992. **283**: p. 223-233.
115. Collyer, C. A., Henrick, K. and Blow, D. M., *J. Mol. Biol.*, *Mechanism for aldose-ketose interconversion by -xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift*, 1990. **212**: p. 211.
116. Fenn, T. D., Ringe, D. and Petsko, G. A., *Biochemistry*, *Xylose Isomerase in Substrate and Inhibitor Michaelis States: Atomic Resolution Studies of a Metal-Mediated Hydride Shift*, 2004. **43**: p. 6464.
117. Tenailleau, E., Lancelin, P., Robins, R. J. and Akoka, S., *J. Agric. Food Chem.*, *Authentication of the origin of vanillin using quantitative natural abundance  $^{13}\text{C}$  NMR*, 2004. **52**: p. 7782-7787.

# Annexes

## Annexe 1 : Calcul théorique (à l'aide des $\beta$ -facteurs) du fractionnement isotopique à l'équilibre lors de l'équilibre $\text{CO}_2 = \text{HCO}_3^-$

Le tableau ci-dessous présente les valeurs des coefficients permettant de calculer les  $\beta$ -facteurs (d'après Galimov (1985)[23]):

Paramètre	Valeur	Paramètre	Valeur
L(C-C)	0,0464	I(C-H)	0
L(C-H)	0,0284	I(C-C)	0,0013
L(C-O)	0,055	I(C-O)	0,0019
L(C=O)	0,096	I(C=O)	0,0028
L(C=N)	0,079	I(C=N)	0,0016
L(C-N)	0,05	I(C-N)	0,0016

Rappelons la formule permettant d'obtenir  $\beta_i$  :

$$\beta_i = 1 + \sum_j L_j^n + \sum_k l_k$$

En utilisant les coefficients présentés dans le tableau ci-dessus :

$$\begin{aligned} \text{Pour } \text{HCO}_3^- \\ \beta_i &= 1 + L(\text{C-O}) + L(\text{C-O}) + L(\text{C=O}) \\ &= 1 + 0,055 + 0,055 + 0,096 \\ \beta_i &= 1,206 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pour } \text{CO}_2 \\ \beta_i &= 1 + L(\text{C-O}) + L(\text{C-O}) + L(\text{C=O}) \\ &= 1 + 0,096 + 0,096 \\ \beta_i &= 1,192 \end{aligned}$$

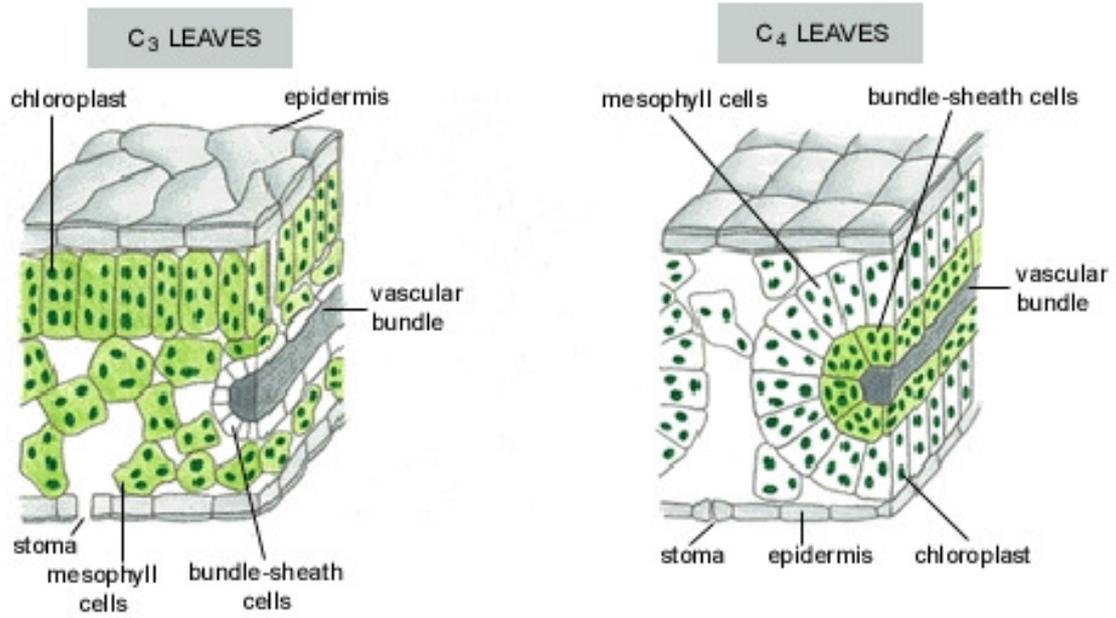
Le fractionnement isotopique est :

$$\alpha = \frac{\beta_{\text{CO}_2}}{\beta_{\text{HCO}_3^-}} = \frac{1,192}{1,206} = 0,9884$$

D'où la discrimination isotopique théorique :

