



**HAL**  
open science

# Fractionnement du dioxygène lors des processus biologiques : application à la reconstruction de la productivité passée de la biosphère

Clémence Paul

► **To cite this version:**

Clémence Paul. Fractionnement du dioxygène lors des processus biologiques : application à la reconstruction de la productivité passée de la biosphère. Climatologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASJ002 . tel-04496254

**HAL Id: tel-04496254**

**<https://theses.hal.science/tel-04496254>**

Submitted on 8 Mar 2024

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

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

# Fractionnement du dioxygène lors des processus biologiques : application à la reconstruction de la productivité passée de la biosphère

*Oxygen fractionation associated with biological processes: application to  
the reconstruction of the past biosphere productivity*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°129, sciences de l'environnement d'Île-de-France (SEIF)

Spécialité de doctorat : Géosciences

Graduate School : Géosciences, climat, environnement et planètes.

Référent : Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **LSCE** (Université Paris-Saclay, CNRS, CEA, UVSQ), sous la direction d'**Amaëlle LANDAIS**, directrice de recherche et sous le co-encadrement de **Clément PIEL**, ingénieur de recherche.

Thèse soutenue à Gif-sur-Yvette, le 18 janvier 2023, par

**Clémence PAUL**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

**Jérémy JACOB**

Directeur de Recherche, LSCE

Président

**Samuel ABIVEN**

Professeur, ENS Ulm

Rapporteur & Examineur

**Bruno MALAIZE**

Maître de conférences, HDR, EPOC

Rapporteur & Examineur

**Nathalie COMBOURIEU-NEBOUT**

Directrice de recherche, CNRS-  
MNHP

Examinatrice



**Titre :** Fractionnement du dioxygène lors des processus biologiques : application à la reconstruction de la productivité passée de la biosphère

**Mots clés :** cycle de l'oxygène, fractionnement isotopique, paléoclimat, effet Dole, productivité, dioxygène

**Résumé :** La composition isotopique du dioxygène piégé dans les bulles d'air des carottes de glace peut être utilisée pour reconstituer la productivité globale de la biosphère dans le passé ainsi que pour documenter l'évolution du cycle de l'eau aux basses latitudes. Le travail de cette thèse a été d'améliorer l'interprétation du  $\delta^{18}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$ . Pour cela, nous avons affiné la détermination des différents coefficients de fractionnement associés au cycle de l'oxygène au niveau de la biosphère terrestre, c'est-à-dire pendant les processus de respiration et de photosynthèse. Afin de quantifier ces coefficients de fractionnement, nous avons développé un nouveau dispositif expérimental qui repose sur un système de chambres biologiques fermées multiplexées dans lesquelles tous les paramètres environnementaux sont contrôlés, stabilisés et mesurés. Ces chambres biologiques fermées ont un volume de 120 L permettant d'étudier un système « plante + sol ». La première étape a été de développer un prototype avec une seule chambre biologique et de faire une première étude sur de la fétuque (*Festuca arundinacea*). Ensuite, un deuxième développement a permis de travailler sur plusieurs chambres biologiques via un système multiplexé.

Ensuite, un deuxième développement a permis de travailler sur plusieurs chambres biologiques via un système multiplexé. Nous avons aussi développé un instrument de spectrométrie optique (SARA- $\text{O}_2$ ) afin de mesurer en continu la concentration et composition isotopique de l' $\text{O}_2$  pendant les expériences en chambres multiplexées. Ceci remplace la mesure par spectrométrie de masse d'échantillons prélevés dans les chambres de façon manuelle. Ce système a permis d'étudier les coefficients de fractionnement pour plusieurs plantes (fétuque, bananier, laurier, maïs). Nous avons notamment mis en évidence un fractionnement isotopique associé à la photosynthèse terrestre. Les fractionnements biologiques trouvés lors de ces expériences ont finalement été intégrés dans des calculs globaux de composition isotopique du dioxygène de l'air et comparés aux mesures effectuées sur la dernière déglaciation. Ceci permet de conclure que les variations passées de  $\delta^{18}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$  dans l'atmosphère sont principalement liées aux variations du cycle hydrologique aux basses latitudes.

**Title:** Oxygen fractionation associated with biological processes: application to the reconstruction of the past biosphere productivity

**Keywords :** oxygen cycle, isotopic fractionation, paleoclimate, Dole effect, productivity, dioxygen

**Abstract:** The isotopic composition of oxygen trapped in air bubbles in ice cores can be used to reconstruct the global productivity of the biosphere in the past, as well as to document the evolution of the water cycle at low latitudes. The aim of this thesis was to improve the interpretation of  $\delta^{18}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$ . Thus, we improved the determination of the various fractionation coefficients associated with the oxygen cycle at the level of the terrestrial biosphere, i.e. during the processes of respiration and photosynthesis. To quantify these fractionation coefficients, we have developed a new experimental set-up based on a system of multiplexed closed biological chambers in which all environmental parameters are controlled, stabilized and measured. These closed biological chambers have a volume of 120 L, enabling us to study a "plant + soil" system. The first step was to develop a prototype with a single biological chamber and carry out an initial study on fescue (*Festuca arundinacea*). This was followed by a second

development, enabling us to work on several biological chambers via a multiplexed system. We also developed an optical spectrometry instrument (SARA- $\text{O}_2$ ) for continuous measurement of  $\text{O}_2$  concentration and isotopic composition during multiplexed chamber experiments. This replaces manual mass spectrometry measurements of samples taken from the chambers. This system has enabled us to study fractionation coefficients for several plants (fescue, banana, laurel, maize). In particular, we highlighted isotopic fractionation associated with terrestrial photosynthesis. The biological fractionations found in these experiments were finally integrated into global calculations of the isotopic composition of atmospheric oxygen, and compared with measurements taken during the last deglaciation. This led to the conclusion that past variations in the  $\delta^{18}\text{O}$  of the  $\text{O}_2$  in the atmosphere are mainly linked to variations in the hydrological cycle at low latitudes.



## REMERCIEMENTS

---

Voilà maintenant trois ans de thèse achevés, entourés par de magnifiques personnes qui ont rendu ces années si précieuses. Sans oublier ceux qui ont toujours été là au cours de mes 26 années et ceux qui les ont marquées à jamais. Je profite de ce temps pour vous remercier chacun.e.

Ce premier remerciement, pour Amaëlle, merci d'avoir eu confiance en moi pour tout ce travail et de m'avoir proposé ce sujet de thèse si original et passionnant. Je n'oublierai pas la directrice de thèse incroyable que tu as été, à tout point de vu. J'en ai eu de la chance.

Clément, je te remercie évidemment pour tout le temps consacré à Montpellier et au téléphone afin de m'encadrer dans cette thèse. Merci de m'avoir permis de me former de manière si pédagogique sur tous les aspects techniques et d'ingénieries qui étaient très loin de mon monde d'étude et personnel. Merci pour toute ton attention, ta gentillesse et ton humour.

Merci pour ce duo d'encadrement incroyable.

Joana, merci d'avoir accompagné tout ce projet et qu'il ait pu aboutir, car cela n'a pas toujours été une mince affaire. Je n'oublierai pas tout ton dynamisme, ta sympathie qui rendent le travail avec toi vraiment super.

Je tiens à remercier également le jury qui a accepté de rapporter et examiner cette thèse. Merci pour tous vos commentaires précieux.

Mes amis, désormais, de l'équipe GLACCIOS :

Antoinitus, une chose est sûre : tu es une personne et un ami formidable. Une de mes plus belles rencontres dans la vie, merci ma petite resta d'amour.

Titouan, cette connexion si forte (dès les premières discussions) a été vraiment très importante pendant la thèse mais aussi dans ma vie en général. Merci d'être là et l'ami que tu es. Merci pour cette amitié qui m'est très chère et sacrée.

Marie, ma petite boule d'énergie, de sourire et de bonheur. Je suis si heureuse que nos chemins se soient croisés, que l'on ait pu partager plein de belles choses ensemble, lors de cette thèse mais pas que. A nos discussions bienveillantes, les vacances, les soirées, les fous rires. Merci du fond du cœur pour la si belle personne que tu es !

Cécile, ma co-bureau d'amour, mais bien plus. Merci pour tous ces moments de partage ensemble mais aussi toutes tes très belles attentions. Tu n'oublies jamais ceux que tu aimes et c'est une qualité bien rare.

Sören, nos discussions et partages ont été un réel plaisir, elles permettaient de pouvoir s'évader un peu du monde scientifique et ça je m'en souviendrai.

Roxanne, merci pour tout, à la fois l'aide que tu as toujours su donner pour les manips et pour toutes nos séances papotages trop chouettes. Belle vie à toi à Grenoble.

Thomas, tout le partage que l'on a pu avoir avec la musique et les concerts (et plein d'autres choses), ça c'était vraiment extra. Puis bon, faut que tu passes faire une soirée à l'appart quand même quand tu feras autre chose que d'aller en Antarctique (hihi).

Niels, merci pour les découvertes opéras, les discussions films, musiques, spectacles et toute la tendresse que tu peux dégager.

Nicolas, enfin un partenaire de recherche et avec comme bonus d'être une personne ultra fun. Merci !

Evidemment, je remercie toute l'équipe GLACCIOS avec laquelle j'ai passé de super moments: Cécile A., merci pour ta gentillesse sans limite, Elise, méga chef d'équipe, Marie K. (et Jules hihi), Inès, Morgane, Françoise, Jeanne, Jean, Justin, Bénédicte, Matthieu, Ji-Woong et Romilly. Merci Olivier pour toute l'aide pour les manips à l'ECOTRON et python. Et Fred, autant pour ta patience pour les manips que pour les découvertes chocolats et gâteaux à Paris.

Je pense à tous les stagiaires qui ont passé quelques mois au LSCE : Cyrielle (tu me manques), Gabriel, Baptiste, Titouan M., Coralie, Léa et Adrien.

Je pense aussi très fort aux copains du 714 : Mathis, Mali, Chulien (merci à ICOS de m'avoir adopté, je vous aime), Victor, Yann, Brian, Marie et Germain.

Le copain Etiennitus de l'IGE, heureuse de t'avoir rencontré et partagé de beaux moments avec toi mister Docteur.

Et une amitié extra qui a vu le jour à la fin : Marouane. Tu sais déjà beaucoup, merci d'avoir été là (les pauses, on sait de quoi je parle) et de l'être toujours, merci de m'avoir appris tant de belles choses. Reste qui tu es, tu es génial (et cha-rismatique avant tout).

Et sans oublier les collègues de l'ECOTRON : Seb, merci pour tout, Manu pour les discussions, Damien, Alex, Hélène, Abdel, Bastien et Maël. Et l'ECOTRON de Nemours : Sara et Simon. Ainsi que la DT-INSU, Nicolas et Benoît pour ce magnifique travail.

Je remercie aussi Daniele, AP2E pour tout l'accompagnement pour le bon fonctionnement du SARA-O<sub>2</sub>, cela n'a pas toujours été facile et je vous en remercie !

Pour ton aide, je te remercie aussi Thomas Extier.

Merci au comité de thèse, M.Ogée et Mme.Alexandre pour tout l'enrichissement et le recul que vous m'avez apporté.



Je pense fortement à l'équipe enseignante du LSCE qui m'a permis de pouvoir enseigner pendant la thèse mais aussi d'être maintenant ATER. Merci à tous. Fortes pensées pour Tiphaine, Maxime L. et Valérie. Maxime T., je suis super heureuse que l'on puisse travailler ensemble cette année en géol et gérer à nous deux une méga UE. Un remerciement spécial à toi Edwige : tu m'as encouragé, soutenu, aidé depuis le début de la thèse pour le professorat. Je pèse mes mots en disant que tu as été vraiment très importante durant ces années.

Maintenant, un remerciement spécial pour les enseignants que j'ai pu avoir pendant toute ma scolarité et qui ont eu un rôle non négligeable sur la voie que j'ai choisie.

Je pense à Nicole, à vous Laurence et Lilly, à M.Garnaud, M.Peydemet, M.Goya, Mme.Noguez. A mes enseignants du supérieur : Mme.Ayherre, M.Gillet, M.Martinez, M.Malaizé de Bordeaux. Un immense merci à vous. Je ne peux pas omettre les profs d'Agreg pour tout ce que vous avez fait pour nous : Samuel, Hélène et M.Barthole. Merci Sophie S. pour l'aide et l'encouragement pour la thèse et à Stéphanie D-A qui m'a encouragé et cru en moi pour la thèse. Merci M.Barthole, un enseignant comme vous c'est rare et très précieux. En parlant de l'équipe de l'Agreg, je remercie aussi Jean-Valéry, Chrystelle, Sami, MAS et M.Lecointré. Hélène Z., merci pour la super tutrice que tu as été.

Un merci tout particulier à toi Christophe Delgado, tout a commencé avec tes cours merveilleux.

Mes amis de la prépa Agreg : Val, Cécile, Melissa, Yoyo. Et Mathilde, bien sûr.

Mes amies de la fac : Maud, merci pour absolument tout, heureusement que tu as été là dans ma vie Margaux, vous me manquez.

Mes amis de la prépa BCPST : Gaëtan, Soizic et Jeanne.

Maeva, mon petit tigrou que j'aime, depuis le collège et on est toujours là, hihi.

Gros bisous à toi aussi Rominou.

Laura, de l'école jusqu'à Bordeaux et quand tu reviendras, j'ai hâte de te revoir.

Micka, merci d'avoir été là à Massy, bien plus fun avec toi !

Je pense aussi très fort aux collocs du plateau : Hector, Yann et Orane pour cet accueil si bienveillant, chaleureux, un énorme merci pour tout le bien-être que vous m'avez apporté. Et aussi, les nouveaux amis Apo, Fred, Dani, Jojo et Romain pour les supers soirées et moments très stylés.

Des bisous à Kati et Domi.

Désormais, ces remerciements pour ma famille et celle que je me suis construite.

A David, parce qu'on a grandi ensemble, parce qu'on a tant partagé et écrit une belle histoire. L'amour et le soutien que tu m'as apportés sont gravés. Une douce pensée à toi aussi Maria, merci pour tout.

A ma famille, Dominique, Laurent, Jeanne, Marie, Noélie, Nathanaël, Côme et Romane.

A Daniel et Marie-Claude, Lucile et Juliette et les enfants. Merci Daniel pour les échanges que l'on a pu avoir dernièrement et qui m'ont extrêmement touchés.

A Xan, pour la merveilleuse personne que tu es et qui m'a toujours soutenue.

A Marine, ma meilleure amie depuis plus de 10 ans. Je te remercie pour tout, pour ton amitié, ta bienveillance, ta confiance, ta présence, ta douceur, ton soutien inébranlable... Absolument tout quoi. On en aura vécu des choses toutes les deux. Je te serai éternellement reconnaissante, ma meilleure amie pour la vie. Je t'aime très fort, tu le sais. Et je pense aussi à ta famille, bien sûr que j'adore et qui m'a toujours accueillie à bras ouverts.

A Soline, heureusement que l'on s'est rencontrée en prépa, heureusement que l'on a autant ri et partagé (des burgers eheh). La liste serait tellement grande si on se mettait à énumérer tous les fous rires et nos si beaux moments d'amitiés. Je n'ai jamais autant ri qu'avec toi et c'est toujours le cas. Je t'aime très fort ma truie d'amour, merci pour tout. Tu es une amie si généreuse et si forte, j'admire tellement tes qualités. Merci pour la place si importante que tu m'as accordée pour votre mariage avec PA (à qui je fais de très gros bisous). Merci d'être l'amie que tu es.

A Papy Loulou, Papy Jean.

A Mamie Jojo, l'admiration que je te porte et tout l'amour que tu m'as apporté me sont si précieux.

A Mamie Christiane. Tu es toujours à mes côtés et me protèges. Nos souvenirs me sont très chers et gravés à jamais.

A Roméo.

A Augustine et Jean-Louis, ma famille agrandie, que j'aime depuis mes 3 ans profondément.

A Dominique C., mon tonton de cœur, depuis et pour toujours. Merci.

A Catherine, Vincent, Maxime et mamie Claudette, ma nouvelle famille en or. Merci déjà pour tout.

A ma Loulou. Ma grande sœur, ma deuxième maman. L'amour et l'admiration que je te porte ne peut pas se décrire en quelques lignes. Tu es une merveilleuse sœur et maman (de Groubzounette hein). Tu es un peu le modèle de ma vie quoi (devenir une mini toi n'a pas toujours été une mince affaire...). Je t'aime si fort ma loulou. A Théo, évidemment, best beau-frérot et papa.

Au plus beau cadeau et c'est toi Michelle. Ma Boubouche, ma Gribz pour la vie.

A Papa et Maman. Difficile de n'écrire que quelques lignes tant il y a de remerciements que j'aimerais vous faire. Merci pour tout l'amour que vous m'avez donné, merci pour l'accompagnement dans toutes les péripéties scolaires, des plus compliquées aux plus belles, merci d'avoir toujours été là pour m'écouter, me conseiller et surtout croire en moi. Ça, toujours, vous n'avez jamais lâché. J'ai réussi à croire en mes projets grâce à vous. Puis, je ne mentionne même pas la quantité de belles choses que vous m'avez apprises, montrées, faites découvrir. Je suis très admirative des parents que vous êtes. Je vous aime du fond du cœur Maman et Papa.

Ce dernier, à Clément, je t'aime si fort.



## Table des matières

|   |    |
|---|----|
| REMERCIEMENTS .....   | 6  |
| Introduction .....  | 14 |
| Objectifs et stratégie de la thèse .....  | 17 |
| Organisation du manuscrit .....   | 18 |
| Chapitre 1 : Variations passées de la composition isotopique de l'oxygène et lien avec le paléoclimat .....                                       | 20 |
| 1.1. Les isotopes de l'oxygène.....   | 20 |
| 1.2. Fractionnements dans le cycle de l'oxygène .....   | 25 |
| 1.2.1. Définition du $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ .....   | 25 |
| 1.2.2. Fractionnements dans le cycle de l'eau .....   | 26 |
| 1.2.3. Fractionnements dans le cycle de l'oxygène associés aux processus biologiques .....  | 34 |
| 1.2.4. Intégration de ces fractionnements au concept de l'Effet Dole .....  | 42 |
| 1.3. Variabilités du $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ .....   | 45 |
| 1.3.1. Contexte paléoclimat : généralités sur le climat du Quaternaire.....   | 45 |
| 1.3.2. Variabilité à l'échelle orbitale du $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ .....   | 49 |
| 1.3.3. A l'échelle millénaire .....   | 53 |
| 1.4. L'effet Dole global : évolution des idées en lien avec les fractionnements respiratoires et photosynthétiques océaniques et terrestres ..... | 59 |
| 1.4.1. Les premières interprétations de l'effet Dole : un rôle important donné au rapport de la productivité océanique vs terrestre.....          | 60 |
| 1.4.2. Nouvelles estimations et réinterprétations de l'effet Dole comme traceur du cycle hydrologique des basses latitudes .....                  | 66 |
| 1.5. Synthèse sur l'interprétation de l'effet Dole global.....  | 73 |
| 1.6. Conclusion .....   | 78 |
| Chapitre 2 : Matériels et méthodes .....  | 79 |
| 2.1. Mesures de la composition isotopique de l'oxygène de l'air en système fermé dans des chambres biologiques.....                               | 80 |
| 2.1.1. Description du montage de la chambre biologique fermée et contrôlée.....   | 80 |
| 2.1.2. Article : <i>A multiplexing system for quantifying oxygen fractionation factors in closed chambers</i> .....                               | 85 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.2. Analyses et préparations des échantillons d'air et d'eau .....  | 117 |
| 2.2.1. Lignes de purification .....  | 117 |
| 2.2.2. Ligne d'extraction de l'eau des feuilles.....   | 123 |
| 2.2.3. Fluorination : transformation de l'eau en O <sub>2</sub> pour l'analyse de la composition isotopique triple de l'oxygène dans l'eau .....   | 125 |
| 2.3. Instruments de mesures .....  | 127 |
| 2.3.1. Spectromètres de masse .....  | 127 |
| 2.3.2. Spectromètre optique (technique OF-CEAS).....   | 129 |
| Chapitre 3 : <i>Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation-soil-atmosphere analog of the terrestrial biosphere in closed chambers</i> .....   |     |
| 3.1. Introduction .....  | 139 |
| 3.2. Article : <i>Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation-soil-atmosphere analog of the terrestrial biosphere in closed chambers</i> ..... | 139 |
| Chapitre 4 : <i>Air oxygen fractionation associated with respiration and photosynthesis processes in C3 and C4 plants: impact on the study of the global Dole effect</i> .....   |     |
| 4.1. Introduction .....  | 170 |
| 4.2. Article en préparation : <i>Air oxygen fractionation associated with respiration and photosynthesis processes in plants: impact on the study of the global Dole effect</i> .....  | 171 |
| Conclusion .....   | 223 |
| Perspectives .....   | 225 |
| Références du manuscrit .....  | 226 |
| Annexes .....  | 246 |
| Article soumis : <i>High precision <math>\delta^{18}\text{O}</math> measurements of atmospheric dioxygen using optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy (OF-CEAS)</i> .....                                  | 246 |

## Introduction

Après la sortie du 6<sup>ème</sup> rapport du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat), les constatations et prévisions montrent une hausse de la température globale toujours plus accentuée depuis la période préindustrielle (1850-1900). Une hausse de 1.5°C devrait être atteinte dans les années 2030 à 2052 si les activités humaines continuent au même rythme qu'actuellement. Cette évolution de la température est principalement liée aux émissions humaines de gaz à effet de serre qui sont toujours plus élevées : la concentration en CO<sub>2</sub> a atteint 410 ppm, valeur jamais atteinte depuis 2.5 millions d'années, à la fin du Pliocène. Le Pliocène (5,3 à 2,5 millions d'années avant aujourd'hui) est l'époque géologique qui précède le Quaternaire, période dans laquelle nous vivons. Le climat y était plus chaud (2 à 5 °C supérieur qu'à la période préindustrielle), les calottes polaires plus petites et le niveau de la mer plus élevé de 20 mètres. Actuellement, le réchauffement climatique est indéniable et résulte des activités humaines dont les conséquences sont et seront sociales et environnementales. La biodiversité s'effondre, l'eau devient de plus en plus rare et les événements extrêmes, telles que les inondations, les incendies, les canicules, les sécheresses et les cyclones deviennent de plus en plus fréquents.