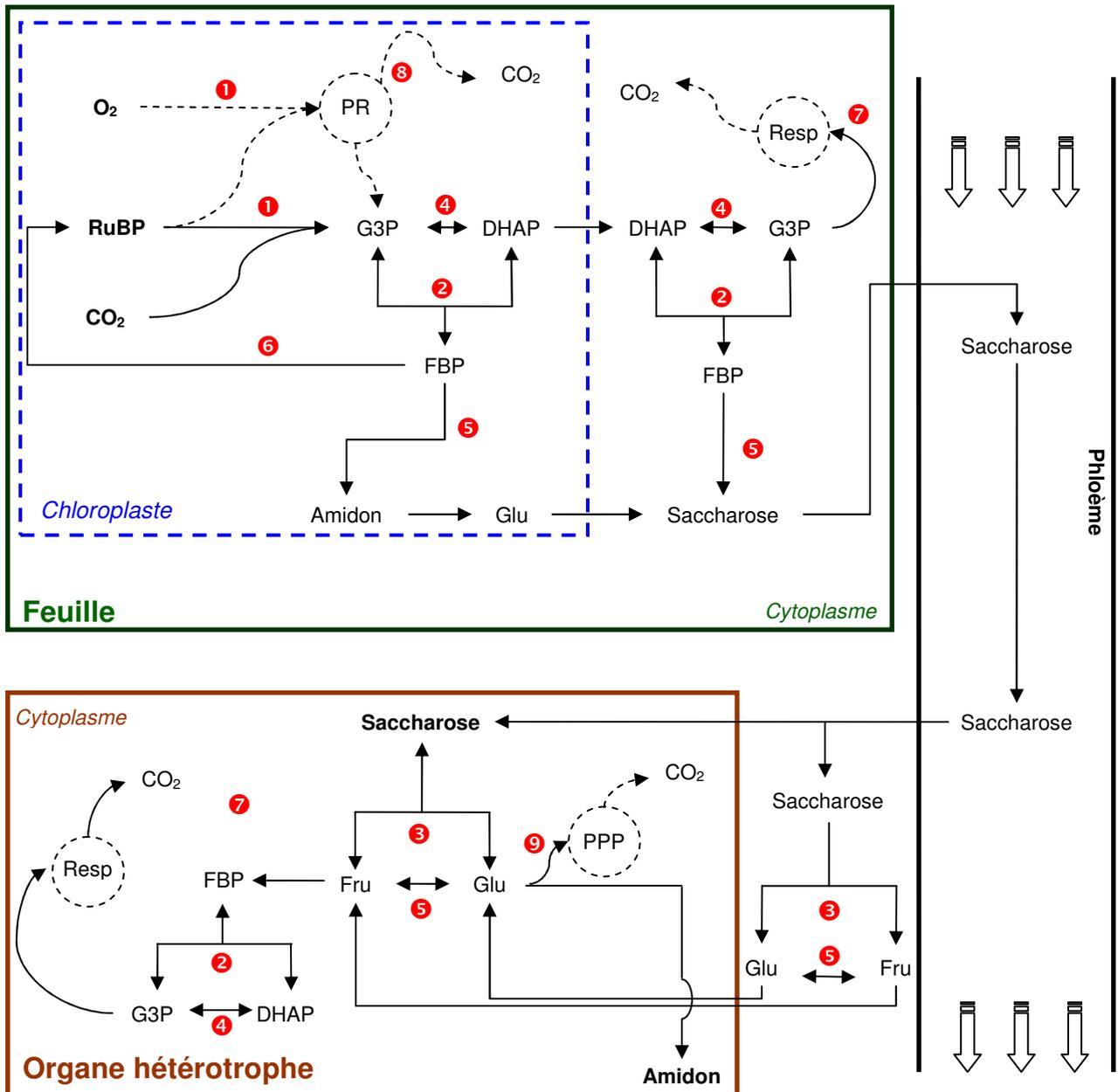
$$\Delta = (\alpha - 1) \times 1000 = (0,9884 - 1) \times 1000 = -11,6\text{‰}$$

pour une valeur expérimentale de -7,9‰.



**Annexe 2. Anatomie des feuilles de plantes C<sub>3</sub> (à gauche) et C<sub>4</sub> (à droite).**

**(Bundle sheath = gaine périvasculaire ; stoma = stomate)**



**Annexe 3. Schéma représentant le métabolisme associé à la formation et à l'utilisation des glucides dans la plante.**

Les numéros en rouge indiquent les enzymes impliquées, dont le fractionnement isotopique est regroupé dans le tableau pages suivante. PR : photorespiration ; Resp : respiration ; PPP : voie des pentoses phosphates ; RuBP : ribulose-1,5-bisphosphate ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; FBP : fructose-1,6-bisphosphate ; Fru : fructose ; Glu : glucose

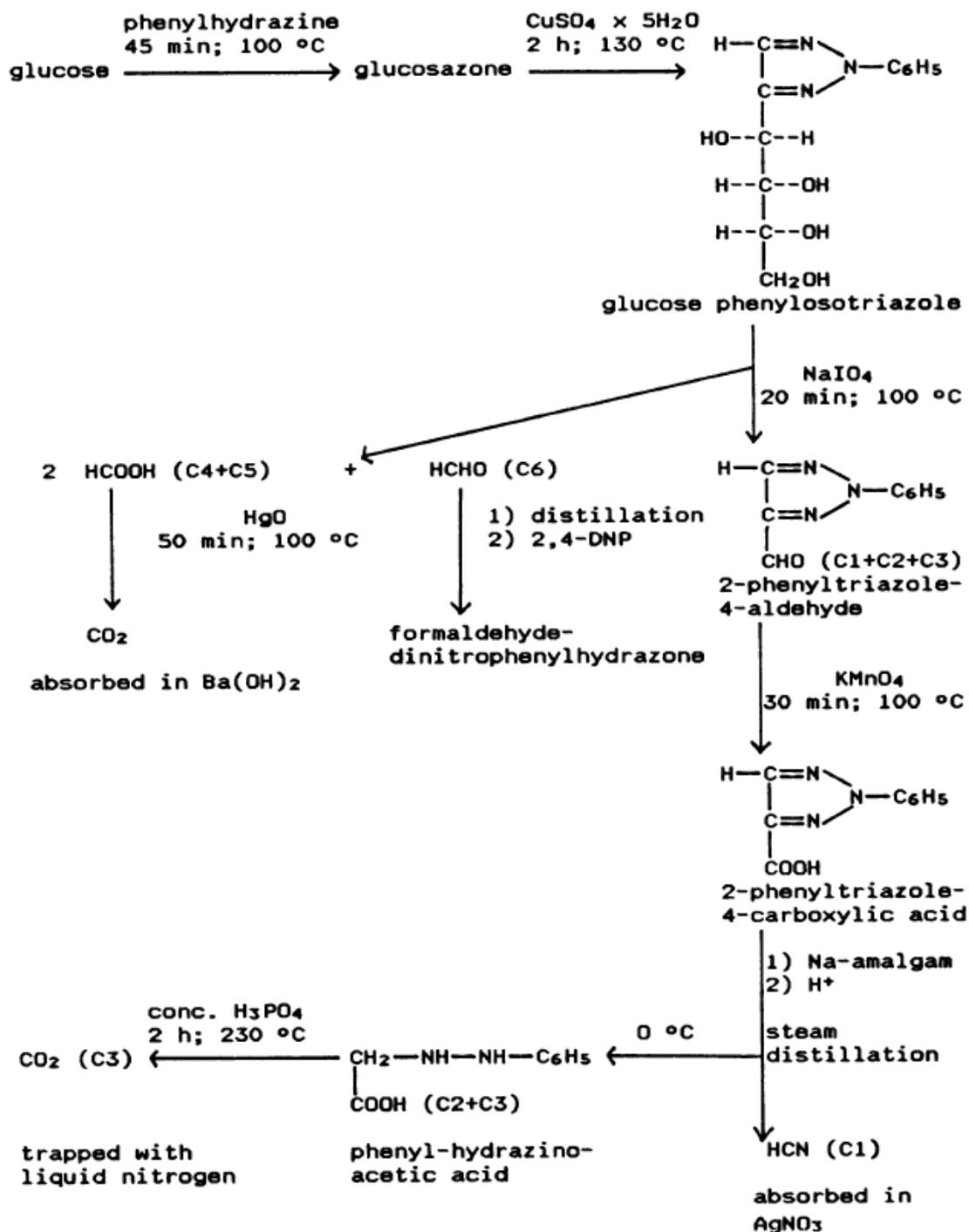
	Nom usuel	EC	Fonction	Effet isotopique	
1	<b>Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygenase</b>	4.1.1.39	$\text{CO}_2 + \text{RuBP} \rightarrow 3\text{-PGA}$		29‰ [41]
				Gleixner <i>et al.</i> [52]	Tcherkez <i>et al.</i> [48]
2	<b>Fructose-bisphosphate Aldolase</b>	4.1.2.13	<b>FBP</b> $\rightarrow$ G3P + DHAP	C-3	15,9‰ <sup>a</sup> 3,6‰ <sup>b</sup>
			<b>S7P</b> $\rightarrow$ E4P + DHAP	C-4	-3,2‰ <sup>a</sup> 4,9‰ <sup>b</sup>
3	<b><math>\beta</math>-fructofuranosidase (invertase)</b>	3.2.1.26	Saccharose $\rightarrow$ Glucose + Fructose		1‰ <sup>c</sup> [59]
4	<b>Triose-phosphate isomerase</b>	5.3.1.1	G3P = <b>DHAP</b>	C-1	10,1‰ <sup>d</sup>
				C-2	-9,8‰ <sup>d</sup>
5	<b>Glucose-6-phosphate isomerase</b>	5.3.1.9	G6P = <b>F6P</b>	C-1	21,2‰ <sup>d</sup>
				C-2	-20,4‰ <sup>d</sup>
6	<b>Transcétolase</b>	2.2.1.1	G3P + F6P $\rightarrow$ <b>X5P + E4P</b> G3P + S7P $\rightarrow$ <b>X5P + R5P</b>	C-1	7,6‰ [48]
7	<b>Pyruvate déshydrogénase</b>	1.2.4.1	Pyruvate + HSCoA $\rightarrow$ Acetyl-CoA + CO <sub>2</sub>	C-1	25‰ [61]
				C-2	23‰ [61]
8	<b>Glycine décarboxylase</b>	1.4.4.2	2 Gly $\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + ser + NH <sub>3</sub>		23‰ [3]
9	<b>Glucose-6-phosphate déshydrogénase</b>	1.1.1.49	G6P $\rightarrow$ glucono-1,5-lactone 6-P		16‰ <sup>a</sup> [65] -8‰ <sup>b</sup> [65]

<sup>a</sup> Effet isotopique cinétique

<sup>b</sup> Effet isotopique d'équilibre

<sup>c</sup> Effet isotopique supposé de 12‰ supposé sur le C-2 du fructosyle

<sup>d</sup> Calculés à l'aide des  $\beta$ -facteurs



Annexe 4. Dégradation chimique réalisée par Rossmann *et al.* (1991)[49] pour l'obtention des déviations isotopique sur chaque site carboné du glucose (repris de Rossmann *et al.* (1991) [49])

<b>Produit</b>	<b>MAGF</b>	<b>DAFP</b>	<b>TAMAGF</b>	<b>MADAFP</b>	<b>Ethanol</b>
O1P (ppm)	71,95	66,7	115	90	37
O2P (ppm)	3,5	3,0	3,65	3,5	2,4
SW (ppm)	160,31	160,31	248,45	238,90	80,41
AQ (s)	1	0,7	0,8	1	1
D1 (s)	14	35	15	75	20
p1 (μsec)	4,4	4,4	9,1	9,1	8,9
pL1 (dB)	-3	-3	-1	-1	-1
pcpd2 (μsec)	200	200	200	200	200
pL12 (dB)	3	3	2,44	2,44	2,44
cpdprg2	X4	X4	X4	X4	X4
spnam15	cos-1,5	cos-1,5	cos-1,5	cos-1,5	cos-1,5
NS	1000	620	720	600	40
DS	4	4	4	4	4
Si	131072	65536	131072	131072	65536
Lb			1,6	1,4	2
absg	3	3	3	3	3
Nombre de répétitions	5	5	3	3	5
Signal sur Bruit S/B	700	700	750	850	2500