Pour affiner les prévisions climatiques et savoir quelles actions mener pour espérer limiter le changement climatique et environnemental en cours, il est nécessaire de décrire l'ensemble des liens et des interactions entre les différents réservoirs sur Terre afin de comprendre les mécanismes en jeu dans le réchauffement climatique ainsi que dans le système en général. Pour mieux comprendre les interactions entre l'atmosphère, l'océan, la cryosphère et la biosphère, il est intéressant d'utiliser des modèles climatiques qui permettent de simuler l'évolution de ces compartiments et d'étudier le plus finement possible les scénarios futurs. Cependant, le développement des modèles de climats nécessite d'avoir un maximum de connaissances sur l'ensemble

des paramètres liés aux changements climatiques passés pour pouvoir faire le lien avec l'actuel et le futur.

Ainsi, de nombreuses études sont réalisées par les paléoclimatologues sur des archives climatiques. Etudier les interactions et ses évolutions entre les différents paramètres climatiques dans le passé grâce aux archives permet de mieux comprendre les mécanismes en jeu et possiblement de pouvoir comparer ou trouver des similarités avec la période actuelle. C'est le cas, avec l'étude des changements climatiques de très grande ampleur qui impliquent tous les compartiments du système Terre et un changement important de la concentration atmosphérique en CO<sub>2</sub> comme par exemple lors la dernière déglaciation. Les interglaciaires, ayant atteint des températures plus élevées qu'actuellement, comme les stades isotopiques marins (MIS) 5 et 11, sont ainsi des périodes pertinentes à étudier dans la perspective d'un climat futur plus chaud.

Dans cette thèse, je me suis intéressée plus particulièrement au compartiment biosphère et à ses évolutions lors du Quaternaire (2.588 Ma jusqu'à aujourd'hui). De nombreuses archives permettent d'étudier le rôle de la biosphère terrestre et océanique, dont le rôle n'est pas négligeable puisqu'elles sont des puits de carbone. Les plantes produisent leur biomasse à partir de la captation de CO<sub>2</sub> par le mécanisme de la photosynthèse (productivité). Une des grandes inquiétudes actuelles est l'effondrement de la biodiversité car celle-ci serait associée à la destruction des puits de CO<sub>2</sub>, ce qui engendrerait des concentrations atmosphériques en CO<sub>2</sub> encore plus élevées.

Cependant, comment comprendre les mécanismes associés à la productivité biologique ? Comment pouvoir reconstruire son évolution dans le passé ? Tout d'abord, des traceurs régionaux dans les carottes sédimentaires permettent de reconstruire les variations passées de la productivité de la biosphère marine. D'une part, la productivité biologique dans les océans peut être étudiée à l'aide de microfossiles comme les foraminifères planctoniques, coccolithophoridés et les



diatomées. Ces organismes, grâce à leur squelette en carbone, sont des traceurs essentiels pour étudier la pompe-biologique, soit, l'étude de la séquestration du carbone dans les profondeurs de l'océan (Duchamp et al., 2018). Cela permet de reconstruire l'efficacité de cette pompe biologique et ainsi à travers ce processus d'étudier la productivité biologique océanique. Sur les continents, la reconstruction de la productivité terrestre peut se faire grâce aux assemblages polliniques pour étudier l'abondance et la diversité de la végétation (Hes et al., 2021). Ces traceurs permettent ainsi de reconstruire la productivité au niveau local. Il est indispensable de combiner les différentes informations locales entre elles pour estimer les variations globales de productivité de la biosphère et leur effet sur la concentration atmosphérique de CO<sub>2</sub>. En parallèle, les carottes de glace en Antarctique peuvent permettre d'avoir accès à des traceurs liés à la productivité globale de la biosphère. En effet, les carottes de glace renferment des bulles d'airs fossilisées depuis 800 000 ans sur le site de Dome C (EPICA members, 2004). Notamment, l'étude de la composition isotopique triple de l'oxygène de l'O<sub>2</sub> (ou  $\Delta^{17}\text{O}$  de O<sub>2</sub>) piégé dans celles-ci peut permettre de quantifier les flux d'oxygène liés à la productivité de la biosphère globale (Yang et al., 2022). De même, il a été proposé que la composition isotopique, le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'O<sub>2</sub>, pouvait renseigner sur la proportion relative de la productivité océanique et de la productivité terrestre (Bender et al., 1994 et Hoffmann et al., 2004).

Dans cette thèse, afin d'affiner la quantification de la productivité terrestre dans le passé à partir des mesures effectuées dans les carottes de glace, j'utilise l'étude de l'oxygène de l'air pour mieux comprendre le cycle de l'oxygène qui relie un ensemble de compartiments climatiques : la biosphère terrestre et l'atmosphère. Plus particulièrement, je me suis concentrée sur les flux d'oxygène et les fractionnements isotopiques associés lors des processus biologiques dans la biosphère terrestre, c'est-à-dire lors de la respiration et de la photosynthèse.

## Objectifs et stratégie de la thèse

La composition isotopique du dioxygène piégé dans les bulles d'air des carottes de glace peut être utilisée pour reconstituer la productivité globale de la biosphère dans le passé comme nous l'avons vu précédemment (Bender et al., 1994 ; Luz et al., 1999 ; Malaizé et al., 1999). Elle est aussi influencée par l'évolution du cycle de l'eau aux basses latitudes (Severinghaus et al., 2009 ; Blunier et al., 2002 ; Landais et al., 2010 ; Luz et Barkan, 2011). A cause de ces différentes influences, il reste difficile d'utiliser de façon quantitative la composition isotopique de l'oxygène de l'O<sub>2</sub> pour reconstruire la productivité biosphérique du passé ou le rapport de productivité entre l'océan et le terrestre dans le passé. Ceci est le résultat d'une connaissance incomplète des coefficients de fractionnement associés aux processus biologiques. Ainsi, pour une quantification plus fine de la productivité passée de la biosphère, il est important de déterminer les différents processus de fractionnement qui se produisent dans la biosphère pendant les processus de respiration et de photosynthèse. L'objectif de cette thèse est d'améliorer la quantification de ces coefficients de fractionnement. Très peu d'études ont été menées sur le sujet et la plupart d'entre elles ont eu lieu dans des conditions de laboratoire peu réalistes et à l'échelle du microorganisme. Le but de cette thèse est de travailler à une échelle plus réaliste, celle d'un petit écosystème et d'effectuer des expériences reproductibles afin d'avoir une quantification solide des coefficients de fractionnement. Nous avons donc développé des chambres biologiques fermées et multiplexées dont tous les paramètres climatiques sont contrôlés et stables. Un des défis est aussi de pouvoir suivre la composition isotopique du dioxygène en continu pendant les expériences menées dans les chambres biologiques et pour cela, nous avons développé un instrument de spectroscopie optique adapté à notre objectif. Une fois le système analytique développé, il est possible de l'appliquer pour différents types de plantes ayant un fonctionnement différent dans la consommation et la production du dioxygène (par exemple, les plantes C<sub>4</sub> ne font pas la photorespiration

à l'opposé des plantes C3). Finalement, les coefficients de fractionnement déterminés doivent permettre de revisiter l'interprétation en termes de productivité de la biosphère des séries de composition isotopique du dioxygène dans les carottes de glace.

## Organisation du manuscrit

Le chapitre 1 introduit les concepts fondamentaux du cycle de l'oxygène, la composition isotopique de l'oxygène ainsi que le mécanisme de fractionnement dans un premier temps. Il est également introduit le concept d'effet Dole qui mesure la différence entre la composition isotopique de l'oxygène de l'air atmosphérique et la composition isotopique de l'oxygène de l'eau de l'océan. Dans un deuxième temps, le chapitre 1 se focalise sur les mécanismes biologiques et hydrologiques liés au cycle de l'oxygène ainsi que les mécanismes de fractionnements associés et les dernières valeurs en date de la littérature. Dans un troisième temps, le chapitre 1 décrit les variabilités temporelles à l'échelle des derniers 800 000 ans de la composition isotopique du dioxygène en parallèle aux variations climatiques et de la concentration atmosphérique de CO<sub>2</sub>. Dans une dernière partie, je présente l'état de l'art au début de cette thèse pour l'interprétation de l'effet Dole et du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ .

Le chapitre 2 se focalise sur l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours de cette thèse afin de pouvoir étudier les fractionnements associés à une diversité de plantes et d'un sol. Une première partie décrit le principe de la chambre biologique utilisée et le premier prototype. La grande nouveauté dans l'approche menée pendant ma thèse est d'étudier les fractionnements non pas à l'échelle cellulaire et de l'organisme, mais de les étudier à l'échelle sol-plantes-atmosphère pour se rapprocher de la réalité. Ensuite, un développement ultérieur a permis de travailler sur plusieurs

chambres biologiques en parallèle par le développement d'un système multiplexé. Ce travail a été effectué à l'ECOTRON de Montpellier : le développement du multiplexage est décrit dans l'article Paul et al. (*preprint*). Dans cet article, il est aussi expliqué l'intérêt de l'instrument de spectrométrie optique (SARA-O<sub>2</sub>) développé pour mesurer en continu la concentration et composition isotopique de l'O<sub>2</sub> et utilisé lors de nos expériences. En annexe, un article dont je suis co-auteure explique le fonctionnement de ce nouvel instrument et ses caractéristiques. Une deuxième partie du chapitre 2 décrit les méthodes d'analyse au LSCE de l'air récupéré depuis les chambres biologiques.

Le chapitre 3 présente l'article Paul et al. (2023), dans lequel il est décrit le développement de la chambre biologique dans les détails, ainsi que la première étude en chambre biologique seule sur la fétuque, et les résultats sur les fractionnements trouvés. Toute la méthodologie des expériences ainsi que les principes calculatoires des fractionnements biologiques y sont présentés.

Enfin, le chapitre 4 présente un troisième article (Paul et al., *in prep*) sur l'étude des fractionnements biologiques associés à différents types de plantes en chambres biologiques multiplexées. Cette étude permet d'étudier une plus large variété de fractionnements biologiques et d'essayer de comprendre les mécanismes biologiques associés. En outre, les fractionnements trouvés lors de ces expériences en chambres biologiques sont intégrés dans des calculs d'effets Dole globaux à l'aide de sortie de modèles (PMIP) permettant d'avoir une estimation de la productivité à différentes périodes (préindustriel/6 000 ans avant aujourd'hui/ Dernier Maximum Glaciaire), afin de pouvoir réinterpréter au mieux les variations de l'effet Dole lors de la dernière déglaciation.

# Chapitre 1 : Variations passées de la composition isotopique de l'oxygène et lien avec le paléoclimat

## 1.1. Les isotopes de l'oxygène

La molécule d'O<sub>2</sub> représente 20,95 % de l'atmosphère terrestre. L'atmosphère terrestre est aussi composée d'environ 78 % de N<sub>2</sub>, 0,93% d'argon et moins de 0,1 % des autres gaz comme le CO<sub>2</sub>, les gaz rares autres que l'argon, l'hydrogène et l'hélium (Fig.1.1). Le dioxygène est le deuxième élément de l'atmosphère terrestre. L'oxygène est l'élément le plus abondant sur Terre.

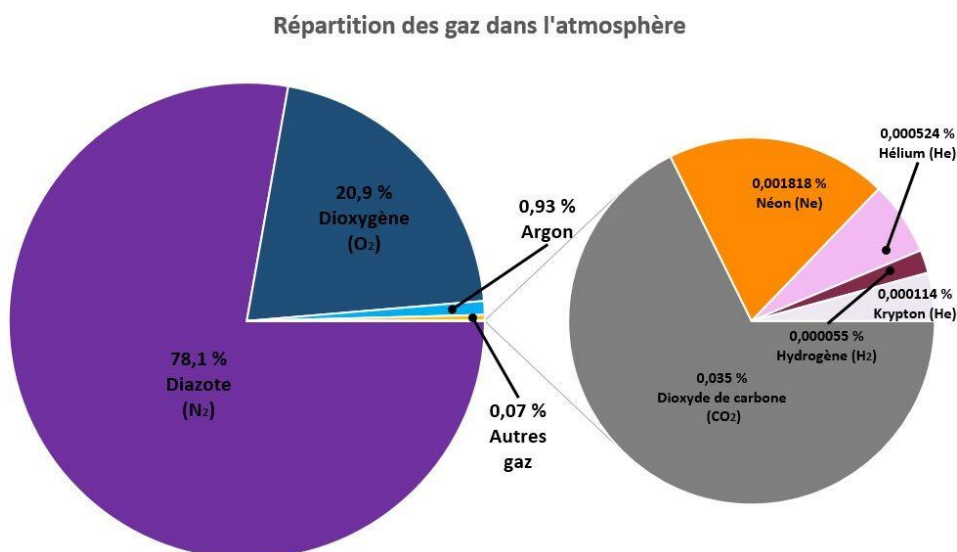


Figure 0.1 : Répartition des gaz dans l'atmosphère terrestre (d'après L'atmosphère, Alloprof).

La molécule d'O<sub>2</sub> est composée de deux atomes d'oxygène. Ces deux atomes d'oxygène ont trois isotopes stables : soit <sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O et <sup>18</sup>O, dont les masses sont respectivement 16, 17, 18. Le plus abondant étant l'oxygène 16 (99,763 %) avec un

noyau composé de 8 neutrons et protons. L'abondance de l'oxygène 18 est de 0,1995 % avec 10 neutrons et l'oxygène 17 de 0,0375 % avec 9 neutrons (Fig.1.2).

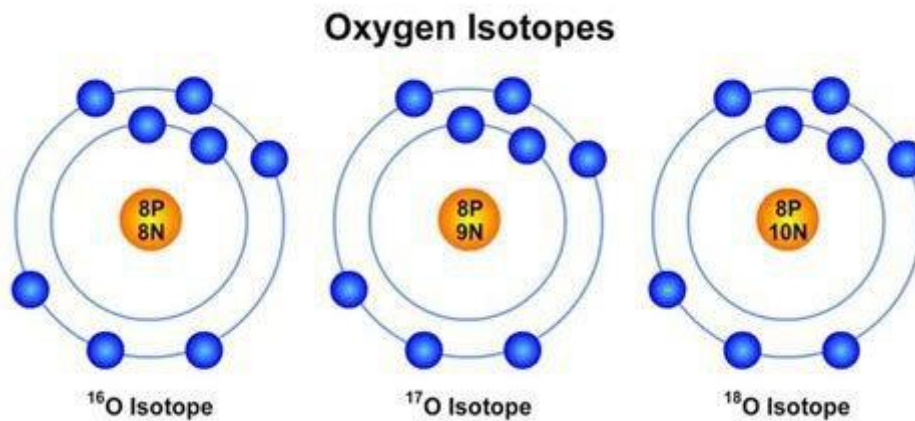


Figure 0.2 : Les différents isotopes de l'oxygène : 16, 17, 18 (téléchargé depuis <https://www.quora.com/How-many-protons-does-oxygen-17-have>).

### Principes généraux des isotopes

Les isotopes n'ont pas les mêmes propriétés thermodynamiques, ce qui est dû au fait qu'ils n'ont pas le même nombre de neutrons et donc n'ont pas la même masse. Le fractionnement isotopique est le résultat de ces différences de propriétés thermodynamiques : les différents isotopes d'une même espèce chimique n'ont pas le même comportement lors des différents processus physiques, chimiques et biologiques. Lors de changements de phase et dans les différents réservoirs, la répartition entre les isotopes légers et lourds est différente. Le fractionnement isotopique peut donc se définir comme une redistribution des isotopes entre deux états A et B. Ces états peuvent se définir comme un changement de phase, une réaction ou un processus biologique. Le coefficient de fractionnement  $\alpha_{A-B}$  donne une mesure du fractionnement isotopique qui est caractéristique du processus A vers B. Sa définition mathématique est la suivante :

$$\alpha_{A-B} = \frac{R_A}{R_B} \quad (1.1)$$

Avec,

$$\varepsilon = \alpha - 1 \quad (1.2)$$

$\varepsilon$  représente la discrimination isotopique.

On définit le rapport isotopique suivant pour les isotopes les plus abondants de l'oxygène :

$$R = \frac{{}^{18}\text{O}}{{}^{16}\text{O}} \quad (1.3)$$

Une molécule comme le dioxygène présente différents isotopologues, qui ne se différencient que par le fait qu'ils sont composés de différents isotopes, leur structure atomique est similaire. Les volumes des isotopes dans la molécule sont proches car ils ont le même nuage d'électrons, il n'y a donc pas de grande dépendance des rapports isotopiques à la pression.

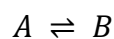
#### Les différents fractionnements : le fractionnement à l'équilibre et le fractionnement cinétique

Le fractionnement à l'équilibre a pour cause principale le fait que les molécules n'ont pas les mêmes masses et des symétries différentes, donc les molécules n'ont pas les mêmes pressions de vapeurs saturantes. La pression de vapeur saturante est la pression à laquelle la phase gazeuse d'une substance est en équilibre avec sa phase liquide ou

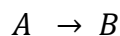
solide à une température donnée dans un système fermé. Ainsi, le coefficient de fractionnement  $\alpha$  peut se définir de la sorte :

$$\alpha = \frac{P_{vap}^{18}}{P_{vap}^{16}} \quad (1.4)$$

Dans le fractionnement à l'équilibre et pour les applications discutées dans cette thèse, le coefficient de fractionnement dépend essentiellement de la température. Afin que ce fractionnement à l'équilibre ait lieu, il est nécessaire que le système ait le temps de s'équilibrer.



Le fractionnement cinétique entre en jeu, lorsque deux phases ne sont pas restées suffisamment longtemps en contact afin que l'équilibre se fasse ou bien quand la réaction est unidirectionnelle. Ce fractionnement cinétique est courant puisque cet équilibre, dans les milieux naturels, ne l'est que rarement. Ainsi, lors d'un changement de phase, un fractionnement cinétique additionnel a parfois lieu. Celui-ci peut être lié à la différence de diffusivité entre les molécules. Le dioxygène, par exemple, lors de la respiration, subit un fractionnement isotopique en raison de la diffusion. La respiration n'est donc pas un processus à l'équilibre.



Afin d'exprimer les variations de la quantité d'isotopes, lors d'un processus, il est nécessaire d'étudier des rapports isotopiques par rapport à un rapport isotopique de référence.

Pour évaluer les variations de la composition isotopique en oxygène, soit les variations du rapport des isotopes les plus abondants (Eq.1.5), la notation utilisée est le  $\delta^{18}\text{O}$  :



$$\delta^{18}O_{\text{calibré}} = \left[ \frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000 \quad (1.5)$$

Le standard utilisé est l'air atmosphérique pour le cas du dioxygène.

La molécule de dioxygène, composée donc de deux atomes d'oxygènes, a de nombreuses molécules stables présentes dans la nature. La plus abondante étant celle de masse 32 (deux isotopes d'oxygène 16). Il existe également des molécules stables comme celle de masse 33 (oxygènes 16 et 17), de masse 34 (oxygènes 16 et 18) et d'autres moins abondantes comme :  $^{17}\text{O}-^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}-^{18}\text{O}$  et  $^{17}\text{O}-^{18}\text{O}$  dans le cycle de l'oxygène.

Le temps de résidence de l'oxygène dans l'atmosphère est de 1 000 à 2 000 ans (Bender et al., 1994 ; Hoffmann et al., 2004) supérieur au temps de mélange entre les deux hémisphères qui est de 6 mois à 1 an. Ainsi, la composition isotopique de l'oxygène est homogène quand on est loin des sources et des puits de dioxygène.

Le dioxygène est consommé et produit via des processus biologiques : respectivement la respiration (période de nuit et de jour) et la photosynthèse (période de jour) par les plantes et les microorganismes de la biosphère terrestre et océanique (Fig.1.3).

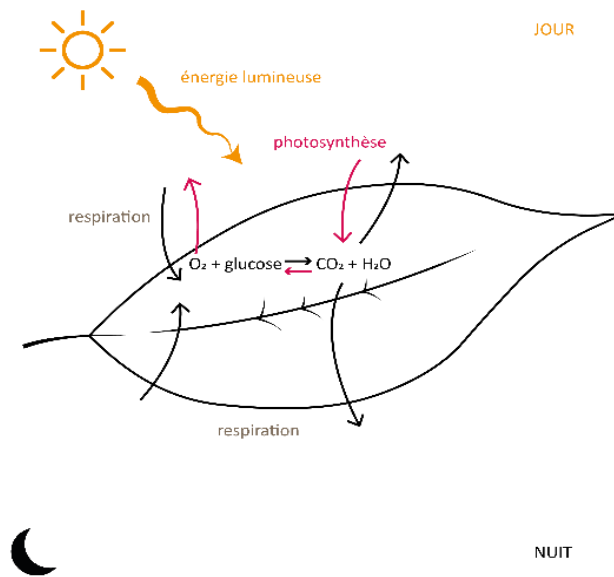


Figure 0.3 : Photosynthèse (période jour) et respiration (périodes de nuit et de jour), les échanges gazeux d'oxygène.

Les biosphères terrestre et océanique ont un rôle considérable dans le cycle de l'oxygène qui est un des cycles biogéochimiques les plus importants sur Terre.

## 1.2. Fractionnements dans le cycle de l'oxygène

### 1.2.1. Définition du $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$

Nous pouvons définir le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  comme un traceur qui représente les variations du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'O<sub>2</sub> dans l'air atmosphérique. Pour l'étude du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  il est nécessaire de prendre en compte tous les processus associés aux cycles biogéochimiques dans lesquels il y a un fractionnement isotopique : lors des processus photosynthétiques et respiratoires et lors des processus physico-chimiques dans le cycle de l'eau (Fig.1.4).