**Annexe 5. Paramètres pour la mesure RMN <sup>13</sup>C des différents produits synthétisés au cours de la thèse**

## Liste des figures

Figure 1. Principe de fonctionnement de la RMN quantitative. ....	25
Figure 2. Pics satellites (*) correspondant au couplage $^1J(^{13}\text{C}-^{13}\text{C})$ associés à un pic central. ....	30
Figure 3. Schéma très simplifié de la formation des glucides et de leur utilisation et transport dans la plante.....	33
Figure 4. Carboxylation du $\text{CO}_2$ sur le Ribulose-1,5-bisphosphate catalysée par la Rubisco.....	35
Figure 5. Schéma simplifié de la discrimination isotopique en carbone 13 au cours de la fixation du $\text{CO}_2$ chez les plantes en C3.....	36
Figure 6. Schéma des deux modes d'action possibles de la Rubisco : oxygénase (à gauche) et carboxylase (à droite). ....	38
Figure 7. Utilisation du dioxygène par la Rubisco (photorespiration).....	38
Figure 8. Schéma simplifié de la discrimination isotopique au cours de la fixation du $\text{CO}_2$ par les plantes en C4.....	42
Figure 9. Transformations du glucose par des levures ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) ou par des bactéries ( <i>Lactobacillus bulgarius</i> et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ) pour la détermination de la teneur isotopique sur chaque site carboné du glucose. (D'après Rossmann et al., 1991 [49]).....	45
Figure 10. Schéma représentant la formation des trioses phosphates, de l'amidon et du saccharose dans la feuille. ....	47
Figure 11. Formation de deux molécules de 3-PGA catalysée par la Rubisco à partir d'une molécule de $\text{CO}_2$ et d'une molécule de RuBP.....	48
Figure 12. Formation du Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à partir du 3-phosphoglycérate (3-PGA). ....	49
Figure 13. Régénération du Ribulose-1,5-bisphosphate RuBP (substrat pour la fixation du $\text{CO}_2$ par la Rubisco) à partir du fructose-1,6-bisphosphate FBP.....	51
Figure 14. Utilisation du saccharose dans les organes hétérotrophes .....	55
Figure 15. Utilisation du saccharose dans les cellules des organes hétérotrophes après transport à travers le phloème.....	56
Figure 16. Schéma simplifié du processus de respiration. ....	58
Figure 17. Voie des pentoses phosphates à partir du glucose-6-phosphate.....	60
Figure 18. Equilibre mutarotationnel du glucose en solution.....	65
Figure 19. Spectre RMN $^{13}\text{C}$ découplé du proton du D-glucose dans $\text{D}_2\text{O}$ à 303K.....	65
Figure 20. Dérivation du glucose pour son analyse par RMN $^2\text{H}$ (d'après Schleucher et al., 1999 [78]). .....	66
Figure 21. Dérivation du saccharose ou d'un mélange glucose/fructose pour l'analyse par RMN $^2\text{H}$ adapté de Zhang et al. (2002) [79]. ....	67
Figure 22. Spectre RMN $^{13}\text{C}$ découplé $^1\text{H}$ du MAGF dans un mélange DMSO- $d_6$ /MeOH (cf. partie expérimentale ; paragraphe 4.3).....	70

Figure 23. Spectre RMN $^{13}\text{C}$ découplé $^1\text{H}$ du DAFP dans le DMSO- $d_6$ (cf. partie expérimentale; paragraphe 4.3).....	70
Figure 24. Spectre RMN $^{13}\text{C}$ découplé $^1\text{H}$ du MAGF issu de la dérivation du saccharose. Le produit (MAGF) est pollué par l'apparition d'un dérivé non désiré du fructose (MAFP-1,2).....	72
Figure 25. Effet du paramètre de la fonction d'apodisation $l_b$ sur la forme d'une raie RMN $^{13}\text{C}$ . Le paramètre $l_b$ doit être choisi de manière à éviter une troncature trop importante ( $l_b$ petit) et à obtenir une bonne résolution entre le pic central et ses satellites. Dans notre cas, le $l_b$ optimum est de 1,4 Hz.....	75
Figure 26. Signaux RMN $^{13}\text{C}$ correspondant aux carbones C-3, C-5 et C-6 du MAGF dans un mélange DMSO/acétone- $d_6$ .....	76
Figure 27. Séquence utilisée pour la détermination des fractions molaires réduites $f_i/F_i$ par RMN $^{13}\text{C}$ isotopique. ....	81
Figure 28. Séquence utilisée pour la détermination des temps de relaxation longitudinale $T_1$ $^{13}\text{C}$ . La séquence consiste en une bascule de l'aimantation à $180^\circ$ sur le canal $^{13}\text{C}$ et une bascule de $90^\circ$ après un délai variable $\tau$ .....	81
Figure 29. Spectre RMN $^{13}\text{C}$ des carbones du MAGF portant les fonctions hydroxyles (C-3, C-5 et C-6 en notation conventionnelle du glucose).....	85
Figure 30. Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du carbone du DAGF portant la fonction hydroxyle (C-3). Le cercle en pointillé indique l'apparition d'un signal additionnel, observé dans un mélange DMSO/acétone- $d_6$ (préparation (d) ; cf. partie expérimentale; paragraphe 4.2).....	85
Figure 31. Déviations isotopiques $\delta_i^{13}\text{C}$ pour chaque site carboné du MAGF dans un mélange DMSO/acétone- $d_6$ (préparation (a)) et dans un mélange MeOH/DMSO- $d_6$ (préparation (b)).....	86
Figure 32. Allure des signaux pour chaque carbone de la partie glucose du MAGF dans le mélange (c) (cf. partie expérimentale).....	88
Figure 33. Allure du signal RMN $^{13}\text{C}$ pour le carbone 6 du MAGF dans la préparation (c). ....	89
Figure 34. Dérivations envisagées du MAGF. ....	94
Figure 35. Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du TAMAGF dans l'acétone- $d_6$ . Les signaux des différents carbones ont été attribués par un ensemble d'expériences RMN 1D et 2D. Les pics d'intérêt (correspondant à la partie glucose du TAMAGF, C-1 à C-6) sont suffisamment résolus pour permettre leur quantification. La notation utilisée est la numérotation conventionnelle du glucose.....	96
Figure 36. Dérivations envisagées du DAFP, pour la formation d'un composé analysable par RMN $^{13}\text{C}$ . ....	100
Figure 37. Zone du spectre RMN $^{13}\text{C}$ correspondant aux carbones C-3, C-4, C-5 du fructose pour le composé 4. ....	101
Figure 38. Zone du spectre RMN $^{13}\text{C}$ correspondant aux carbones C-3, C-4, C-5 du fructose pour le composé 5. ....	101

Figure 39. Zone du spectre RMN $^{13}\text{C}$ correspondant aux carbones C-3, C-4, C-5 du fructose pour le composé 6.....	101
Figure 40. Déviations isotopiques $\delta_i^{13}\text{C}$ déterminées par RMN $^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné du TAMAGF issu du même glucose (maïs ; C4) avec un rendement optimal ou faible lors de la première étape catalysée par l'iode.....	107
Figure 41. Déviations isotopiques déterminées par RMN $^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné du TAMAGF issu du même glucose avec un rendement optimal ou faible lors de la première étape catalysée par l'acide sulfurique.....	108
Figure 42. Formation des deux produits lors de l'acétonation du fructose : 1,2;4,5-di-O-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (DAFP-1,2) et 2,3;4,5-di-O-isopropylidène- $\beta$ -D-fructopyranose (DAFP). .....	111
Figure 43. Déviations isotopiques en $^{13}\text{C}$ déterminées par RMN $^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné du MADAFP obtenu dans des conditions typiques de synthèse et dans des conditions de forte proportion (environ 50%) de formation du DAFP-1,2 à l'étape 1 de la dérivation .....	112
Figure 44. Comparaison des écarts à la moyenne des déviations isotopiques $\Delta\delta_i$ ( $^{13}\text{C}$ ) sur chaque site carboné d'un glucose de saccharose de betterave (C3), d'un glucose d'amidon de blé (C3), d'un glucose d'amidon de maïs (C4) et d'un glucose d'ananas (CAM) obtenus par la méthodologie décrite dans ce chapitre.....	113
Figure 45. Dérivation du MAGF à l'aide de l'anhydride acétique ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ).....	116
Figure 46. Dérivation du MAGF à l'aide de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA).....	116
Figure 47. Dérivation du DAFP à l'aide de l'anhydride acétique ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ).....	117
Figure 48. Dérivation du DAFP à l'aide de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA).....	118
Figure 49. Dérivation du DAFP à l'aide de l'anhydride propionique ( $(\text{EtCO})_2\text{O}$ ).....	118
Figure 50. Allure des signaux RMN $^{13}\text{C}$ de l'éthanol bi-marqué en carbone 13.....	121
Figure 51. Equilibre conformationnel de la vanilline.....	123
Figure 52. Schéma simplifié du processus fermentation du fructose par voie glycolytique.....	125
Figure 53. Schéma simplifié du processus de fermentation glycolytique des sucres (glucose, fructose et/ou saccharose) en éthanol.....	130
Figure 54. Corrélation entre la déviation isotopique du site méthylène $\delta\text{CH}_2$ (‰) et celle du site méthyle $\delta\text{CH}_3$ (‰) mesurées par RMN $^{13}\text{C}$ des éthanol de vins d'Europe récoltés pendant les années 1998, 2003 et 2005.....	141
Figure 55. Corrélation entre la déviation isotopique du site méthylène $\delta\text{CH}_2$ (‰), celle du site méthyle $\delta\text{CH}_3$ (‰) mesurées par RMN $^{13}\text{C}$ et la valeur globale $\delta_g^{13}\text{C}$ (‰) mesurée par SMRI des éthanol de vin d'Europe récoltés pendant les années 1998, 2003 et 2005.....	142
Figure 56. Corrélation entre le paramètre $\delta^{18}\text{O}$ et $\Delta$ pour les échantillons d'éthanol de vin de différentes origines géographiques récoltés dans les années 1998, 2003 et 2005.....	143
Figure 57. Corrélation entre le paramètre $\Delta$ et les différents paramètres climatiques relevés au mois de juillet (température maximale (A), ensoleillement (B), précipitations (C)) pour les	