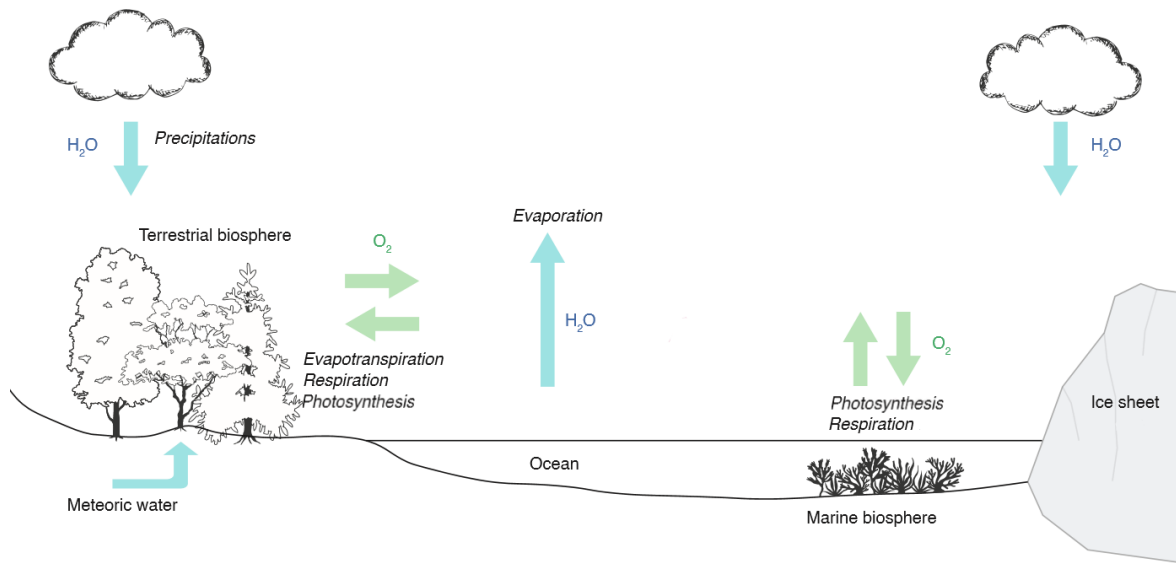


Figure 0.4 : Cycle de l'eau et de l'oxygène.

L'étude du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  dans le passé permet de reconstruire les variations du cycle hydrologique aux basses latitudes et/ou de reconstruire le rapport de productivité entre l'océan et le terrestre dans le passé (Bender et al., 1994 ; Luz et al., 1999 ; Malaizé et al., 1999 ; Severinghaus et al., 2009 ; Blunier et al., 2002 ; Landais et al., 2010 ; Luz et Barkan, 2011). De nombreuses questions restent en suspens sur ce point, celles-ci seront détaillées dans la section 1.4 de ce chapitre 1. Tout d'abord, nous allons étudier les différents fractionnements en jeu lors de ces différents processus biogéochimiques et physico-chimiques.

### 1.2.2. Fractionnements dans le cycle de l'eau

Nous nous intéressons dans cette section au cycle de l'eau puisque l'eau est le substrat de la photosynthèse. Ainsi, le processus photosynthétique permet la transmission de la composition isotopique de l'oxygène de l'eau au dioxygène de l'air. En milieu naturel,

les molécules d'eau sont formées essentiellement de quatre isotopes stables ( $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , 99,7% ;  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , 0,2% ;  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ , 0,05% et  $\text{HD}^{16}\text{O}$ , 0,03%).

Le cycle de l'eau, ou cycle hydrologique, représente l'ensemble des flux d'eau entre plusieurs réservoirs terrestres. Les différents réservoirs d'eau sur Terre sont : l'océan, l'atmosphère, les glaciers et les eaux de surfaces et souterraines. Ces réservoirs sont en contact étroit entre eux via différents processus physiques. Tout d'abord, l'énergie solaire est considérée comme le moteur de ce cycle : cette énergie permet l'évaporation de l'eau depuis les océans. Il s'en suit la formation des nuages dans lesquels l'eau condense et produit de la pluie qui alimente soit l'océan, soit les eaux terrestres : glaciers, sol, lac, rivières, nappes phréatiques etc. Cette eau sur la surface terrestre peut ruisseler et retourner dans l'océan (Fig.1.5). Ce cycle est dynamique et l'ensemble des processus physiques du transport de l'eau sont à l'origine des fractionnements de l'oxygène de la molécule d'eau.

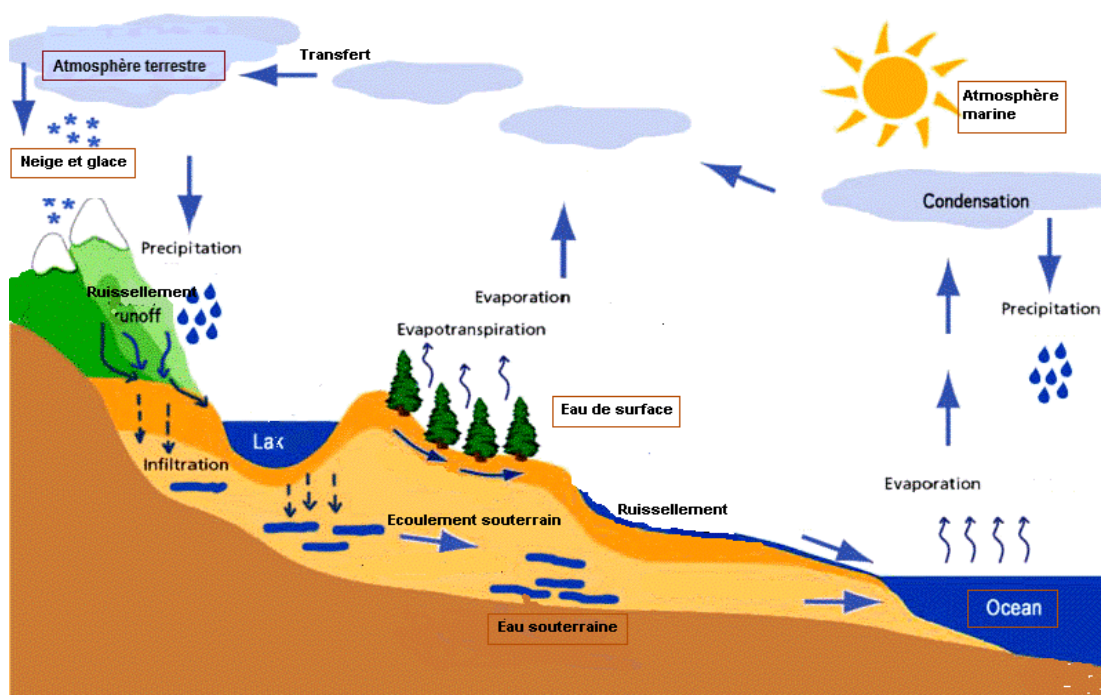


Figure 0.5 : Cycle de l'eau (d'après ENS Lyon).

### 1.2.2.1. L'évaporation

L'évaporation est le processus physique qui permet le passage de l'eau liquide en phase gazeuse. Le rayonnement solaire, absorbé par l'océan, apporte l'énergie nécessaire permettant l'évaporation de l'eau à sa surface. Dans le cycle de l'eau, le mécanisme d'évaporation se situe à la surface de l'océan et lors de l'évapotranspiration des couverts végétaux (incluant le sol). Le mécanisme d'évapotranspiration permet le transfert d'une quantité d'eau vers l'atmosphère sous forme gazeuse par la biosphère : par évaporation de l'eau contenue dans les sols et par transpiration des plantes.

Pour ce qui est de l'océan, à son interface avec l'atmosphère (les quelques premiers millimètres), un fractionnement à l'équilibre a lieu entre l'eau de l'océan et la vapeur en contact avec la surface de l'océan. Mais de cette fine couche en contact avec la surface de l'océan, s'échappent des molécules d'eau dans la colonne d'air atmosphérique au-dessus et le processus physique dominant pour le fractionnement isotopique est alors un fractionnement cinétique contrôlé par la diffusivité des molécules d'eau. La composition isotopique du flux évaporatoire dépend à la fois de la composition isotopique de la surface de l'océan, mais aussi de la composition isotopique de la vapeur d'eau qui est déjà dans l'atmosphère, qui elle-même dépend de l'humidité relative. L'effet de ce fractionnement sur la composition isotopique de la vapeur au-dessus de l'océan peut se modéliser à l'aide de l'équation de fermeture décrite par Merlivat et Jouzel (1978) :

$$R_{BL} = \frac{R_{ocean}}{\alpha_{eq} (\alpha_K + h_s (1 - \alpha_K))} \quad (1.6)$$

$BL$  correspond à la couche limite,  $K$  à l'état d'équilibre du système et  $h_s$  à l'humidité relative de la surface d'évaporation.

Le fractionnement cinétique augmente l'effet du fractionnement à l'équilibre et il est d'autant plus important que l'humidité relative à la surface de l'océan est faible. Ce processus d'évaporation crée un  $\delta^{18}\text{O}$  de la vapeur d'eau au niveau des zones d'évaporation de l'ordre de -10 ‰ à -15‰.

Pour ce qui est du processus d'évapotranspiration et plus précisément de la transpiration, les plantes terrestres au niveau des stomates sur leur feuille évaporent l'eau liquide récupérée dans le sol via le processus de transpiration. Cette eau passe par les racines puis les tiges et enfin par les feuilles. Ensuite, cette eau liquide rejoint l'atmosphère en phase vapeur. Il n'y a pas de fractionnement au niveau de ce flux d'eau dans la plante (lors de la transpiration), uniquement dans l'eau des feuilles (appelé *leaf water* = *lw*). Ce fractionnement, dans l'eau des feuilles est nommé  $^{18}\epsilon_{\text{evapotranspi}}$ . La composition isotopique de l'eau des feuilles ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$ ) est influencée par les variations du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau du sol qui lui-même est influencé par les variations spatiales et temporelles du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau de pluie ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$  = *meteoric water*) par le processus de distillation de Rayleigh. Le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$  a une valeur moyenne de -8 ‰ (Bender et al., 1994 ; Landais et al., 2006.). Quant au  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des feuilles, celui-ci est enrichi par rapport au  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau du sol en raison de l'évapotranspiration, la principale contribution étant l'évaporation de l'eau dans les feuilles. Malgré les variations spatiales et temporelles du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des feuilles, une moyenne a pu être calculée et l'augmentation globale du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  par rapport au  $\delta^{18}\text{O}$  de l'océan global (SMOW= *Standard Mean Ocean Water*) est donnée comme égale à environ 6 ‰<sup>1</sup> (Hoffmann et al., 2004 ; West et al., 2008).

Craig et Gordon (1965), afin d'observer la variabilité spatiale et temporelle, ont estimé le  $\delta^{18}\text{O}$  d'une parcelle d'eau qui s'évapore à l'aide d'une équation (Eq.1.7) qui peut être appliquée lorsque les plantes transpirent dans des conditions à l'équilibre (Dongmann, 1974).

---

<sup>1</sup> L'ensemble des valeurs présentées dans la section 1.2 permet d'exposer une des dernières valeurs acceptées de chaque fractionnement dans la littérature (afin de pouvoir avoir dans un premier temps une première estimation). Leurs évolutions précises dans la littérature seront discutées dans la partie 1.4.

$$\delta^{18}O_{lw} = h(\delta^{18}O_{vapeur} + \varepsilon_{\text{équilibre}}) + (1 - h)(\delta^{18}O_{\text{eau du sol}} + \varepsilon_{\text{équilibre}} + \varepsilon_{\text{cinétique}}) \quad (1.7)$$

Avec  $h$  correspondant à l'humidité relative au niveau de la surface de la feuille, le  $\delta^{18}O_{vapeur}$  et le  $\delta^{18}O_{\text{eau du sol}}$  représentent respectivement le contenu en  $\delta^{18}O$  dans la vapeur d'eau au niveau de la surface de la feuille et dans l'eau du sol.  $\varepsilon_{\text{équilibre}}$  est l'enrichissement isotopique du  $H^{18}_2O/H^{16}_2O$  entre l'eau et la vapeur à l'état d'équilibre dépendant de la température  $T$  au niveau de la feuille.

Les variations de la composition isotopique de l'eau des feuilles peuvent être spatiales et temporelles en raison des variations du  $\delta^{18}O$  de l'eau des sols et de l'évaporation de l'eau qui se produit au niveau des feuilles. Le  $\delta^{18}O$  de l'eau des sols varie spatialement en fonction du  $\delta^{18}O$  de l'eau météoritique qui diminue vers les hautes latitudes en raison de la distillation de Rayleigh (section 1.2.2.2). Nous pouvons aussi noter que le  $\delta^{18}O_{lw}$  varie en fonction de l'humidité relative du milieu. Plus l'environnement est sec, plus l'évaporation augmente. Plus l'évaporation augmente, plus l'eau dans les feuilles est enrichie en isotope lourd (Craig et Gordon, 1965 ; Cernusak et al., 2016) (Eq.1.7)).

La figure 1.6, d'après Cernusak et al. (2016), permet d'illustrer les relations entre l'enrichissement isotopique de l'eau des feuilles observé avec l'humidité relative de l'air d'après les prévisions de Craig-Gordon (1965) (Eq.1.7), sur des données collectées en Australie du Nord. Grâce à cette analyse, nous pouvons remarquer l'importance que joue l'humidité relative sur l'enrichissement en isotopes lourds : plus l'humidité augmente, plus le  $\delta^{18}O_{lw}$  diminue avec une corrélation d'environ  $r^2 = 0,78$ . De plus, nous pouvons observer que les variations du  $\delta^{18}O_{lw}$  et celles prédites par le modèle de Craig-Gordon sont corrélées d'environ :  $r^2 = 0,86$ .

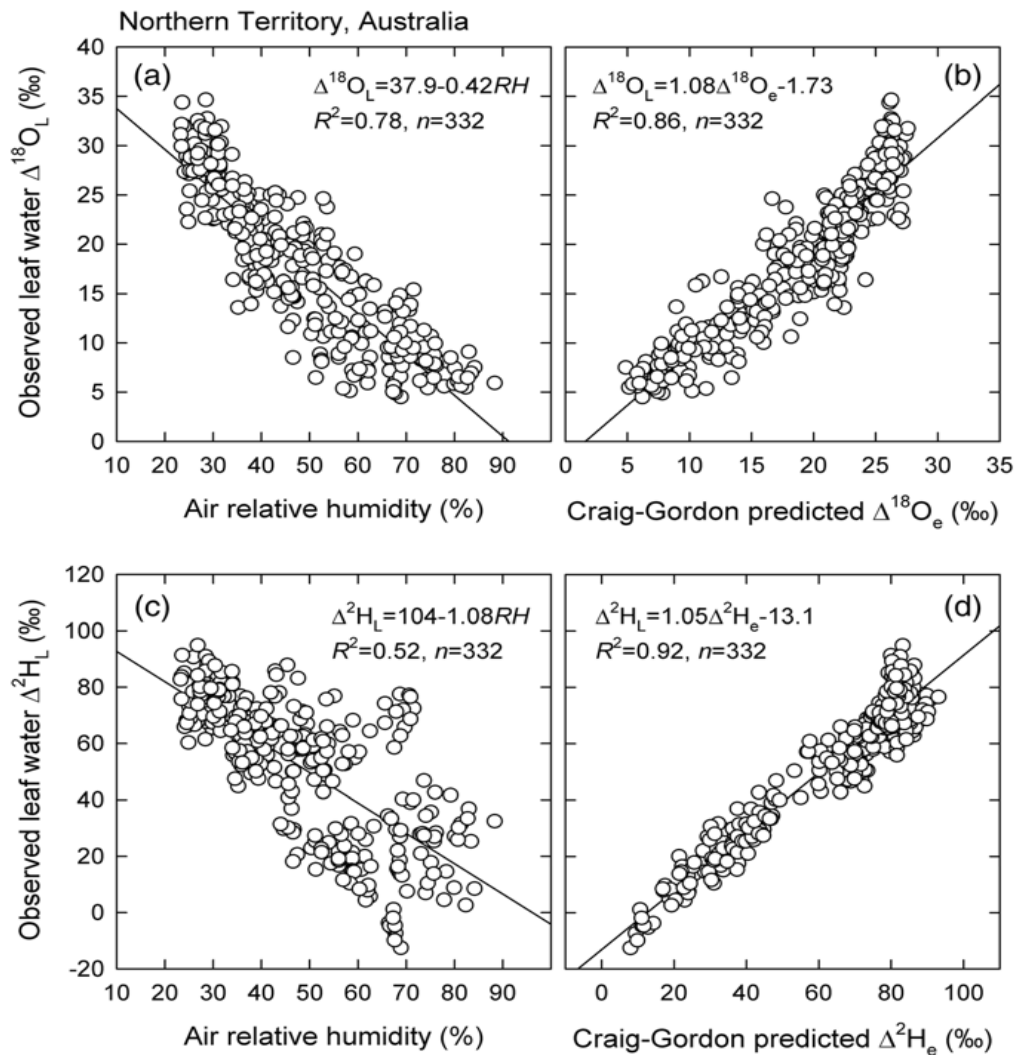


Figure 0.6 : Relations entre l'enrichissement en isotopes stables de l'eau des feuilles observé pour l'oxygène ( $\Delta^{18}O_L$ ) et l'hydrogène ( $\Delta^2H_L$ ) et l'humidité relative de l'air enregistrée au moment de l'échantillonnage (a et c) et les enrichissements prédits par Craig-Gordon (b et d) (d'après Cernusak et al., 2016).

### 1.2.2.2. Condensation et précipitation de l'eau

Désormais, une parcelle d'air (de vapeur d'eau) a été produite dans l'atmosphère. Celle-ci remonte par des courants ascendants dans l'atmosphère puis se refroidit. Cela diminue la pression de vapeur saturante et permet à la vapeur d'eau de se rapprocher de la saturation : il y a donc condensation. Lorsque cette condensation commence cela forme un nuage avec des gouttes d'eau qui peuvent ensuite se séparer du nuage et



retomber sur le continent ou dans l'océan via le processus de gravitation. Le fractionnement associé à la condensation est un fractionnement à l'équilibre, les isotopes lourds ( $^{18}\text{O}$ ), se retrouvent dans une proportion plus importante dans les gouttes d'eau que dans la vapeur d'eau.

Pour donner quelques ordres de grandeurs, la composition isotopique de la vapeur d'eau produite au-dessus de l'océan est égale à environ - 10 ‰. La différence de  $\delta^{18}\text{O}$  entre la vapeur et la pluie est de l'ordre de 9 – 10 ‰.

Pour décrire l'évolution de la composition isotopique de la vapeur d'eau et des précipitations depuis les basses latitudes vers les pôles, nous pouvons utiliser le modèle de distillation de Rayleigh appliqué à la masse d'air :

$$\delta^{18}\text{O}_{vap} = \delta^{18}\text{O}_{vap_{t_0}} + 1000 \left( \alpha_{liq-vap} - 1 \right) \ln(f) \quad (1.8)$$

Avec,  $f$  la fraction résiduelle de vapeur, définie comme le rapport des masses  $m/m_0$  avec  $m_0$  correspondant à la masse d'air à  $t=0$ .

Ce modèle considère que lorsque la vapeur a condensé, l'intégralité du condensat quitte le nuage. L'évolution de la composition isotopique de la pluie et de la vapeur dépend essentiellement de la quantité de pluie formée.

Au départ, dans la masse d'air, il y a une certaine masse de vapeur  $m_0$  et plus les températures diminuent, plus l'eau condense, donc la masse de vapeur restante dans la masse d'air  $m$ , diminue. Ainsi, le rapport  $\frac{m}{m_0}$  diminue de l'équateur jusqu'aux pôles, puisqu'au fur et à mesure du transport de la masse d'air vers les hautes latitudes il fait de plus en plus froid. C'est le processus de la distillation de Rayleigh. Donc, à chaque condensation, le système perd de l'eau qui a un rapport  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  plus élevé que le rapport  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  de la vapeur. Ainsi, plus il y a de la condensation, plus le rapport

$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  restant dans le nuage est faible et par conséquent le rapport  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  des précipitations est faible aussi. Le rapport isotopique de la précipitation est toujours plus important que celui de la vapeur dans laquelle la précipitation s'est formée car la précipitation s'effectue essentiellement via un fractionnement à l'équilibre ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{précipitation}}$  est à peu près égale à  $\delta^{18}\text{O}_{\text{vapeur}} + 10 \text{ ‰}$ ). Finalement, plus il fait froid plus la masse d'air s'oriente vers les pôles, plus la vapeur est enrichie en oxygène 16 et appauvrie en oxygène 18, donc le  $\delta^{18}\text{O}$  de la vapeur d'eau devient de plus en plus négatif (Fig.1.7). La température atmosphérique joue sur le fractionnement.