échantillons d'éthanol de vin de différentes origines géographiques récoltés dans les années 1998, 2003 et 2005.....	145
Figure 58. Moyennes des $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné de glucoses provenant de l'hydrolyse d'amidons de pomme de terre « PdT » (n= 3) et de blé (n=3). .....	153
Figure 59. Moyennes de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné de glucoses obtenus à partir de 4 amidons de maïs commerciaux différents et résultats de la méthode enzymatique utilisée par Rossmann et al. sur un glucose de maïs (dégradation par microorganismes).....	155
Figure 60. Moyenne de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné de glucoses provenant de plantes à métabolisme C3 (pomme de terre et blé) et de plantes à métabolisme C4 (maïs) .....	156
Figure 61. Déviations isotopiques $\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné des parties glucosyle (courbe bleue) et fructosyle (courbe verte) d'un saccharose de betterave C3 (A) et d'un saccharose de canne C4 (B).....	158
Figure 62. Comparaison de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné de la partie glucosyle d'un saccharose de betterave (C3) obtenu par la méthodologie décrite au chapitre 4 et obtenu par Rossmann et al. (dégradation par microorganismes)(1991) [49].....	159
Figure 63. Comparaison de l'écart à la moyenne des déviations isotopiques $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné d'un saccharose de betterave (C3 ; courbe verte) et d'un saccharose de canne (C4 ; courbe bleue) obtenu par la méthodologie décrite dans le Chapitre 4.....	160
Figure 64. Réaction d'isomérisation des trioses phosphates DHAP et G3P (catalysée par la triose phosphate isomérase TPI), d'aldolisation de ces derniers en FBP (catalysée par l'aldolase) et isomérisation du G6P en F6P (catalysée par la phosphoglucose isomérase PGI). Les effets isotopiques en $^{13}\text{C}$ associés à ces réactions sont indiqués sur les carbones impliqués (en bleu : effets isotopiques associés à l'aldolisation des trioses phosphates en FBP déterminés par Gleixner et al. (1997) [52]; en rouge : effets isotopiques associés à l'isomérisation des trioses phosphates calculés à l'aide des $\beta$ -facteurs ; en vert : effets isotopiques associés à l'isomérisation du F6P en G6P calculés à l'aide des $\beta$ -facteurs sur les formes cycliques). Les nombres en italique indiquent un effet isotopique d'équilibre..	166
Figure 65. Formation du glucose-1-phosphate, précurseur de l'amidon dans le chloroplaste dans le chloroplaste. FBP : fructose-1,6-bisphosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; G1P : glucose-1-phosphate.....	169
Figure 66. Comparaison des écarts à la moyenne des déviations isotopiques $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné d'un glucose provenant de l'hydrolyse d'amidon foliaire de <i>Xanthium strumarium</i> , d'amidon C3, d'un saccharose C3 et de la partie glucosyle d'un saccharose de betterave C3.....	171

Figure 67. Schéma du protocole pour l'isolement du MAGF à partir d'un mélange MAFP-1,2 + MAGF. TBDMSCl : « Tert-butyldiméthylsilyl chloride » ; TBAF : « Tétrabutylammonium Fluoride » ; THF : tétrahydrofurane ; T. A. : température ambiante.....	176
Figure 68. Evolution du pourcentage de fructose % [F] en fonction du temps lorsque la glucose isomérase est mise en présence de glucose (« Glucose – départ ») ou de fructose (« Fructose – départ »).....	178
Figure 69. Etapes principales de la transformation réversible du fructose en glucose par la glucose isomérase (d'après Fenn et al. (2004) [116]).....	183

## Liste des tableaux

Tableau 1. Erreur sur les mesures en RMN quantitative en fonction du rapport TR/T1 et pour un angle de bascule de l'aimantation de $\pi/2$ .....	26
Tableau 2. Valeurs de la discrimination isotopique $\Delta^{13}C$ et de la déviation isotopique $\square^{13}C$ chez les plantes en C3 en fonction du rapport des fractions molaires en $CO_2$ à l'intérieur de la feuille ( $C_i$ ) et dans l'atmosphère ( $C_a$ ). .....	37
Tableau 3. Valeurs des écarts à la déviation isotopique globale en carbone 13 $\Delta\delta_i^{13}C$ obtenues par Rossmann et al. (1991)[49] selon une dégradation chimique ou enzymatique sur du glucose de maïs (C4) et un saccharose de betterave (C3) .....	46
Tableau 4. Discriminations isotopiques déterminées à partir du modèle mathématique mis au point par Tcherkez et al. (2004)[48]. .....	52
Tableau 5. Différences de déviations isotopiques entre substrats (saccharose, amidon, glucose) et produits (éthanol, $CO_2$ ) lors de la fermentation glycolytique (d'après Hobbie & Werner, 2004, ref. [54]).....	54
Tableau 6. Rendements obtenus lors de la dérivation à partir du glucose, du fructose ou du saccharose. Les rendements sont donnés en pourcentage par rapport à la masse théorique de produit attendue. ....	69
Tableau 7. Pureté des produits obtenus lors de la dérivation à partir du glucose, du fructose ou du saccharose. ....	71
Tableau 8. Conditions de préparation, temps de relaxation T1 $^{13}C$ le plus long de la molécule et durée d'expérience pour les mesures RMN $^{13}C$ du MAGF et du DAFP.....	73
Tableau 9. Répétabilité sur les mesures de $\delta_i^{13}C$ effectuées par RMN $^{13}C$ quantitative sur un échantillon de MAGF issu d'un glucose de maïs (C4).....	77
Tableau 10. Répétabilité de synthèse sur les mesures de $\square_i^{13}C$ sur le MAGF issu d'un glucose de maïs (C4).....	77
Tableau 11. Paramètres d'acquisition RMN $^{13}C$ pour la mesure des $\delta_i^{13}C$ du MAGF et du DAFP.....	82
Tableau 12. Effets isotopiques $\beta$ et $\gamma$ pour les 6 atomes de carbone (C-1 à C-6) correspondant à la partie glucose du MAGF dans le mélange (c).....	90
Tableau 13. Moyenne et écart type de répétabilité RMN $^{13}C$ sur la mesure des $\square_i^{13}C$ sur chaque site carboné du TAMAGF.....	97
Tableau 14. Moyenne et écart type de répétabilité RMN $^{13}C$ sur la mesure des $\delta_i^{13}C$ sur chaque site carboné du TAMAGF de référence sur les différents spectromètres RMN du laboratoire (400A, 400B et 500).....	98
Tableau 15. Moyenne et écart type de répétabilité sur les $\delta_i^{13}C$ mesurées par RMN $^{13}C$ sur les différents spectromètres du laboratoire (400A, 400B, 500) sur chaque site carboné du TAMAGF de référence.....	98

Tableau 16. Moyenne et écart type de répétabilité RMN $^{13}\text{C}$ sur la mesure des $\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné du MADAFP sur les différents spectromètres du laboratoire (400A et 500).....	103
Tableau 17. Moyenne et écart type de répétabilité de synthèse sur la mesure des $\delta_i^{13}\text{C}$ du TAMAGF obtenu à partir du glucose et du saccharose .....	105
Tableau 18. Déviations isotopiques en $^{13}\text{C}$ obtenues par RMN $^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné du TAMAGF.....	109
Tableau 19. Déviations isotopiques en $^{13}\text{C}$ obtenues par RMN $^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné du TAMAGF.....	110
Tableau 20. Conditions de préparation du TAMAGF et du MADAFP pour leur analyse RMN $^{13}\text{C}$ .....	119
Tableau 21. Paramètres pour la mesure RMN $^{13}\text{C}$ isotopique du TAMAGF et du MADAFP .....	120
Tableau 22. Effet du lissage sur les valeurs des déviations isotopiques calculées sur la molécule MADAFP de référence sur le spectromètre 400A .....	126
Tableau 23. Déviations isotopique $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) pour chaque site carboné de la molécule d'éthanol.....	131
Tableau 24. Déviations isotopiques $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) sur chaque site carboné de la molécule d'éthanol obtenue par fermentation des sucres de référence (glucose, fructose, saccharose).....	132
Tableau 25. Déviations isotopiques $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) sur chaque site carboné de la molécule d'éthanol obtenue par fermentation des sucres de référence (glucose, fructose, saccharose) à rendements optimaux (max.) et à rendements faibles (35% et 50%). .....	133
Tableau 26. Déviations isotopiques $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) sur chaque site carboné de la molécule d'éthanol obtenue par fermentation de sucres dont les $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) ont été déterminés par la méthode décrite au chapitre 4.....	134
Tableau 27. Déviations isotopiques globales $\delta_g^{13}\text{C}$ (‰) et sur chaque site carboné $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) de molécules d'éthanol de différentes origines botaniques.....	136
Tableau 28. Paramètres climatiques, déviations isotopiques globales $\delta_g^{13}\text{C}$ (‰) et sur chaque site carboné $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) d'éthanol de vin de différentes origines géographiques et de différents millésimes.....	139
Tableau 29. Paramètres climatiques et déviations isotopiques globales $\delta_g^{13}\text{C}$ (‰) et sur chaque site carboné $\delta_i^{13}\text{C}$ (‰) de molécules d'éthanol de vin de différentes origines géographiques récoltés dans l'année 1998.....	140
Tableau 30. Moyennes des déviations isotopiques site spécifique $\delta_i^{13}\text{C}$ et écarts types sur le TAMAGF obtenu à partir de l'hydrolyse du même amidon commercial (n=3).....	152
Tableau 31. Moyennes et écarts types des $\Delta\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné de la molécule de glucose provenant d'amidons C3 (n=3) .....	154
Tableau 32. Valeur du paramètre $\Lambda$ de la molécule d'éthanol calculée théoriquement à partir des valeurs obtenues sur les sucres (paragraphes 2.2 et 2.3) et mesurée expérimentalement sur les éthanol provenant des sucres après fermentation (moyenne des résultats sur les échantillons de pomme de terre et blé (C3) et de maïs (C4) présentés dans le Tableau 27 (chapitre 6 – paragraphe 2.2)).....	157

Tableau 33. Différence de déviation isotopique entre amidons et éthanols produits lors de la fermentation alcoolique mesurée par SMRI (d'après Hobbie et Werner (2003) [54]) et calculée théoriquement sur les amidons analysés dans le paragraphe 2.....	157
Tableau 34. Récapitulatif des valeurs des écarts à la valeur globale $\Delta\delta_i(^{13}\text{C})$ , exprimés en ‰, obtenues sur les sucres de différentes origines.....	162
Tableau 35. Ecart à la valeur globale des déviations isotopiques $\Delta\delta_i(^{13}\text{C})$ sur chaque site carboné d'un glucose provenant de l'hydrolyse d'amidon foliaire de <i>Xanthium strumarium</i> .....	169
Tableau 36. Déviations isotopiques $\delta_i^{13}\text{C}$ sur chaque site carboné du TAMAGF obtenu après silylation sélective du MAGF commercial à 50% et sur le TAMAGF de référence (TAMAGF ref.) obtenu par acétylation du même MAGF commercial.....	177
Tableau 37. Effets isotopiques d'équilibre (EIE) exprimés en ‰ sur chaque site carboné du glucose lors d'un équilibre fructose-glucose établi par la glucose isomérase. Deux expériences ont été effectuées pour chaque sucre de départ (glucose et fructose). Les $\beta$ -facteurs calculés pour cet équilibre sont aussi présentés.....	180
Tableau 38. Effet isotopique cinétique exprimé en ‰ sur chaque site carboné du glucose lors de la transformation partielle du fructose en glucose par la glucose isomérase.....	182

# Liste des travaux réalisés pendant la thèse

## Articles dans des revues disposant d'un comité de lecture

1-Accurate Quantitative Isotopic  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy for the Determination of the Intramolecular Distribution of  $^{13}\text{C}$  in Glucose at Natural Abundance. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Richard J. Robins and Gérald S. Remaud.** (*Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 8978–8985).....