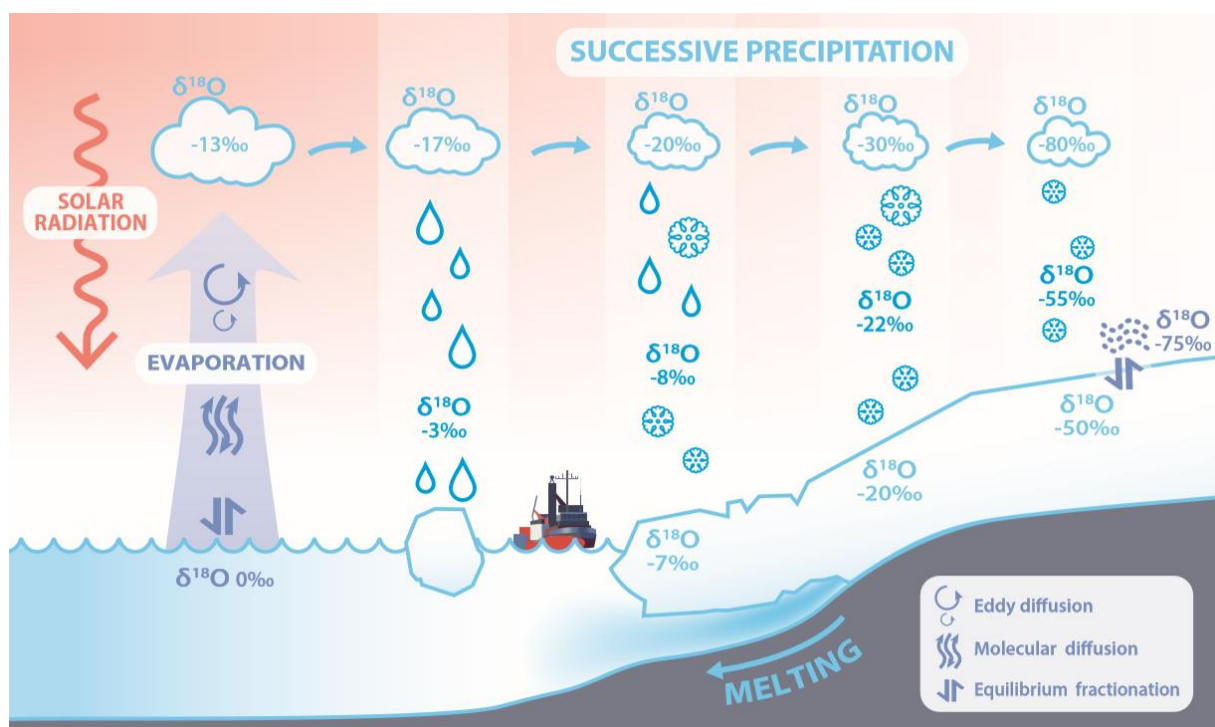


Figure 0.7 : Cycle de l'eau et fractionnements de l'oxygène (d'après Mathieu Casado, 2017).

La répartition globale du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des précipitations est présentée dans la figure 1.8.

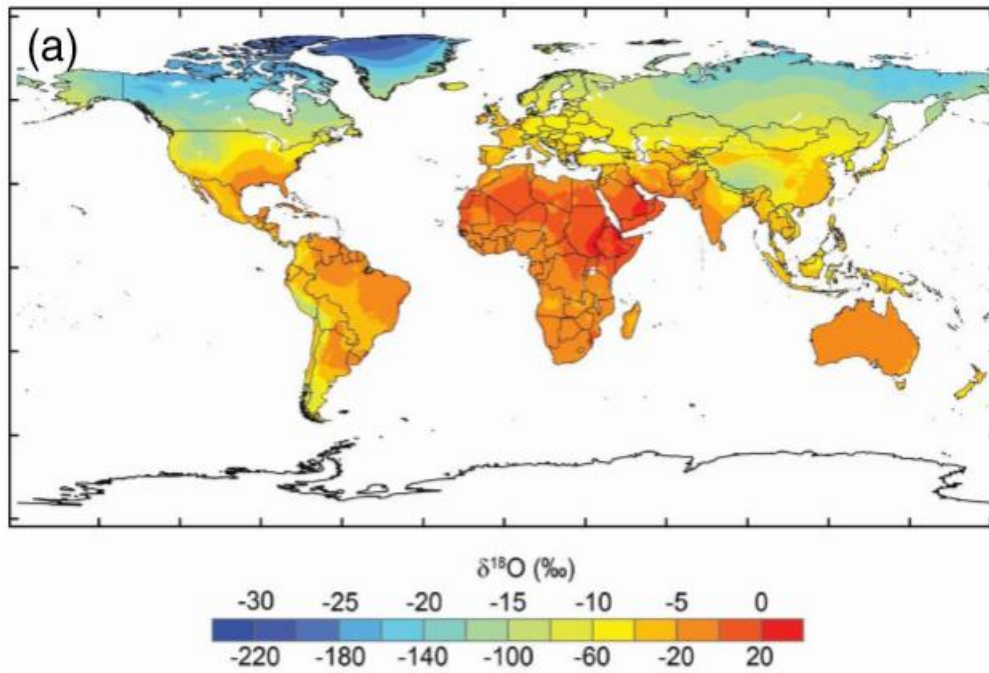
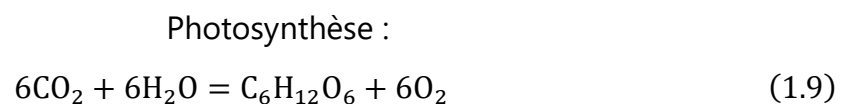


Figure 0.8 : Distribution spatiale des rapports isotopiques de l'hydrogène et de l'oxygène dans les précipitations terrestres (d'après Landais et al., 2007).

### 1.2.3. Fractionnements dans le cycle de l'oxygène associés aux processus biologiques

#### 1.2.3.1. La photosynthèse

Lors de la photosynthèse, le dioxygène est formé à partir de l'eau consommée par l'organisme au niveau des feuilles (Eq.1.9).



Chez les eucaryotes, le site de la photosynthèse a lieu dans les chloroplastes qui sont placés majoritairement dans les feuilles pour les plantes. Les chloroplastes contiennent un ensemble de membranes à l'intérieur : les thylakoïdes dans lesquels les photosystèmes (complexes protéiques associés à des pigments, dont la chlorophylle) permettent de capter la lumière. Cette lumière fournit l'énergie nécessaire à la production de la matière organique chez les organismes photosynthétiques. En outre, au niveau de la chaîne photosynthétique, la réaction d'hydrolyse (oxydation de l'eau) est celle qui oxyde l'eau et forme le dioxygène au niveau du photosystème II (Fig.1.9).

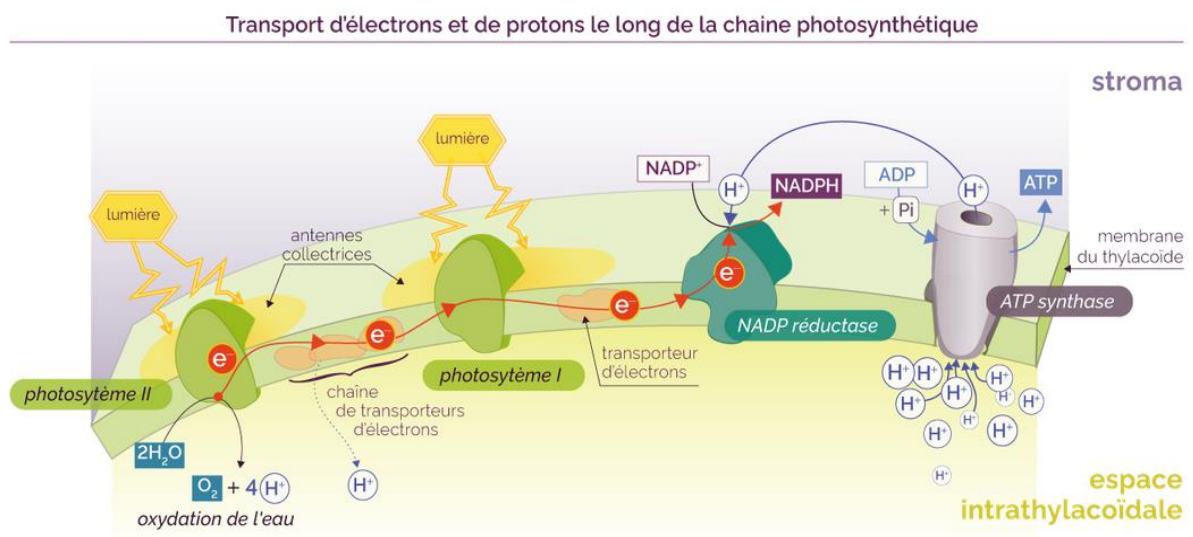


Figure 0.9 : Chaîne photosynthétique productrice de dioxygène. NADP = nicotinamide adénine dinucléotide , ADP = adénosine diphosphate et ATP = adénosine triphosphate (d'après Les étapes de la photosynthèse, Maxicours).

Le coefficient de fractionnement associé à la photosynthèse est décrit ci-dessous (Eq.1.10) :

$$^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}} = \frac{^{18}R_{O_2\text{-produit}}}{^{18}R_{lw}} \quad (1.10)$$

Avec lw correspondant à l'eau dans les feuilles (section 1.2.2.1), substrat de la photosynthèse.

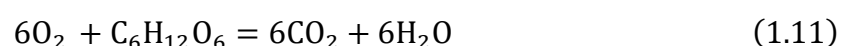
Lors de la photosynthèse, il a été montré qu'il y a transmission du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau consommée dans la feuille au  $\delta^{18}\text{O}$  du dioxygène de l'air sans fractionnement supplémentaire (Guy et al., 1989 ; Vinogradov et al., 1959). Cependant, des études plus récentes ont suggéré que pour la biosphère océanique, un fractionnement photosynthétique ( $\varepsilon_{photo,ocean}$ ) a été découvert et pouvait atteindre + 7 ‰ (Eisenstadt et al., 2010).

Sur la base des études disponibles, il semble que pour les organismes terrestres, il y a un enrichissement nul entre le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau présente dans les feuilles et le  $\delta^{18}\text{O}$  du dioxygène produit ( $\varepsilon_{photo,terr}$ ). Cette eau dans les feuilles provient de l'eau dans le sol absorbée par la plante jusque dans la feuille, lieu où la photosynthèse est maximale. Malgré un enrichissement nul lors de la photosynthèse, le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des feuilles est largement variable à cause (1) des variations du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau du sol, lui-même fortement relié au  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau météorique et (2) de l'enrichissement isotopique de l'eau de la feuille dû au processus d'évapotranspiration (Eq.1.7 discuté dans la section 1.2.2.1).

### *1.2.3.2. Les processus de consommation d'oxygène*

La respiration est un processus biologique de consommation de dioxygène et de glucose et de production de dioxyde de carbone et d'eau (Eq.1.11).

Respiration :



Chez les eucaryotes, la respiration dans la membrane mitochondriale interne est l'étape de la respiration lors de laquelle le dioxygène est consommé. La réaction d'oxydo-réduction le long de la chaîne mitochondriale (transport d'électrons le long de la chaîne) apporte l'énergie nécessaire dans la réduction du dioxygène en eau (Fig.1.10). Chez les procaryotes, les protéines de la chaîne respiratoire se trouvent dans la membrane cellulaire, dans laquelle le dioxygène est accepteur terminal d'électrons, comme pour chez les eucaryotes.

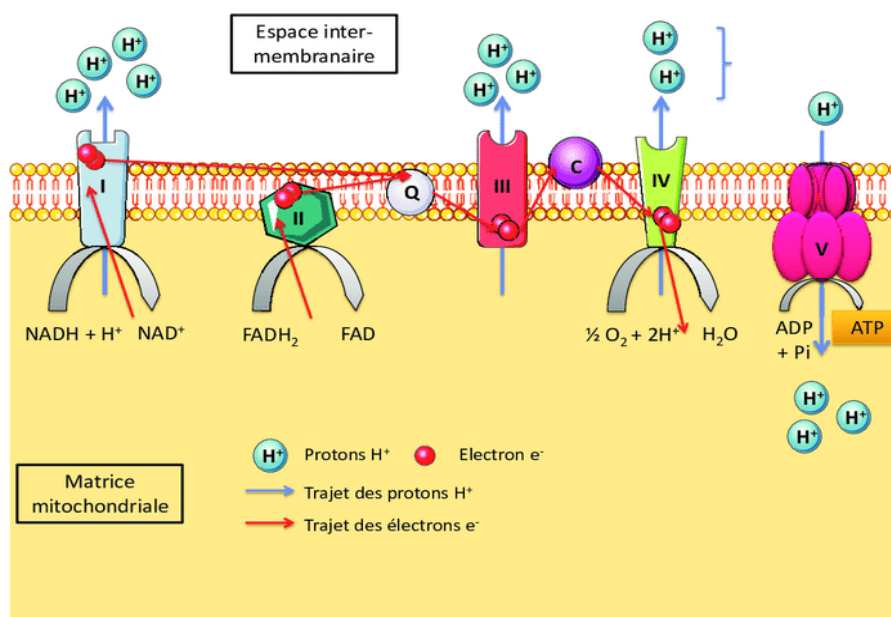


Figure 0.10 : Chaîne respiratoire mitochondriale. Q = quinone, C = cytochrome c, FAD = flavine adénine dinucléotide (d'après Camille Villeudieu, 2018).

Le fractionnement cinétique associé à la respiration peut s'écrire de cette façon :

$$^{18}\alpha_{respi} = \frac{^{18}R_{respiré}}{^{18}R_{air}} \quad (1.12)$$

Lors de la respiration, l'oxygène 16 est préférentiellement consommé par les organismes terrestres et marins (Fig.1.11).

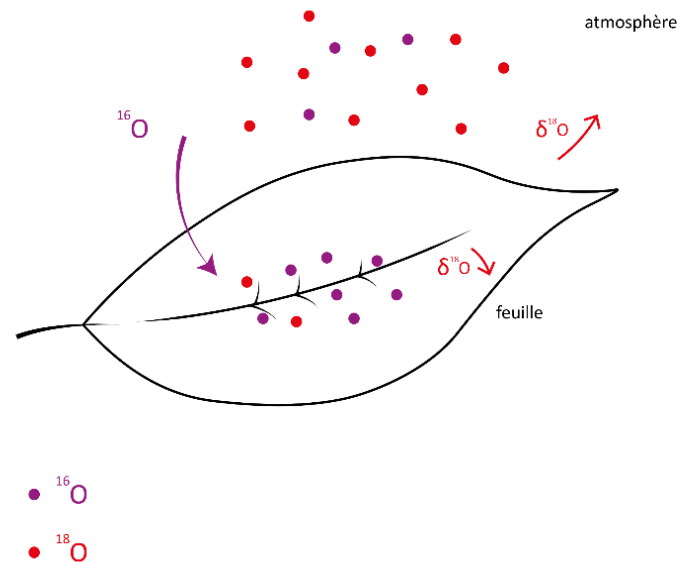


Figure 0.11 : Représentation imagée du fractionnement de l'oxygène lors de la respiration.

Le fractionnement respiratoire terrestre moyen ( $\epsilon_{respi,terr}$ ) est donné aux alentours de + 18 ‰ (Guy et al., 1989, 1992) et pour l'océan ( $\epsilon_{respi,ocean}$ ) de + 18,9 ‰ (Bender et al., 1994 ; Luz et Barkan, 2011).

Deux voies respiratoires sont connues chez les plantes : la voie COX, majoritaire chez les plantes. Cette voie utilise l'enzyme cytochrome oxydase qui catalyse la réaction de réduction de l'oxygène. L'autre voie, la voie AOX oxyde des molécules d'ubiquinol qui est directement couplée à la réduction de l'oxygène. Ces deux voies respiratoires ne fractionnent pas l'oxygène avec la même intensité : la voie AOX fractionne plus

fortement l'oxygène que la voie COX, respectivement  $\sim + 30 \text{ ‰}$  et  $\sim + 20 \text{ ‰}$  (Ribas-Carbo et al., 1995).

En période de jour, d'autres processus de consommation de dioxygène entrent en jeu : comme la photorespiration et la réaction de Mehler. Ainsi, trois flux d'absorption différents existent.

La photorespiration est le résultat de l'activité de la RuBisCO (ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase oxygénase) qui oxyde le ribulose-1,5-biphosphate avec de l'oxygène. Cette enzyme spécifique de la photosynthèse, produit des sucres à partir du  $\text{CO}_2$ . Son activité principale est celle de carboxylase et non pas d'oxydase (Fig.1.12). En milieu naturel, chez les plantes C3, la RuBisCO n'est pas saturée en  $\text{CO}_2$  puisque la concentration en  $\text{CO}_2$  n'est pas suffisante dans l'atmosphère, donc cela entraîne une compétition avec l' $\text{O}_2$ . L'activité d'oxydase est en partie une perte d'énergie pour la plante, puisque cela produit des déchets et donc diminue le rendement photosynthétique. Cependant la photorespiration a aussi un rôle métabolique, comme la production d'acides aminés et protège de la photoinhibition (un excès de lumière diminue la vitesse de réaction de photosynthèse). Cette activité de photorespiration est présente pour les plantes C3 mais est beaucoup plus faible, voire parfois non nulle, pour les C4.



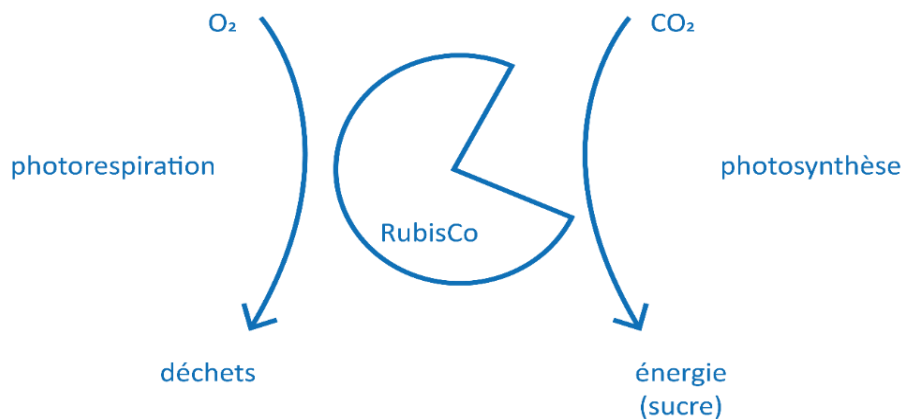


Figure 0.12 : Activité de la RubisCO (enzyme) : oxygénase et carboxylase.

Les plantes C3 correspondent à la majorité des plantes de milieux tempérés. Dans les régions subtropicales/tropicales, là où il y a une forte insolation, les plantes C4 sont présentes. Ce sont des plantes qui sont adaptées à leur milieu de vie qui est « asséchant ». Nous retrouvons chez les C4 par exemple les plantes comme le maïs. Le mécanisme en C4 est une adaptation au manque d'eau, qui permet d'augmenter l'efficacité d'utilisation de l'eau (*water use efficiency*), grâce à une organisation particulière du mésophylle (présence des cellules de la gaine) et une enzyme (PEP-Carboxylase) permettant une augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> au niveau de la RuBisCO. Ce qui permet ainsi aux plantes C4 d'avoir un rendement photosynthétique maximal.

Le fractionnement de l'oxygène associé à la photorespiration,  $^{18}\epsilon_{photorespi}$  est de - 22 ‰ (Helman et al., 2005).

La réaction de Mehler réduit le dioxygène et forme du peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mehler, 1951). Cette réaction dans les chloroplastes consomme du dioxygène et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit, peut être converti en eau via l'enzyme ascorbate peroxydase (Fig.1.13).

Le fractionnement de l'oxygène associé à la réaction de Mehler,  $^{18}\epsilon_{Mehler}$  est donné entre - 10 et - 15 ‰ (Guy et al., 1993 ; Helman et al., 2005).

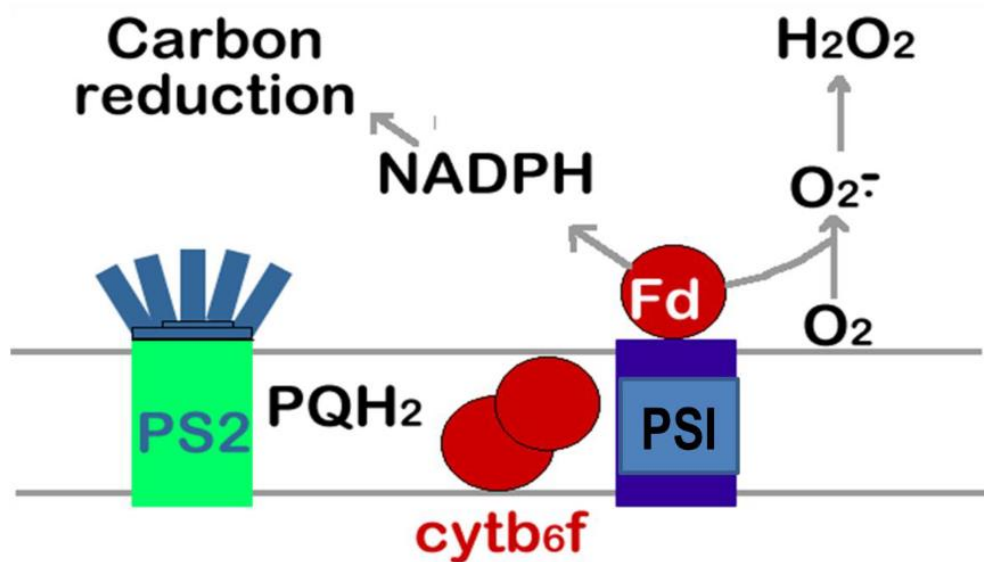


Figure 0.13 : Réaction de Mehler dans la chaîne photosynthétique. PS = photosystème, PQH2= plastoquinone , cytb6f=cytochrome b6f et Fd= ferredoxine (d'après Irina Strizh, 2008).

Le coefficient de fractionnement associé à l'ensemble des processus d'absorption de l'oxygène en phase de lumière peut s'écrire de la sorte :

$$^{18}\alpha_{totalrespi} = ^{18}\alpha_{photorespi} \times f_{photorespi} + ^{18}\alpha_{Mehler} \times f_{Mehler} + ^{18}\alpha_{darkrespi_{COX}} \times f_{darkrespi_{COX}} + ^{18}\alpha_{darkrespi_{AOX}} \times f_{darkrespi_{AOX}} \quad (1.13)$$

Avec  $^{18}\alpha_{photorespi}$ ,  $^{18}\alpha_{Mehler}$  et  $^{18}\alpha_{dark\_respi}$ , les facteurs de fractionnements isotopiques associés à la photorespiration, à la réaction de Mehler et à la respiration obscure (COX

et AOX) dans le sol et dans les feuilles.  $f_{photorespi}$ ,  $f_{Mehler}$ ,  $f_{dark\_respi}$  sont les fractions correspondantes à des flux d'absorption d'oxygène, de sorte que :

$$f_{darkrespi} + f_{photorespi} + f_{Mehler} = 1 \quad (1.14)$$

En effet, le  $f_{photorespi}$  dépend de la proportion des plantes C3 par rapport aux plantes C4. Car comme mentionné précédemment, les plantes C4 ne photorespirent pas ou très peu. La réaction de Mehler est considérée comme égale à 10 % de l'absorption totale du dioxygène (Laws et al., 2000).

#### 1.2.4. Intégration de ces fractionnements au concept de l'Effet Dole

L'Effet Dole est l'enrichissement du  $\delta^{18}\text{O}$  du dioxygène atmosphérique par rapport au  $\delta^{18}\text{O}$  océanique global (considéré égal au VSMOW pour la période actuelle). Cet enrichissement est d'environ 24 ‰ (Dole, 1944 ; Barkan et Luz, 2005 ; Pack et al., 2017 ; Wostbrock et Sharp, 2021). Afin d'expliquer cet enrichissement du  $\delta^{18}\text{O}$ , il est nécessaire de comprendre les fractionnements importants de l'oxygène lors des processus associés à la productivité de la biosphère et du cycle de l'eau (expliqués dans les sections 1.2.2 et 1.2.3).

L'ensemble des fractionnements de l'oxygène est résumé dans la figure 1.14 ci-dessous :

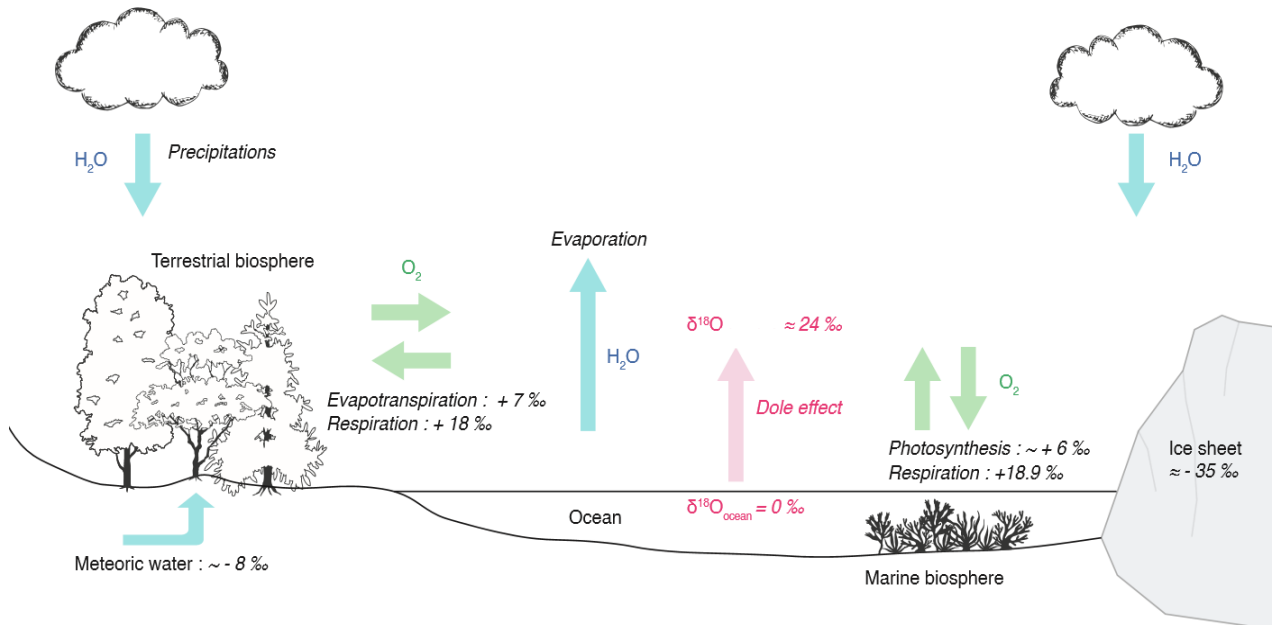


Figure 0.14 : Ensemble des paramètres contribuant à l'effet Dole (en rouge : Effet Dole ; en bleu : cycle de l'eau ; en vert : cycle de l'oxygène dans la biosphère).

L'effet Dole global se définit comme dans l'équation (1.15) ci-dessous :

$$DE_{global} = \delta^{18}O_{atm} - \delta^{18}O_{sw} \quad (1.15)$$

Avec *sw* = sea water qui représente l'eau de l'océan (= ocean), *atm* = atmospheric.

Il est possible de séparer l'effet Dole global en ses composantes terrestres et océaniques :

$$DE_{global} = \frac{GPP_{ocean} \times DE_{ocean} + GPP_{terr} \times DE_{terr}}{GPP_{totale}} \quad (1.16)$$

Avec  $GPP = \text{gross primary productivity}$  représentant la productivité brute.

$$DE_{global} = r \times DE_{ocean} + (1 - r) \times DE_{terr} \quad (1.17)$$

$$\text{avec } r = \frac{GPP_{ocean}}{GPP_{total}} \quad (1.18)$$

$$DE_{ocean} = \varepsilon_{respi,ocean} + \varepsilon_{photo,ocean} \quad (1.19)$$

$$DE_{terr} = \delta^{18}O_{mw} + \varepsilon_{evapotranspi} + \varepsilon_{respi,terr} + \varepsilon_{photo,terr} \quad (1.20)$$

Les paramètres qui peuvent faire varier l'Effet Global sont d'après les équations 1.17, 1.19 et 1.20:

- $r$  si  $DE_{terr}$  et  $DE_{ocean}$  sont différents
- $\delta^{18}O_{mw}$
- $\varepsilon_{evapotranspi}$
- $\varepsilon_{respi,ocean}$ ,  $\varepsilon_{photo,ocean}$  et  $\varepsilon_{respi,terr}$ ,  $\varepsilon_{photo,terr}$

Désormais, intéressons-nous aux variations du  $\delta^{18}O_{atm}$  et de l'effet Dole dans le passé, pendant la période du Quaternaire de manière générale.

## 1.3. Variabilités du $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$

### 1.3.1. Contexte paléoclimatique : généralités sur le climat du Quaternaire

Le Quaternaire a commencé il y a environ 2,5 millions d'années et est caractérisé par deux évènements : l'arrivée aux deux pôles de deux calottes pérennes et l'arrivée du genre Homo. Cette période géologique, au sens strict glaciaire, est caractérisée par l'alternance entre de périodes froides, dites glaciaires et de périodes plus chaudes dites interglaciaires. Actuellement, nous vivons dans une période dite chaude : soit dans le dernier interglaciaire depuis environ 10 000 ans. Le dernier « pic » glaciaire a été atteint il y a 20 000 ans (dernière période froide : période glaciaire) nommé LGM (*Last Glacial Maximum*).

Un ensemble d'archives climatiques permettent de retracer les variations du climat très caractéristiques du Quaternaire (Fig.1.15). En particulier, les archives sédimentaires permettent de retracer les variations du niveau de la mer et donc du volume des calottes de glace sur plusieurs millions d'années. En ajoutant les informations en Antarctique données par les carottes de glaces, nous pouvons aussi retracer la température locale et la concentration en gaz à effet de serre ( $\text{CO}_2$  par exemple, Fig.1.15) sur les derniers 800 000 ans : leurs évolutions sont parallèles.

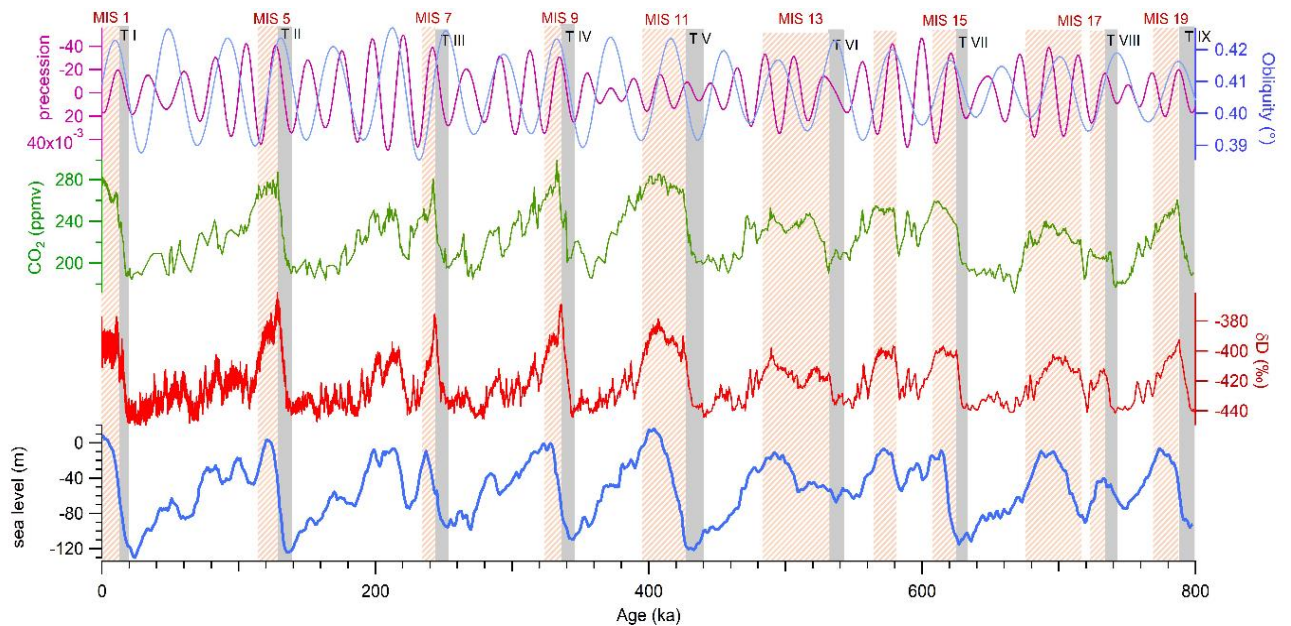


Figure 0.15 : 9 dernières déglaciations enregistrées par le niveau de la mer (bleu) et  $\delta D$  d'EPICA Dôme C d'Antarctique (rouge, EPICA Community members, 2004) dans des contextes différents en termes de concentration de  $CO_2$  (vert, Luthi et al., 2008 ; Bereiter et al., 2018)), forçage astronomique (bleu et violet, Laskar et al., 2004) (d'après Antoine Grisart, 2023).

Lors des périodes froides, le volume des calottes augmente aux pôles en stockant de l'eau douce sur les continents aux pôles. Le niveau de la mer peut diminuer jusqu'à 120 mètres et la surface en terre émergée augmente.

Milankovitch théorise, dans les années 1940 à l'aide d'équations, les variations de trois paramètres orbitaux : l'excentricité, l'obliquité et la précession des équinoxes (Fig.1.16). Des études sur les sédiments marins (Emiliani, 1955 ; Hays et al., 1976 ; Imbrie et Imbrie, 1980), ont montré que les variations climatiques lors du Quaternaire sont corrélées avec les variations des trois paramètres orbitaux décrits par Milankovitch. Tout d'abord, l'excentricité d'une période de 413 000 et de 100 000 ans pourrait être associée aux variations des cycles glaciaires-interglaciaires. Ensuite l'obliquité a une période de 41 000. La précession des équinoxes a une période de 19 000 et 23 000 ans et est associée aux variations millénaires comme les moussons par exemple, les saisons et le déclenchement des déglaciations (avec une variation du volume des glaces) (Fig.1.16). Ces changements du rayonnement solaire, soit de l'insolation, influencent aux hautes latitudes les calottes glaciaires. Par exemple, une configuration avec l'excentricité et

l'inclinaison faible permettrait l'apparition d'une période glaciaire avec de faibles contrastes entre les saisons.

Ainsi, cela a permis de comprendre que les forçages orbitaux sont en partie responsables des variations des changements climatiques naturels.

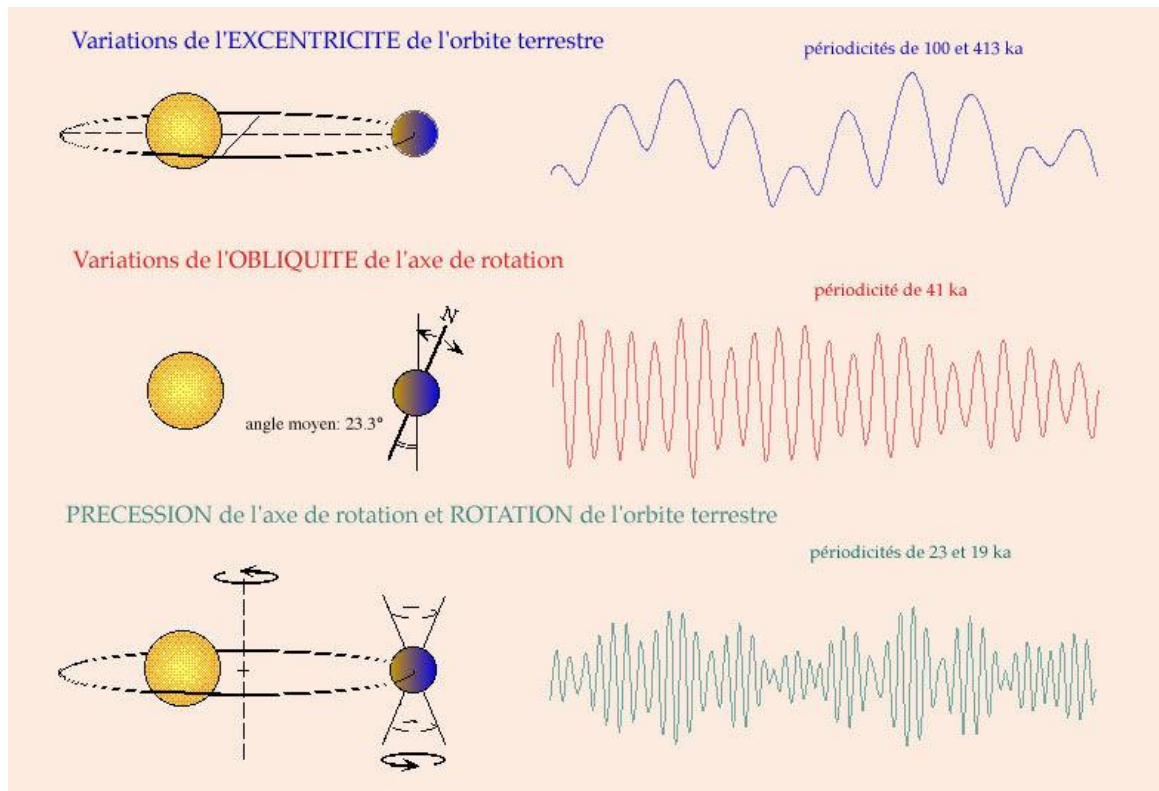


Figure 0.16 : Forçages orbitaux de Milankovitch (d'après Planet-Terre).

Il est observé que la périodicité des cycles glaciaires-interglaciaires varie au cours du temps : avant la transition Mid-Pléistocène (entre 1.2 et 0.8 millions d'années), cette périodicité est de 41 000 ans alors que plus récemment cette périodicité augmente à 100 000 ans (Castin, 2022). Cette transition, est compliquée à comprendre puisque le forçage astronomique n'a pas changé. Un autre problème se pose quant aux variations climatiques en lien avec le forçage orbital, celui de l'entrée en déglaciation : elles ont lieu lorsqu'il y a un maximum d'insolation d'été au nord de l'hémisphère Nord. La position de la Terre par rapport au Soleil et son inclinaison par rapport au plan de l'elliptique sont telles que l'énergie reçue aux hautes latitudes dans l'hémisphère Nord



atteint un maximum. Donc les conditions sont réunies afin que les calottes fondent. Mais ceci n'est vrai que pour 25 % des maximum d'insolation qui sont associés à des déglaciations, car d'autres déglaciations ne se produisent que lorsque le maximum d'insolation a une amplitude faible (exemple il y a 420 000 ans).

Ainsi cela permet de mettre en évidence que d'autres paramètres conditionnent les variations climatiques et pas seulement les forçages orbitaux. Des paramètres de rétroactions internes à la Terre peuvent être à l'origine de ces variations : le cycle du carbone, le cycle de l'eau, la circulation océanique, atmosphérique et la taille des calottes de glace. Par exemple, l'augmentation du CO<sub>2</sub> au début d'un interglaciaire est indispensable afin de comprendre l'amplitude des déglaciations. En outre, les déglaciations ont souvent lieu lorsque la calotte de glace atteint une taille critique. Ceci est surtout observable pour les cycles récents avant 400 000 ans et moins pour les anciens.

Ce qu'il faut retenir c'est que la dynamique climatique du Quaternaire n'est pas que le résultat de forçages orbitaux mais aussi de rétroactions internes à la Terre.

Dans les carottes de glace, de nombreux traceurs peuvent être étudiés comme les variations des rapports d'isotopes ( $\delta^{18}\text{O}$ ) de l'oxygène de l'eau afin de reconstruire la température ou bien, dans cette thèse, de l'oxygène de l'air emprisonné dans les bulles d'air, proxy du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  (Fig.1.17). Aujourd'hui, les mesures sont faites en continu jusqu'à 800 000 ans BP sur la carotte EPICA Dome C. Actuellement, le projet Européen *Beyond Epica* fore une carotte de glace de 1,5 millions d'années BP.

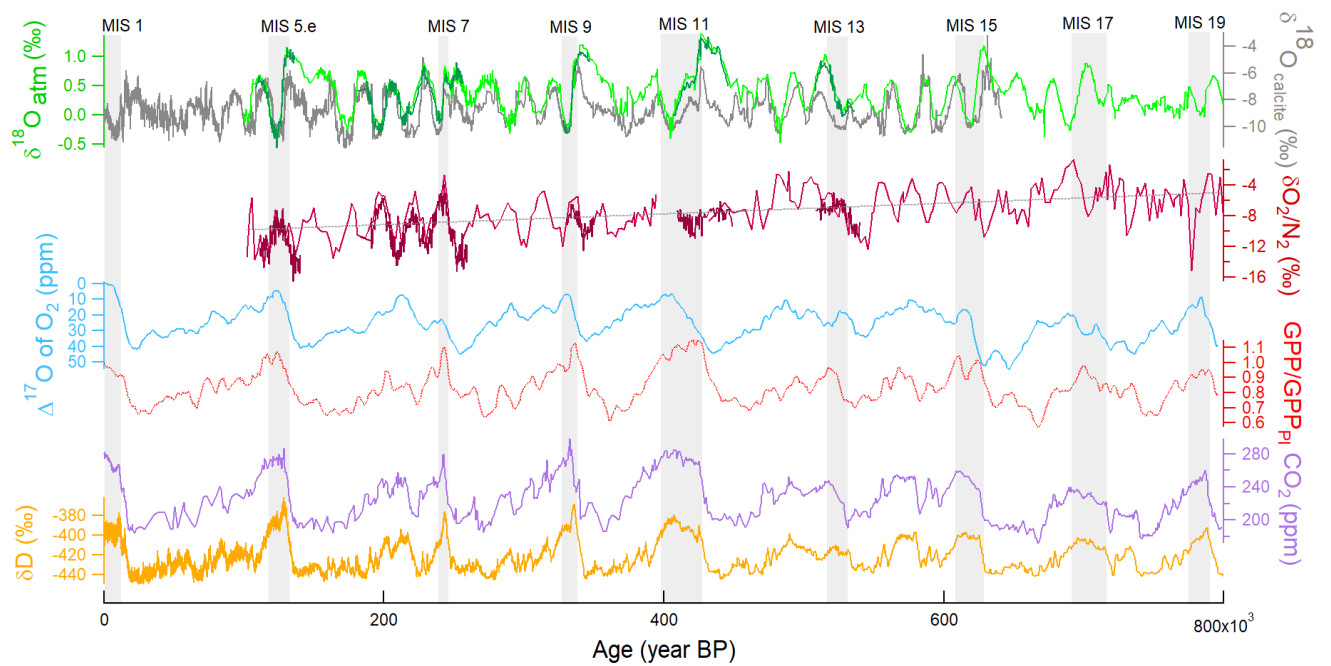


Figure 0.17 : Variations des paramètres climatiques depuis 800 000 ans. De haut en bas : 1.  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  (vert clair) (Extier et al., 2018) ; (vert foncé) (Grisart et al., 2023), (gris) (Cheng et al., 2016). 2.  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$  (rouge clair) (Extier et al., 2018) ; (rouge foncé) (Grisart et al., 2023). 3.  $\Delta^{17}\text{O}$  de  $\text{O}_2$  (bleu) (Brandon et al., 2020) (EDC) ;  $\text{GPP}/\text{GPP}_{\text{PI}}$  (rouge clair) (Brandon et al., 2020 et Yang et al., 2022). 4.  $\text{CO}_2$  (violet) (Luthi et al., 2008) ; (Bereiter et al., 2015),  $\delta\text{D}$  d'EPICA Dôme C d'Antarctique (jaune), (EPICA Community members, 2004). En fond gris : 9 interglaciaires.

Désormais, étudions plus en détails, les variations du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  dans les carottes de glace.

### 1.3.2. Variabilité à l'échelle orbitale du $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$

Historiquement, Bender et al. (1994), ont découvert que le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et la précession (ou l'insolation du 21 juin à 65°N) avaient des variations comparables (Fig.1.18), ce qui a été utilisé afin de dater les carottes de glace (voir l'encadré « complément : comment les carottes de glace aujourd'hui sont-elles datées ? » ci-dessous). Sur la dernière déglaciation, 5 000 ans de décalage ont été observés entre la précession et le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  : ce décalage a été supposé comme constant dans le temps dans la construction des chronologies (Shackleton et al., 2000). Cependant, Malaizé et al. (1999) et Jouzel et al. (2002) ont supposé qu'il n'y avait pas de raison que ce déphasage ne varie pas au cours

du temps à cause du cycle hydrologique et la productivité de la biosphère qui influencent le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ . Par la suite, Bazin et al. (2016) démontrent qu'en effet ce déphasage varie. Il a été montré que des événements d'échelle millénaire (comme les événements de type Heinrich) survenant pendant les déglaciations retardent la réponse du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  au forçage orbital (Extier et al., 2018). Ces événements de type Heinrich correspondent à des débâcles d'icebergs dans l'océan Atlantique Nord et qui ont lieu pendant des glaciations. Ceci expliquerait le déphasage de 5000 ans entre la précession et le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ . Extier et al. (2018) ont aussi souligné le fait que les variations de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  suivent mieux les variations du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{calcite}}$  enregistrées dans des spéléothèmes d'Asie de l'Est datés entre 100 et 640 ka BP que les variations de la précession. Ces deux enregistrements ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et  $\delta^{18}\text{O}_{\text{calcite}}$ ) montrent des variabilités orbitales (liées à l'insolation du 21 juin à 65° Nord) et millénaires similaires, qui peuvent correspondre à des déplacements vers le sud de la position de la zone de convergence intertropicale (ZCIT) (section 1.3.3). A partir d'une étude de modélisation, Reutenauer et al. (2015) ont montré en effet que le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et le  $\delta^{18}\text{O}$  des spéléothèmes répondent aux mêmes processus de changements de cycle hydrologique des basses latitudes (Fig.1.18).