2- Impact of environmental factors on the intramolecular  $^{13}\text{C}$  distribution in glucose from European grapevines accessed by the site-specific  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of ethanol determined by isotopic  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Nicolas Segebarth, Claude Guillou, Richard J. Robins and Gérald S. Remaud.** (Article soumis à *Plant Cell & Environment*)

3-On the consequence of the chemical shift isotope effect on the accuracy of  $^{13}\text{C}$  NMR measurements of site-specific isotope ratios. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Richard J. Robins and Gérald S. Remaud.** (Article soumis à *Analyst*)

4- Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR reveals discrepancy in  $^{13}\text{C}$  intramolecular distribution between glucose and fructose at natural abundance. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Richard J. Robins and Gérald S. Remaud.** (article en préparation)

## Communications dans des congrès

1- The determination of natural site-specific  $^{13}\text{C}$  isotopic deviation in sugars by quantitative  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Alexis Gilbert, Richard J Robins, Gérald Remaud.** Joint European Stable Isotope User Meeting (JESIUM) 2008 (presqu'île de Giens 31 août – 5 septembre 2008). (Communication orale)

2- Intramolecular  $^{13}\text{C}$  distribution in carbohydrates from different metabolisms using quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Richard J. Robins, Gérald S. Remaud.** The 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis (21-22 avril 2009, Stockholm, Suède). (Communication orale)

- 3- Quantitative NMR requirements for isotope ratio determination : illustrations of isotopic  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry. **Gérald S. Remaud, Virginie Silvestre, Serge Akoka, Eliot Botosoa, Alexis Gilbert, Richard J. Robins**. The 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis (21-22 avril 2009, Stockholm, Suède). (Communication par affiche)
- 4- Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry as a new tool for isotope fractionation studies. **Gérald S. Remaud, Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Eliot P. Botosoa, Serge Akoka, Richard J. Robins**. Isotopes 2009 (25-29 mai 2009, Cluj-Napoca, Roumanie). (Communication orale)
- 5- Discrimination isotopique en carbone 13 durant la photosynthèse: performance de la RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative comme outil d'investigation. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Richard J. Robins, Gérald S. Remaud**. Journées Scientifiques de l'école doctorale 3MPL (2-3 Juillet 2009, Angers). (Communication orale)
- 6- Apport de la RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative pour l'étude du fractionnement isotopique naturel au cours de la photosynthèse. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Richard J. Robins, Gérald S. Remaud**. (Journées Jeunes Chercheurs de la SFIS (22-23 octobre 2009, Thiverval - Grignon). (Communication orale)
- 7- Determination of the isotope effects in the glucose to fructose conversion by isomerase using quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR. **Alexis Gilbert, Virginie Silvestre, Richard J. Robins, Gérald S. Remaud**. ISI 2010 (21-25 Juin 2010, Amsterdam, Pays-Bas). (Communication par affiche prévue, en attente de confirmation par le comité d'organisation)

## **Méthodologies pour l'étude du fractionnement isotopique photosynthétique et post-photosynthétique par RMN $^{13}\text{C}$ isotopique**

Une méthodologie a été mise au point, permettant de déterminer la teneur isotopique en carbone 13 sur chaque site carboné du glucose, du fructose et du saccharose par RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique. La dérivation des sucres en dérivés acétonides est un pré requis nécessaire à l'obtention de l'information souhaitée. Une fois le protocole pour la dérivation mis en place, la méthodologie montre une précision de l'ordre de 1‰. L'analyse d'éthanol, provenant de la fermentation alcoolique des sucres analysés, montre une cohérence des résultats obtenus par la méthodologie employée sur les sucres. La molécule d'éthanol a été utilisée comme molécule sonde pour montrer une influence du climat (température, ensoleillement, précipitations) sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  des sucres issus de la vigne. De plus, les données récoltées sur différents échantillons d'amidon ou de saccharose issus de plantes à métabolisme C3 ou C4 montrent une influence du type de plante sur la distribution isotopique intramoléculaire en  $^{13}\text{C}$  de ces sucres. Les hypothèses formulées permettent de mettre en avant le fait que le mécanisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  (C3 ou C4) n'est pas uniquement responsable des différences observées. Les réactions d'isomérisation (impliquant les trioses phosphates et les hexoses phosphates) apparaissent comme étant déterminantes en terme de fractionnement isotopique observé sur les sucres issus de la photosynthèse. Nous avons donc mesuré les effets isotopiques associés à la transformation du glucose en fructose, catalysée par la glucose isomérase. Les résultats montrent un effet à l'équilibre qui tend à enrichir la position C-1 et à appauvrir la position C-2 du glucose, et un effet isotopique cinétique important sur le C-2 lors de la transformation du fructose en glucose.

Mots-clés : RMN  $^{13}\text{C}$  isotopique - fractionnement isotopique – glucose - fructose – saccharose – photosynthèse - glucose isomérase

## **Methodologies for the study of photosynthetic and post-photosynthetic isotopic fractionation using isotopic $^{13}\text{C}$ NMR**

A methodology has been developed that makes possible the determination of the site specific carbon-13 isotopic composition of glucose, fructose and sucrose using isotopic  $^{13}\text{C}$  NMR. The derivatization of sugars as their acetonides is a prerequisite to accessing the desired information. Once the protocol for the derivatization was perfected, the methodology can attain a precision of 1‰ or better. Analyses of ethanol derived from sugars by fermentation show a good correlation with results obtained by the methodology developed. The ethanol molecule has also been used as a probe to show the influence of climatic parameters (temperature, sunshine, rainfall) on the intra-molecular  $^{13}\text{C}$  isotope distribution in sugars from grapes. Moreover, results for sugars or starch from plants having C3 or C4 metabolism show there to be an intra-molecular  $^{13}\text{C}$  distribution characteristic of the type of carbon assimilatory pathway exploited. The hypothesis proposed here indicates that the  $\text{CO}_2$  assimilation mode is not the only factor affecting the intra-molecular  $^{13}\text{C}$  distribution in sugars. It appears that isomerisation steps (involving trioses phosphates or hexoses phosphates) are crucial in terms of isotopic fractionation in the sugars produced during photosynthesis. We have therefore measured the isotope effects associated with the transformation of glucose to fructose, catalysed by glucose isomerase. A clear equilibrium isotope effect is observed, which is shown to be responsible for the C-1 enrichment and the C-2 depletion of glucose, and a significant kinetic isotope effect on the C-2 of glucose is also seen during the conversion of fructose to glucose.

Keywords: Isotopic  $^{13}\text{C}$  NMR – isotope fractionation – glucose – fructose – sucrose – photosynthesis – glucose isomerase