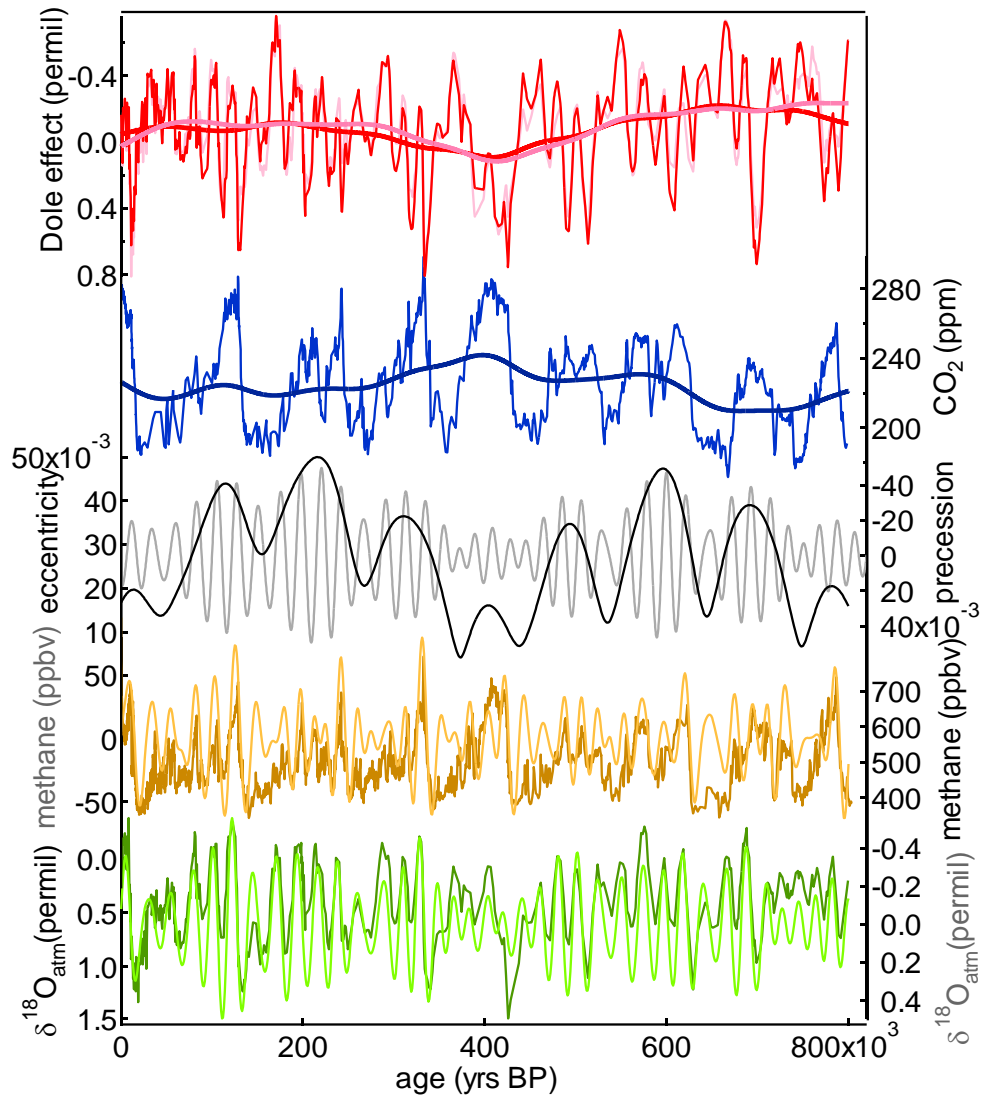


Figure 0.18 :  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  effet Dole et lien avec d'autres traceurs. De haut en bas : 1. Effet Dole (trait gras : composante basse fréquence). 2.  $\text{CO}_2$  des carottes de Vostok et EDC (Petit et al., 1999 ; Pepin et al., 2001 ; Siegenthaler et al., 2005 ; Luethi et al., 2008). 3. Excentricité (noir) et précession (gris) (Laskar et al., 2004). 4. Enregistrement de méthane sur la carotte EDC (Spahni et al., 2005 ; Louergue et al., 2008). Signal de  $\text{CH}_4$  filtré sur le signal de précession (marron clair). 5.  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  enregistrement (vert clair) signal  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  filtré autour du signal de précession, (d'après Landais et al., 2010).

Complément : comment les carottes de glace aujourd'hui sont-elles datées ?

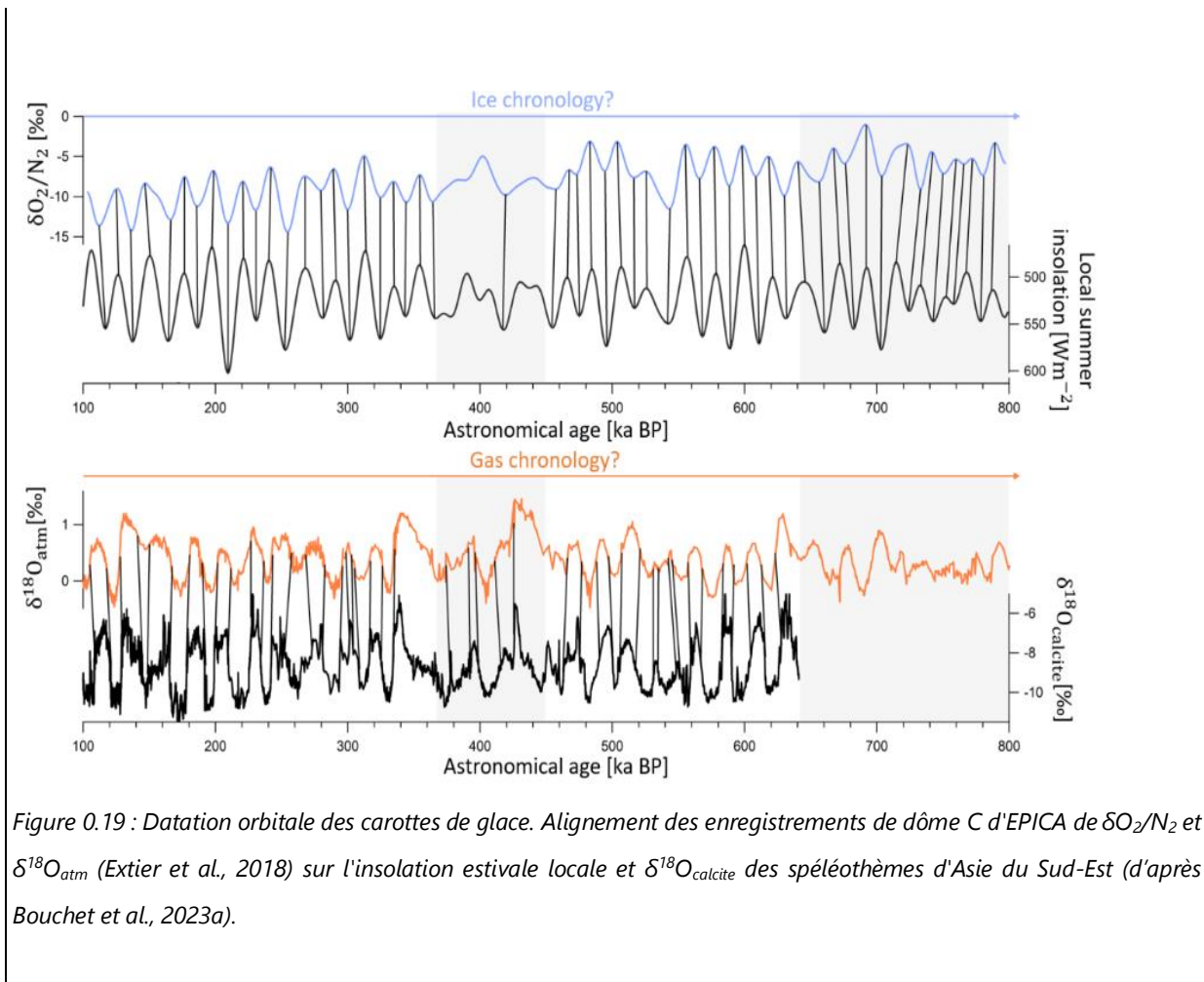
Les carottes de glace des sites caractérisés par des taux d'accumulation élevés de la neige de surface (comme en Arctique de l'ordre de 30 cm par an) peuvent être datés en comptant les couches de glace annuelles qui se sont déposées. Pour des sites comme en Antarctique (Vostok par exemple), là où les taux d'accumulation sont plus faibles (de l'ordre de 5 cm par an), d'autres méthodes doivent être utilisées car le comptage des couches annuelles n'est plus possible. Ainsi, l'étude des isotopes composant la glace et ses bulles d'air et l'utilisation de la modélisation deviennent des outils indispensables pour la datation.

La datation « orbitale » permet de synchroniser des variations de proxies avec les variations des paramètres orbitaux de la Terre qui sont déterminées avec précision sur la période du Quaternaire. Ainsi, l'intérêt de dater les carottes de glace est d'aligner les variations des proxies avec celles des paramètres orbitaux. Ce qui permet d'obtenir des contraintes sur l'âge de la glace ou du gaz à une profondeur connue.

Le proxy étudié dans cette thèse, le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ , permet de dater l'air dans les carottes de glace puisque ses variations peuvent s'aligner avec celles de la précession (Fig.1.19) mais aussi avec celles liées aux forçages à l'échelle millénaire associés à des changements du cycle de l'eau aux basses latitudes comme les moussons (Extier et al., 2018).

Un autre proxy associé à l'oxygène est aussi utilisé pour dater : le  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$  (Fig.1.19). Les variations de ce proxy sont le résultat de fractionnements lors du piégeage des bulles d'air dans la glace qui dépendent eux-mêmes des variations de l'insolation estivale locale (Bender, 2002).

L'alignement entre le  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$  et l'insolation est donné est une incertitude de 4 000 ans car le processus est encore mal connu.



### 1.3.3. A l'échelle millénaire

Landais et al. (2007) ont mis en évidence des variations significatives du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  à l'échelle millénaire en réponse aux événements de Dansgaard-Oeschger (D-O) de la dernière période glaciaire et en réponse aux événements de Heinrich (Severinghaus et al., 2009 ; Seltzer et al., 2017).

Les évènements de D-O ont été définis via des carottes de glace au Groenland par Dansgaard et al. (1985). Au Groenland, ils sont visibles via une augmentation rapide de la température de 10°C à 16°C en quelques dizaines d'années. La période chaude (interstade) est suivie par un refroidissement plus lent pour arriver sur une période plus froide (stade). 25 événements de Dansgaard-Oeschger sont identifiés pendant la

dernière période glaciaire (de 115 000 à 20 000 ans avant aujourd'hui) sans périodicité claire. Ces événements sont liés à des changements de la circulation thermohaline de l'Atlantique Nord. Une hypothèse donnée est celle que lors des périodes froides, l'intensité du Gulf Stream s'affaiblit et l'arrivée d'eau douce en Atlantique Nord provoque un ralentissement de la plongée des eaux profondes en Atlantique Nord vers les pôles, la formation de la NADW (*North Atlantic Deep Water*) est alors bien moins efficace. Cet effondrement participe à une diminution du transfert de la chaleur des masses chaudes provenant du Gulf Stream jusqu'aux pôles. Le refroidissement de la région Nord Atlantique provoque la formation des glaces continentales, donc la formation de puits d'eau douce (glace de mer) qui ne sont plus relargués dans l'océan. Ainsi, la circulation thermohaline reprend en intensité et provoque une élévation de la chaleur dans l'atmosphère (période interstadiaire).

Les événements d'Heinrich (Fig.1.20) sont définis par le dépôt important de débris détritiques continentaux transportés par le glacier Laurentide en Atlantique Nord. Ces dépôts dans l'océan sont nommés les IRD (*Ice-Rafted Detritus*) (Heinrich et al., 1988). Des IRD sont observés pour tous les D-O mais tous ne sont pas enregistrés dans des carottes sédimentaires dans l'Hémisphère Sud. Les événements d'Heinrich sont présents pendant les stades des événements de D-O avant les interstades et ont une périodicité de 5000 à 10 000 ans (Andersen et al., 2004).

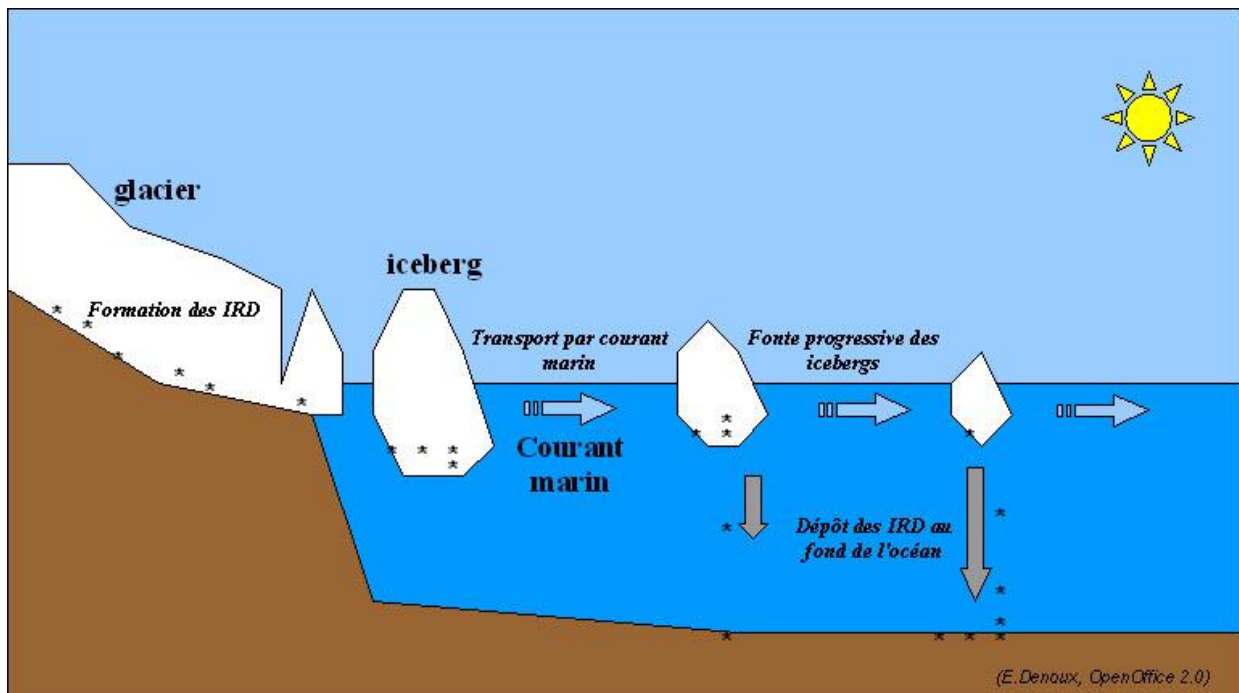


Figure 0.20 : Evénements d'Heinrich (d'après E.Denoux).

Dans la figure 1.21, nous pouvons observer que pendant les interstades, il y a une diminution du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  de 0,2 ‰ en 1 000 ans qui se superpose à la tendance à long terme. Nous pouvons aussi observer dans la séquence D-O 21-22, pendant la phase chaude, la tendance générale induite par la variation de précession qui est une diminution du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  de 0,6 ‰. Avec la variabilité à l'échelle millénaire superposée, on a un  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  qui diminue de 0,3 ‰. Pendant les périodes froides, il y a une augmentation de 0,2 ‰ du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  des événements de D-O.



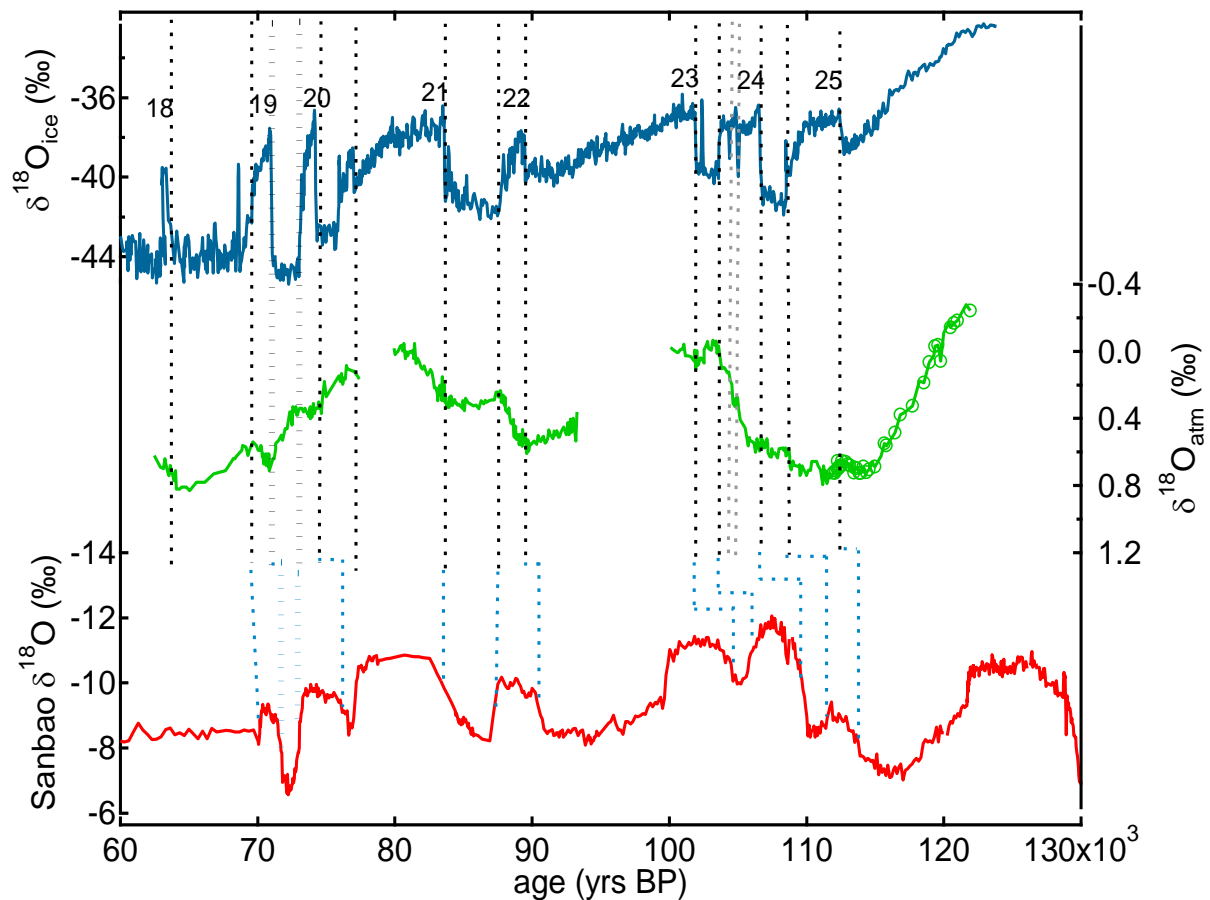


Figure 0.21 : Variations millénaires de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  sur les stades isotopiques marins 4 et 5. Haut :  $\delta^{18}\text{O}$  de la glace sur la carotte de NorthGRIP [NGRIP c.m., 2004]. Milieu : variations de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  sur la carotte de NorthGRIP. Bas :  $\delta^{18}\text{O}$  de la calcite dans la grotte de Sanbao (Chine, Wang et al., 2008). Les lignes noires pointillées indiquent la correspondance entre les enregistrements de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{ice}}$ . Les lignes bleues pointillées indiquent la correspondance entre les enregistrements de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et de  $\delta^{18}\text{O}$  de la calcite. Les lignes plus épaisses indiquent l'emplacement du stade (GS 19) très marqué à la fois dans le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et dans le  $\delta^{18}\text{O}$  de la calcite. Les chiffres représentent les D-O (d'après Landais et al., 2010).

Dans la figure 1.22, issue de Severinghaus et al. (2009), nous pouvons remarquer deux événements climatiques abrupts observés lors de la dernière glaciation soit des D-O et des événements d'Heinrich, qui entraînent une variabilité millénaire du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ .

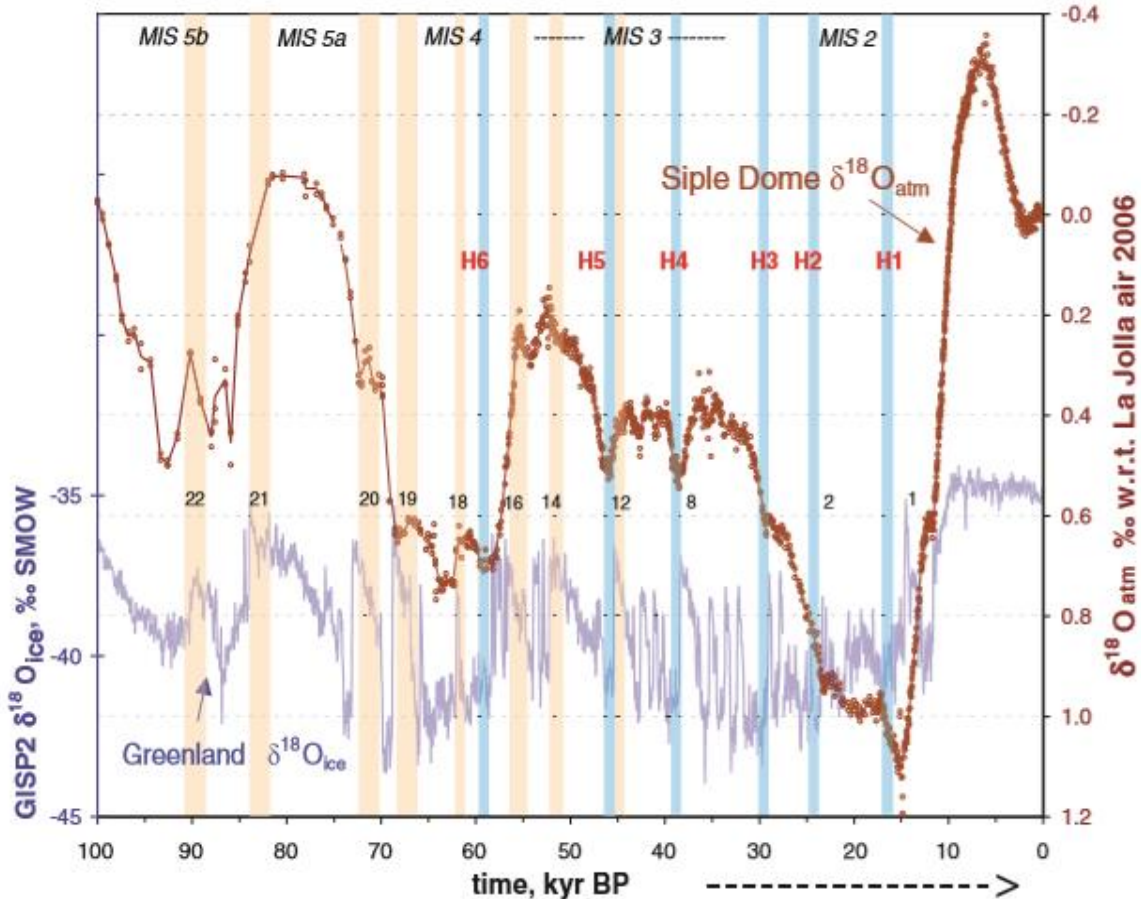


Figure 0.22 : Mesure du  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  de l'oxygène atmosphérique ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ) au cours des 100 derniers ka de la carotte de glace du Siple Dôme, Antarctique. Stades de Heinrich (H1 à H6 en chiffres rouges) et les événements D/O plus anciens (petits chiffres noirs) sont étiquetés (d'après Severinghaus et al., 2009).

Voici les explications données pour les variations du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  lors des phases chaudes des D-O, soit pendant les interstades (Fig.1.23<sup>2</sup>) : tout d'abord, la ZCIT (zone de convergence intertropicale) remonte au Nord de l'équateur. La ZCIT se trouve donc au niveau du continent asiatique et entraîne des conditions climatiques avec une forte humidité et de fortes précipitations dus aux vents tropicaux. Et nous savons que lorsqu'il y a des fortes précipitations, la distillation de Rayleigh est plus importante, ce qui diminue donc le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$ . Ainsi, le  $\delta^{18}\text{O}$  transmis par la photosynthèse est plus faible et donc le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  diminue. Cela joue également sur le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{calcite}}$ , c'est pour cela que les deux signaux sont en phase. Ce phénomène est d'autant plus accentué, qu'il y a beaucoup de biosphère terrestre à cette latitude qui s'est développée avec la chaleur

<sup>2</sup> A noter que la figure 1.23 est une analogie : l'été correspond à un interstade et l'hiver à un stade.

et l'humidité. Ainsi, la proportion de transmission du  $\delta^{18}\text{O}$  faible de l'eau des feuilles vers l'atmosphère est plus importante.

En outre, l'augmentation de la chaleur pendant les interstades, provoque la migration de la biosphère vers les hautes latitudes. Et nous savons que, dans les hautes latitudes, le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$  est plus faible (résultat de la distillation de Rayleigh) donc le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  transmis par la photosynthèse est plus faible également. De surcroît, l'évaporation est moins importante quand l'humidité relative est élevée. Donc le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  transmis est plus faible car le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  est plus faible quand il y a peu d'évaporation.

Donc nous pouvons bien expliquer que pendant les périodes chaudes de D-O, il y a une diminution abrupte du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ .

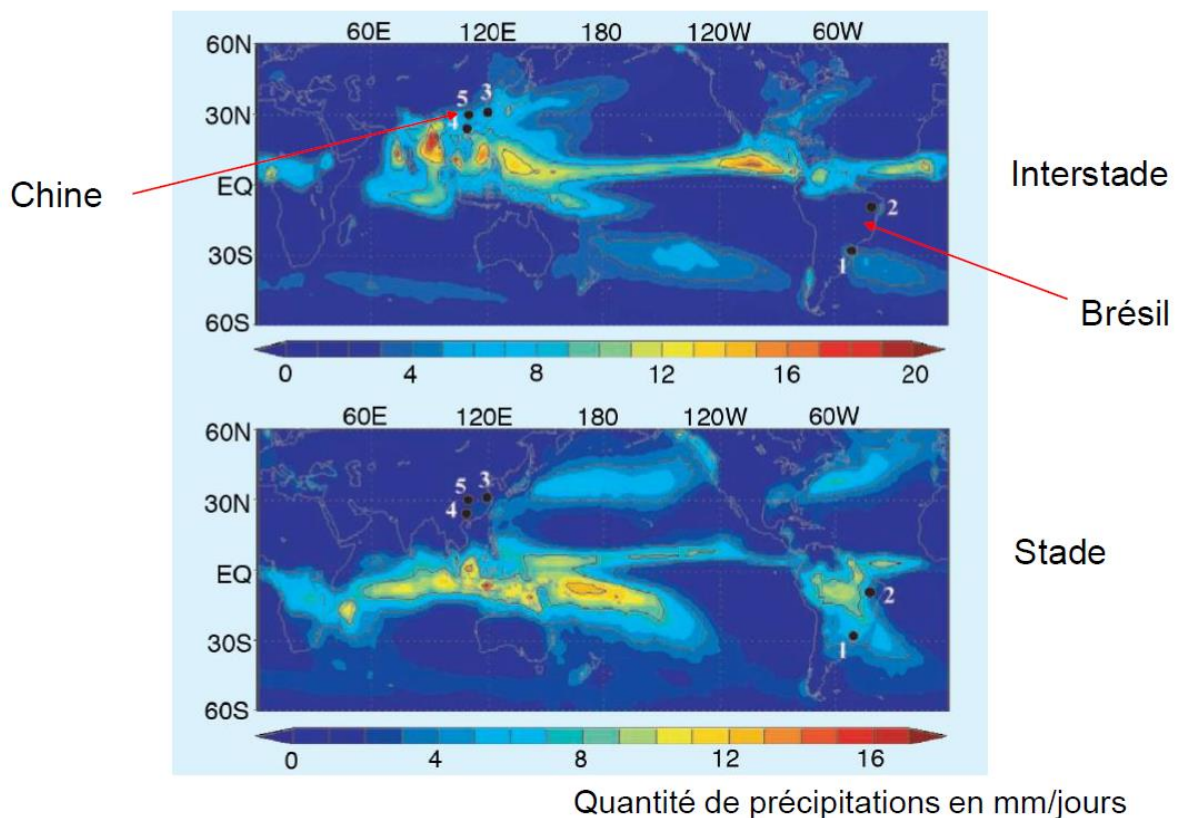


Figure 0.23 : Evolution de la ZCIT entre l'été (en haut) et hiver (en bas) permettant de faire l'analogie avec les interstades (en haut) et les stades (en bas) (d'après Wang et al., 2008).

Pour les périodes froides, pendant les stades : la ZCIT descend vers le Sud au niveau de l'océan Indien. Donc, sur le continent, au niveau de la zone Sud du continent asiatique, il n'y a pas beaucoup de précipitations. Ainsi, le continent est plus sec, donc il y a plus d'évaporation et le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  transmis est plus élevé. En outre, les précipitations n'ont pas beaucoup d'effet sur le  $\delta^{18}\text{O}$  des eaux chloroplastiques marines donc le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  est moins faible. Globalement, il y a une augmentation de l'effet Dole et donc du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ .

A cette échelle de temps, les influences du changement du niveau de la mer sont négligeables ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{sw}}$  de l'Eq.15).

D'après les études de modélisation par Reutenauer et al. (2015), les variations du cycle hydrologique jouent un rôle dominant sur les variations du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  à l'échelle millénaire et confirment que le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  peut être considéré comme un intégrateur global des changements hydrologiques sur les zones végétalisées.

Nous avons, dans la présente section 1.3, expliqué de manière globale les variations orbitales et millénaires du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ . Dans le chapitre 4, (dernier article rédigé) nous essaierons de donner plus de détails sur la période LGM jusqu'au préindustriel en intégrant les nouveaux résultats de cette thèse ainsi que de nombreuses autres études.

## 1.4. L'effet Dole global : évolution des idées en lien avec les fractionnements respiratoires et photosynthétiques océaniques et terrestres

Il a été présenté jusqu'à présent, l'ensemble des mécanismes biologiques et hydrologiques associés aux fractionnements qui définissent l'effet Dole, ainsi que les dernières valeurs en date de chacun de ces fractionnements. Je vous propose désormais, de regarder l'évolution de l'état de l'art sur l'ensemble de ces

fractionnements biologiques et ainsi les évolutions de celui-ci sur l'interprétation de l'effet Dole global. Tous ces travaux ont permis d'arriver aux conclusions actuelles présentées dans la section 1.2.

### 1.4.1. Les premières interprétations de l'effet Dole : un rôle important donné au rapport de la productivité océanique vs terrestre

#### 1.4.1.1. Les premières mesures de l'effet Dole global

La première mesure précise de la valeur de l'Effet Dole a été donnée par Kroopnick et Craig (1972) : soit,  $23,5 \pm 0,3$  ‰. Ils ont appliqué la méthode d'équilibration du  $\text{CO}_2$  afin de mesurer le  $\delta^{18}\text{O}$  du standard SMOW, tandis que le  $\text{CO}_2$  produit par oxydation du graphite avec de l'oxygène gazeux a été utilisé afin de mesurer le  $\delta^{18}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$  atmosphérique. Barkan et Luz (2005), ont de leur côté obtenu la valeur de  $23,88 \pm 0,02$  ‰ par comparaison directe de la composition isotopique de l'oxygène atmosphérique avec l' $\text{O}_2$  produit par fluoration de l'étalon SMOW. Finalement, Wostbroeck et al. (2020) ont trouvé une valeur très proche :  $24.046 \pm 0,107$  ‰.

#### 1.4.1.2. Les premières estimations du fractionnement respiratoire par Guy et al. (1992)

Dans les années 50, il a été envisagé que l'effet Dole pouvait être le résultat du fractionnement isotopique lors du processus biologique de la respiration, c'est-à-dire, lors de la consommation d'oxygène. Plusieurs expériences ont été menées afin de définir le fractionnement associé aux processus respiratoires des organismes. Les résultats sont différents en fonction des conditions expérimentales (les expériences ont

été menées en incubation ou en milieu naturel<sup>3</sup>). Lane et Dole (1956), les premiers à avoir travaillé sur le sujet, ont trouvé un fractionnement respiratoire entre 7 et 25 ‰. Ce résultat est assez incertain en raison d'une diversité d'organismes étudiés (bactéries, grenouille, épinard, champignon etc.).

Guy et al. (1989), (1992) ont par la suite ont montré dans des études en laboratoire que ce processus respiratoire fractionne l'oxygène de 17 à 19 ‰ (pour la respiration COX). L'étude a été faite sur des mitochondries isolées et des préparations d'enzymes sur des thylacoïdes d'épinards ou bien sur des cyanobactéries et des diatomées. Mais pour le processus de respiration AOX, le fractionnement est bien plus fort, soit de 24 à 26 ‰. Dans cette même étude, ils calculent un fractionnement associé à la consommation d'oxygène via la réaction de Mehler de 15,3 ‰. En outre, ils ajoutent l'idée que la photorespiration des feuilles absorbe préférentiellement l'oxygène 16 et que cette réaction a un rôle important. Cette réaction chez les plantes C3 fractionne l'oxygène de 21,7 ‰. Ainsi, l'idée que la respiration pouvait expliquer à elle seule l'effet Dole global ne peut pas être envisagé (à l'exception de la voie AOX).

#### *1.4.1.3. Les premières estimations du fractionnement respiratoire océanique*

Plusieurs expériences ont été menées afin de définir le fractionnement associé aux processus respiratoires des organismes marins. Bender et al. (1994), ont proposé pour le calcul de l'effet Dole global, d'utiliser comme valeur de fractionnement respiratoire : 20 ‰. Cette valeur est issue d'expériences en laboratoire détaillées ci-dessous.

Pour le cas des expériences menées par Kroopnick et Craig (1972), la mesure de l'effet respiratoire a été faite sur du plancton incubé dans de l'eau de mer naturelle. Les expériences ont permis de trouver deux fractionnements pour deux types d'organismes

---

<sup>3</sup> Il est important de mentionner que des expériences menées en laboratoire avec des conditions artificielles ne donnent pas les mêmes résultats que pour des expériences en milieu naturel plus représentatives de la réalité. Le Tableau 1.2 précise le milieu de culture ainsi que l'échelle d'étude.

marins. Pour le plancton, eucaryotes marins et les bactéries, le fractionnement moyen associé à leur respiration est d'environ 20 ‰.

Kiddon et al. (1993), avec des expériences d'incubation à l'obscurité en système fermé avec du plancton naturel ou bien des cultures d'organismes marins, ont les mêmes résultats que pour les expériences de Kroopnick et Craig (1972). Kiddon et al. (1993) ont proposé un fractionnement moyen de la respiration océanique globale de 20 ‰. Le calcul de Bender pour l'effet Dole global est issu de ce résultat.

Quay et al. (1995), ont réitéré une expérience avec des organismes sur des populations naturelles du lac amazonne (par exemple des bactéries et autres organismes eucaryotes), dont les valeurs de discriminations trouvées (17,6 ‰) sont légèrement plus faibles que par rapport aux valeurs de Kiddon et al. (1993).

Luz et Barkan (2011) ont calculé le fractionnement respiratoire océanique moyen mondial à partir d'une distribution mondiale des contributions de divers groupes à la respiration de la communauté de Robinson et Williams (2005) comme étant de 19,7 ‰. Ce résultat est en accord avec la valeur de 20 ‰ suggérée par Kiddon et al. (1993) prise par Bender et al. (1994).

Pour ce qui est de l'intégration du fractionnement respiratoire sous la zone photique, Bender (1990) ont calculé ce fractionnement et ont donné une valeur de 12 ‰ considérant que 5 % de la respiration marine s'effectuait sous la zone euphotique (cette valeur n'a pas été réellement justifiée). Il est connu que la plupart de la matière organique descendante produite par la photosynthèse dans la zone euphotique est oxydée à une profondeur relativement faible de la zone sub-photique (Jenkins et Goldman, 1985).

Pour la zone océanique profonde, Levine et al. (2009) ont calculé un fractionnement respiratoire de 8 ‰. Cependant, le taux de respiration dans le minimum d'O<sub>2</sub> est très faible. Ainsi, l'effet global du faible fractionnement respiratoire dans le minimum d'O<sub>2</sub> de l'océan profond est négligeable. Luz et Barkan (2011) confirme en effet le rôle

négligeable de la respiration *deep-water* (4 %), ils trouvent un fractionnement de 19.4 ‰ qui est similaire au fractionnement océanique global.

#### *1.4.1.4. Les premières estimations du fractionnement photosynthétique*

Comme nous l'avons déjà décrit dans la section 1.4.1.2, le fractionnement respiratoire ne suffit pas à lui seul pour expliquer l'effet Dole. Ainsi, un enrichissement supplémentaire devait être trouvé. Dole et Jenks (1944), dans leur première étude sur le fractionnement, trouvent une discrimination photosynthétique terrestre de 5 ‰. Cette idée est contestée par Vinogradov et al. (1959) qui incriminent cet enrichissement en oxygène 18 dû à la contamination par l'O<sub>2</sub> atmosphérique et la respiration lors des expériences présentées par Dole et Jenks. D'après leurs conclusions, la photosynthèse produit du dioxygène avec un  $\delta^{18}\text{O}$  similaire à celui de l'eau.

Plus récemment, les études de Guy et al. (1989) et (1993), sur des cyanobactéries (*Anacystis nidulans*) et des diatomées (*Phaeodactylum tricornutum*), ont montré qu'à l'échelle cellulaire, il n'y avait pas de fractionnement photosynthétique. Helman et al. (2005) corroborent aussi l'idée que le fractionnement photosynthétique sur les cyanobactéries n'existe pas. Le clivage de l'eau dans le photosystème II ne fractionne pas l'oxygène. Le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  est identique à celui de l'eau du substrat.

#### *1.4.1.5. Les estimations du $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau des feuilles*

Un autre mécanisme entre en jeu, dans le cycle de l'oxygène, celui de la contribution de l'enrichissement du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des feuilles par rapport au SMOW. Sachant que l'enrichissement dans les feuilles peut varier de façon spatiale et temporelle, afin d'avoir une estimation globale, une première méthode a été utilisée basée sur la formulation de l'évaporation d'un réservoir d'eau de Craig et Gordon (1961). Cette formulation a



été adaptée à l'eau des feuilles (petit réservoir) par Dongmann et al. (1974) (Eq.1.7). A partir de cette équation, Dongmann et al. (1974) l'appliquent à chaque région du monde afin de déterminer une valeur globale de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  de 8 ‰.

Une autre méthode afin d'estimer la valeur globale de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  a été de mesurer le  $\delta^{18}\text{O}$  du  $\text{CO}_2$  atmosphérique, un traceur intégratif à l'échelle de la Terre dû au long temps de résidence du  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère. Les échanges entre l'oxygène de  $\text{H}_2\text{O}$  et celui du  $\text{CO}_2$  via l'enzyme anhydrase carbonique permettent d'estimer le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  à partir du  $\delta^{18}\text{O}$  du  $\text{CO}_2$  (Farquhar et al., 1993 ; Gillon et Yakir, 2001). Cette méthode utilisée par Farquhar et al. (1993) a permis de donner un  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des feuilles par rapport au  $\delta^{18}\text{O}$  du SMOW de 4,4 ‰. Gillon et Yakir (2001) qui ont utilisé cette même méthode, ont constaté qu'en raison de la faible activité de l'anhydrase carbonique (enzyme permettant la transformation du  $\text{CO}_2$  en  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) chez les plantes C4, l'enrichissement en  $\text{CO}_2$  ne reflète pas toute l'ampleur de l'enrichissement du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau foliaire par rapport au SMOW, donc ils proposent un enrichissement de plutôt 6 à 8 ‰.

Ainsi, le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des feuilles par rapport au  $\delta^{18}\text{O}$  du SMOW est estimé actuellement à environ 7 ‰. D'après les travaux sur les modèles GSM et GIS par West et al. (2008), le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau des feuilles est aussi donnée à environ 6,5 ‰. Soit une valeur nettement plus haute que celle donnée par Farquhar et al. (1993).

#### *1.4.1.6. Les premiers calculs de l'effet Dole global par Bender et al. (1994) et Hoffmann et al. (2004)*

Bender et al. (1994) ont estimé les valeurs de l'effet Dole terrestre à 22,4 ‰ en utilisant pour le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  la valeur de 4,4 ‰ donné par Farquhar et al. (1993) et pour le fractionnement respiratoire, la valeur de 18 ‰ estimée par Guy et al. (1992), (1993). L'effet Dole océanique a été estimé à 18,9 ‰, avec un effet Dole global calculé à 20,8 ‰. Hoffmann et al. (2004) ont, eux, obtenu : pour l'effet Dole terrestre, 26,9 ‰, soit

une valeur plus forte que pour Bender et al. (1994) car ils ont calculé à l'aide de leur modèle un  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  de 6 ‰. L'effet Dole océanique a été estimé à environ 17 ‰, cette valeur plus faible que pour Bender et al. (1994) est le résultat d'une attribution plus grande de la fraction de la respiration marine à des profondeurs océaniques intermédiaires, soit de 20 % pour Hoffmann et al. (2004) par rapport à 5 % donné par Bender et al., (1994). L'effet Dole global calculé est ainsi égal à 22,9 ‰.

Nous pouvons constater qu'avec les valeurs données par Bender et al. (1994) et Hoffmann et al. (2004), l'effet Dole terrestre et océanique ont des valeurs différentes. Ainsi, l'effet Dole global pourrait être sensible aux variations du rapport de productivité entre le terrestre et l'océan car les effets Dole terrestre et océanique ont des valeurs différentes.

#### *1.4.1.7. Les premières estimations de la productivité*

Les travaux de Bender et al. (1994) sur l'étude de la composition isotopique de l'oxygène dans les bulles d'air dans les carottes de glace ont montré que l'effet Dole était le même au dernier maximum glaciaire (LGM) et à l'Actuel. Ce qui est surprenant, puisqu'il existe des variations assez importantes de la végétation et de l'environnement entre ces deux périodes (Prentice et al., 2010).

Ciais et al. (2012), ont calculé l'effet Dole terrestre et océanique à l'actuel et au LGM. Ils ont déduit le rapport entre la productivité terrestre et la productivité océanique en prenant les estimations du modèle utilisées par Hoffmann et al. (2004). Cette méthode donne des différences significatives entre la GPP océanique et de la GPP terrestre lors de la dernière déglaciation. En particulier à l'Actuel, la GPP terrestre est beaucoup plus faible au LGM qu'au préindustriel (chapitre 4 Tableau 8). Ces résultats sont cependant très dépendants de l'estimation des valeurs de l'effet Dole terrestre et de l'effet Dole océanique.

C'est pourquoi d'autres études, plus précises, ont poursuivi les travaux de recherche sur l'amélioration de la quantification des fractionnements associés aux processus biologiques afin de mieux définir l'effet Dole terrestre et océanique. Jusqu'en 2011, les variations de l'effet Dole sont considérées comme le résultat des changements de la productivité entre le terrestre et l'océan.

## 1.4.2. Nouvelles estimations et réinterprétations de l'effet Dole comme traceur du cycle hydrologique des basses latitudes

### *1.4.2.1. Une révision à la hausse du fractionnement respiratoire océanique*

Tout d'abord, l'océan peut se définir comme un système stratifié à plusieurs couches. La première strate de l'océan (celle de surface) est celle dans laquelle la photosynthèse et la respiration se produisent simultanément. Cette zone est nommée la zone photique ou euphotique ou de surface (Fig.1.24). C'est la zone de l'océan qui reçoit la lumière. Sa profondeur est définie par la profondeur jusqu'à laquelle l'intensité lumineuse est inférieure à 1 % de celle de la surface. Cette profondeur peut atteindre 200 mètres et 90 % des espèces marines se trouvent dans cette zone (comme le phytoplancton par exemple).

Il est important de comprendre que la consommation et la production d'O<sub>2</sub> dans le système océanique est majoritairement réalisée dans cette partie supérieure de l'océan.

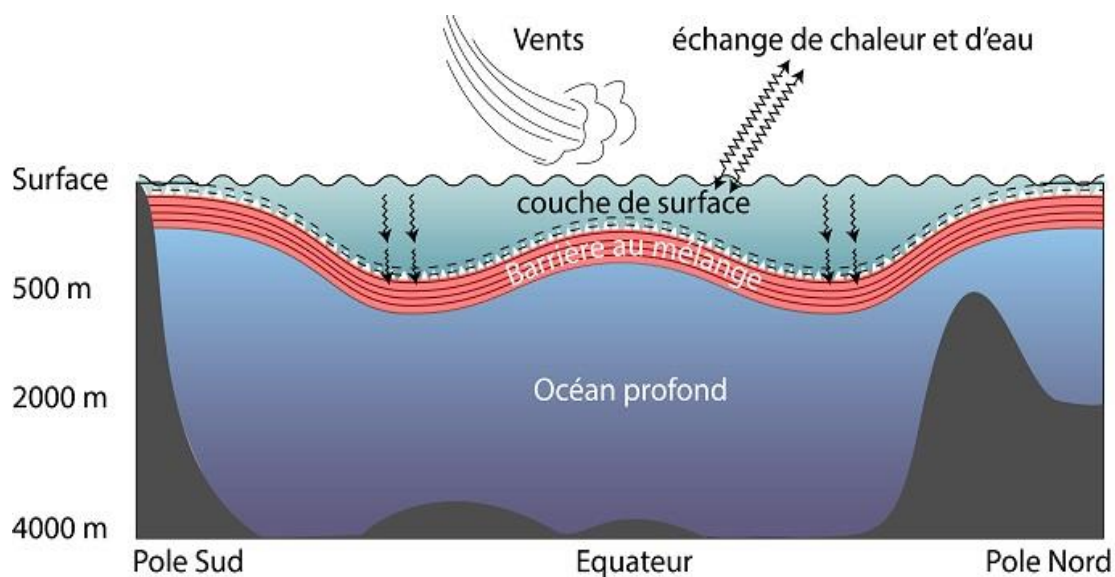


Figure 0.24 : Stratification de l'océan, Jean-Baptiste Sallée, Locean (CNRS/MNHN/IRD/Sorbonne Université)

Il est important de rappeler que la valeur globale acceptée de 20 ‰ pour la discrimination respiratoire océanique est basée sur les résultats des expériences d'incubation à l'obscurité (Kiddon et al., 1993). Travailler en conditions obscures, enlève la contribution des autres processus consommateurs d'O<sub>2</sub>, tels que la photorespiration et la réaction de Mehler, qui n'existent qu'avec de la luminosité. Lors du calcul de fractionnement respiratoire océanique, il manque donc les contributions de ces autres processus. D'après Helman et al. (2005), la réaction de Mehler a une valeur de discrimination basse, de 10 ‰ (Helman et al., 2005) et est estimée à 10 % de la consommation totale des processus consommateurs de dioxygène. Ainsi, l'influence de cette réaction n'est sûrement pas négligeable.

D'après Luz et al. (2002), de forts fractionnements sont observés (discrimination de 22 à 25 ‰) pour la voie AOX qui peuvent contribuer à l'augmentation de la discrimination respiratoire océanique. Ainsi, suivant la communauté de phytoplanctons, qui utilisent plus ou moins la voie AOX, il peut donc y avoir des répercussions quant aux valeurs sur le fractionnement biologique dans les systèmes naturels.

Hendricks et al. (2004), ont fait des mesures in situ dans l'océan Austral et Pacifique équatorial. Le fractionnement respiratoire océanique dans l'océan Austral est de  $22 \pm 1 \text{ ‰}$  et pour le Pacifique équatorial il est égal à  $21 \pm 2 \text{ ‰}$ . En outre, Luz et al. (2002) ont évalué le fractionnement respiratoire de la communauté dans le lac Kinneret et ont observé le même effet isotopique respiratoire moyen ( $22,5 \pm 1 \text{ ‰}$ ). Ainsi, le fractionnement respiratoire océanique a été estimé plus fort depuis les études de Hendricks et al. (2004).

Luz et Barkan (2011), confirment avec une nouvelle expérience en milieu naturel que le fractionnement respiratoire océanique s'élève entre 21 et 27 ‰. Leur expérience se base sur des échantillons provenant de la mer celtique, l'océan Austral, l'Atlantique Nord et la mer Rouge. Une explication a été proposée : il y aurait une absorption plus importante par la voie AOX de l'O<sub>2</sub> en milieu naturel par rapport au laboratoire.

Comme nous pouvons le constater : les estimations basées sur les communautés naturelles dans des situations océaniques ou lacustres réelles (21 ‰ 25 ‰) sont considérablement plus importantes que celles basées sur des incubations en laboratoire (~ 20 ‰). Ainsi, les nouveaux calculs de l'effet Dole océanique doivent envisager une valeur à la hausse pour le fractionnement respiratoire.

#### *1.4.2.2. Fractionnement photosynthétique océanique : évolution des idées*

Comme nous l'avons vu précédemment (section 1.4.1), les études de Guy et al. (1989), (1993), Helman et al. (2005) et Luz et Barkan (2005) montrent qu'il n'y avait pas de fractionnement photosynthétique océanique à l'échelle cellulaire.

Récemment, Eisenstadt et al. (2010) étudient le fractionnement photosynthétique sur des cultures de cellules en laboratoire sur des milieux artificiels qui sont loin des conditions réelles. Les différents organismes étudiés sont le phytoplancton marin et d'eau douce (soit des producteurs primaires comprenant des algues et des

cyanobactéries). Ils trouvent un enrichissement significatif en  $^{18}\text{O}$  des organismes effectuant la photosynthèse par rapport à l'eau du substrat (avec une faible concentration d'oxygène dissous  $< 3\mu\text{M}$ ).

Dans cette étude, Eisenstadt et al. (2010) ont trouvé comme fractionnements photosynthétiques : 4,5 ‰ pour les Diatomées *Phaeodactylum tricornutum*, 3 ‰ pour les Diatomées *Nannocloropsis sp.*, 5,5 ‰ pour les Coccolithophores *Emiliania huxleyi* et 7 ‰ pour les *Chlamydomonas reinhardtii* (= algues vertes).

Luz et Barkan (2011), dans leurs expériences d'incubation sur des échantillons dans la mer Celtique, dans l'océan Austral, dans l'Atlantique Nord et la Mer rouge, trouvent également un fractionnement photosynthétique des producteurs primaires jusqu'à 6 ‰ et un enrichissement photosynthétique moyen par rapport à l'eau de mer dans l'océan de surface de 4 ‰. Les conditions d'études sont bien plus proches des conditions naturelles que pour Eisenstadt et al. (2010).

La nouvelle estimation de l'effet Dole océanique par Luz et Barkan (2011) a été ainsi réévalué à  $23,5 \pm 1,7$  ‰, valeur proche de l'effet Dole global de 23,88 ‰ (mesuré). Ce qui est différent des estimations précédentes comme celle de 18,9 ‰ de Bender et al. (1994) ou bien celle de 16,97 ‰ de Hoffmann et al. (2004). Luz et Barkan (2011) ont utilisé comme nouvelles valeurs afin d'estimer l'effet Dole océanique : 19,7 ‰ pour le fractionnement respiratoire océanique et 4 ‰ pour celui photosynthétique (West et al., 2008).

#### 1.4.2.3. Fractionnement respiratoire des organismes terrestres

Helman et al. (2005) ont confirmé que la photorespiration des feuilles absorbe préférentiellement l'oxygène  $^{16}\text{O}$  et fractionne d'environ 22 ‰. Laws et al. (2000) supposent comme Helman et al. (2005) que la réaction de Mehler est égale à 10 % de l'absorption totale du dioxygène. Cette valeur n'est pas vraiment confirmée puisqu'ils

pensent que cette réaction pourrait être beaucoup plus importante en termes de proportion. Helman et al. (2005) ont proposé un tableau récapitulatif des fractionnements associés à toutes les réactions consommatrices d'oxygène sur plusieurs organismes (Tableau 1.1).

Les estimations d'Helman et al. (2005) ne remettent pas en question le calcul de Bender et al. (1993) pour un calcul global d'effet Dole.

Tableau 0.1 : Pentas isotopiques triples  $O^{17}/O^{18}$  ( $\gamma$ ) et discriminations isotopiques du  $^{18}O$  dans divers processus consommateurs d'oxygène.

| Process  | $n$ | $\gamma$            | $^{18}\epsilon$ |
|--|-----|---------------------|-----------------|
| Respiration ( <i>Synechocystis</i> )           | 14  | $0.5184 \pm 0.0004$ | $-19.4 \pm 0.1$ |
| Respiration ( <i>Synechococcus</i> )           | 7   | $0.5174 \pm 0.0003$ | $-19.5 \pm 0.2$ |
| Respiration (bacteria from Lake Kinneret, T10) | 12  | $0.5180 \pm 0.0002$ | $-17.1 \pm 0.1$ |
| Rubisco oxygenase (pea)                        | 26  | $0.517 \pm 0.001$   | $-21.3 \pm 0.5$ |
| Glycolate oxidase (spinach)                    | 36  | $0.501 \pm 0.001$   | $-21.5 \pm 0.2$ |
| Mehler reaction (pea)                          | 12  | $0.526 \pm 0.002$   | $-10.8 \pm 0.2$ |
| Mehler reaction ( <i>Synechocystis</i> )       | 3   | $0.497 \pm 0.004$   | $-9.6 \pm 1.2$  |

Comme décrit précédemment dans l'équation (1.11), les valeurs des différents fractionnements :  $f_{dark\_respi}$ ,  $f_{photorespi}$  et  $f_{Mehler}$  sont respectivement égales, d'après Landais et al. (2007) à 0,6, 0,4 et 0,1.

#### 1.4.2.4. Fractionnement respiratoire terrestre du sol

Des études sur les fractionnements respiratoires des sols ont été menés par Angert et al. (2001). Ils rapportent, d'après des études sur différents types de sols (argileux ou sableux) que le fractionnement global du sol est égal à environ 12 ‰. Ils trouvent sur ces deux différents types de sol des fractionnements différents : pour le sol sableux le fractionnement est de 11 ‰ et pour le sol argileux de 13 ‰. Avec ces valeurs, le

fractionnement global du sol est significativement plus faible que celui donné en moyenne de 18 ‰ de la respiration sombre générale (voie COX) (section 1.4.1).

Afin de l'expliquer, Angert et Luz (2001) ont fait des expériences sur des racines de plants de *Philodendron* et de semis de blés incubés dans des chambres fermées avec différentes conditions expérimentales.

Plusieurs conclusions en ressortent : tout d'abord, la discrimination au cours du temps (deux mois d'expériences) augmente de 12 à 20 ‰ à la fin de l'expérience (pour le *Philodendron*). De manière plus précise, ils mesurent que les plantules plus jeunes ont une discrimination plus faible (12,6 ‰ - 14 ‰) que pour les plus âgés (15 ‰ en moyenne). L'hypothèse émise est que la voie AOX prend le pas sur la voie COX au fil du temps pour les racines qui vieillissent.

Angert et Luz (2001) ont mesuré au niveau des racines que la discrimination est plus faible. Ceci est dû à une concentration en O<sub>2</sub> plus faible dans les racines car le sol limite la diffusion de l'oxygène (Fig.1.25). Comme la diffusion limite le nombre de molécules d'O<sub>2</sub> pouvant être absorbée par la respiration des racines, la discrimination isotopique lors de la respiration racinaire n'est pas aussi forte que quand le réservoir est infini. La respiration racinaire compte pour 30 à 70 % de la respiration totale du sol (Raich et Schlesinger, 1992). Ainsi, cet effet n'est pas négligeable. Au total, ceci produit une discrimination isotopique globale de 14,5 ‰, ce qui prouve l'importance de ne pas négliger le rôle de la diffusion (Fig.1.25). L'effet Dole global est ainsi diminué de 1.5 ‰.



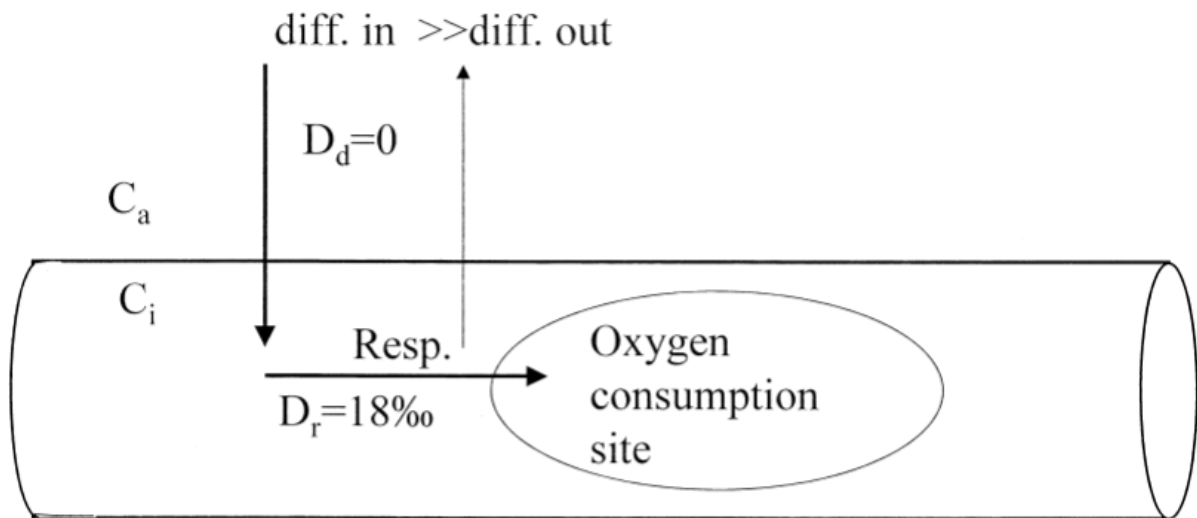


Figure 0.25 : Modèle de racine. L'oxygène diffuse à travers les tissus de la racine avec une discrimination  $D_d$  de 0 ‰, et est respiré à l'intérieur de la racine avec une discrimination  $D_r$  de 18 ‰. Comme la diffusion dans la racine est lente, la concentration interne d'oxygène devient faible ( $C_i$ , par rapport à  $C_a$ ), et la discrimination globale devient inférieure à 18 ‰ (d'après Angert et Luz., 2001).

Angert et al. (2003) étudient également, les fractionnements respiratoires sur différents sols de différents types de climat. Les sols tempérés et boréaux ont un fractionnement respiratoire plus élevé (respectivement 17,8% et 22,5 ‰) par rapport aux sols tropicaux, zone climatique dans laquelle il y a plus de fortes pluies (10,8 ‰). Ainsi, lorsque l'humidité augmente (dans les zones de fortes précipitations), la diffusion de l'oxygène est encore plus limitée, donc le fractionnement respiratoire apparent diminue. Angert et al. (2003) posent aussi comme hypothèse que pour les sols de climats tempérés et boréaux, la voie AOX discrimine plus fortement l'oxygène 18. La production de chaleur par ce mécanisme donne un avantage aux milieux de basses températures du sol. Avec ces trois sols, il en déduit un fractionnement global du sol de 15,8 ‰.

Cette valeur relativement faible du fractionnement respiratoire du sol fait baisser l'estimation globale du fractionnement respiratoire terrestre qui est estimé à 17,7 ‰.

Finalement, Luz et Barkan (2011) estiment l'effet Dole terrestre à  $23,5 \pm 2,3$  ‰, valeur proche de l'effet Dole global et océanique et donc les variations de l'effet Dole global

ne sont plus envisagées comme liées aux variations du rapport de productivité entre le terrestre et l'océan mais plutôt sur les variations du cycle hydrologique aux basses latitudes.

## 1.5. Synthèse sur l'interprétation de l'effet Dole global

La figure 1.26 synthétise les grandes étapes du calcul de l'effet Dole global en séparant les contributions de l'effet Dole terrestre et océanique telles qu'elles étaient estimées avant 2011.

Nous pouvons observer, dans la figure 1.26 qu'un écart entre les valeurs de l'effet Dole océanique ( $\sim 19 \text{ ‰}$ ) et de l'effet Dole terrestre ( $\sim 25 \text{ ‰}$ ) existe.

En considérant les fractionnements respiratoires comme constants, nous pouvons en conclure que si l'effet Dole global (Eq.1.17) varie, c'est que le rapport de productivité entre l'océan et le terrestre (terme  $r$ ) a varié et/ou que les paramètres hydrologiques comme le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$  (flèche 1 dans la figure 1.26) et le terme associé à l'évapotranspiration (flèche 2 dans la figure 1.26) ont varié.

L'hypothèse générale que les fractionnements respiratoires et photosynthétique sont constants dans les équations devrait cependant être vérifiée dans de prochaines études.

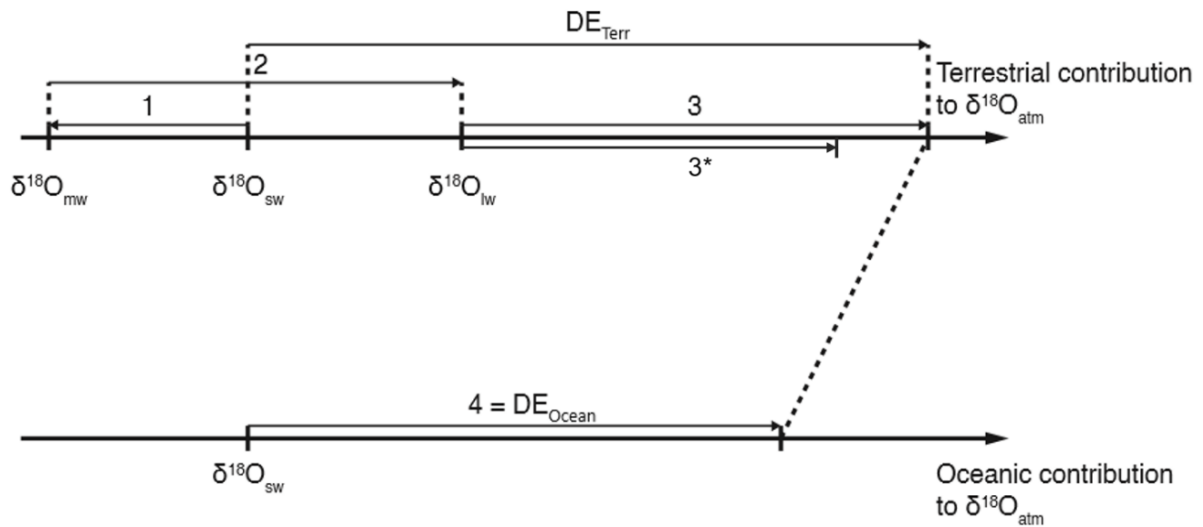


Figure 0.26 : Diagramme des principales contributions au  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ . (1) Fractionnement de l'eau associé à l'évaporation et aux précipitations. (2) Fractionnement de l'eau associée à l'évapotranspiration. (3) Fractionnement de l'oxygène atmosphérique associé à la respiration terrestre et au mélange avec l'oxygène issu de la photosynthèse des feuilles depuis les travaux de Hendricks et al. (2004), l'intégration d'un fractionnement respiratoire plus faible avant leurs travaux a été annoté d'un astérisque \*. (4) Fractionnement de l'oxygène atmosphérique associé à la respiration océanique et mélange avec l'oxygène issu de la photosynthèse océanique.  $DE_{\text{terr}}$  = effet Dole terrestre ( $\approx 24\text{‰}$ ) et  $DE_{\text{oceanic}}$  = effet Dole océanique ( $\approx 19\text{‰}$ ) (issue de Landais et al., 2007).

La figure 1.27 synthétise l'interprétation de l'effet Dole après 2011. Cette fois-ci, il n'y a plus de différences entre l'effet Dole terrestre et océanique. Ainsi, seules les variations de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$  et de  $^{18}\epsilon_{\text{evapotranspi}}$  et éventuellement  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  et  $^{18}\epsilon_{\text{respiration}}$  peuvent expliquer les variations de l'effet Dole global si on suppose que la discrimination liée à la respiration ne varie pas significativement en fonction des périodes.

L'interprétation classique est que les variations de l'effet Dole global sont majoritairement les résultats des variations du cycle hydrologique aux basses latitudes. Cependant, les changements induits par le climat dans le phytoplancton marin peuvent également affecter le  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ . Il existe de nombreuses preuves (Luz et Barkan, 2011) que des changements saisonniers majeurs dans la structure des communautés

phytoplanctoniques accompagnent les changements dans les régimes de mousson et les efflorescences phytoplanctoniques dans l'océan. D'après Luz et Barkan (2011), de tels changements dans la structure de la communauté devraient affecter l'effet de Dole océanique, car l'O<sub>2</sub> produit par les diatomées est significativement plus enrichi en <sup>18</sup>O que l'O<sub>2</sub> provenant de la photosynthèse procaryote.

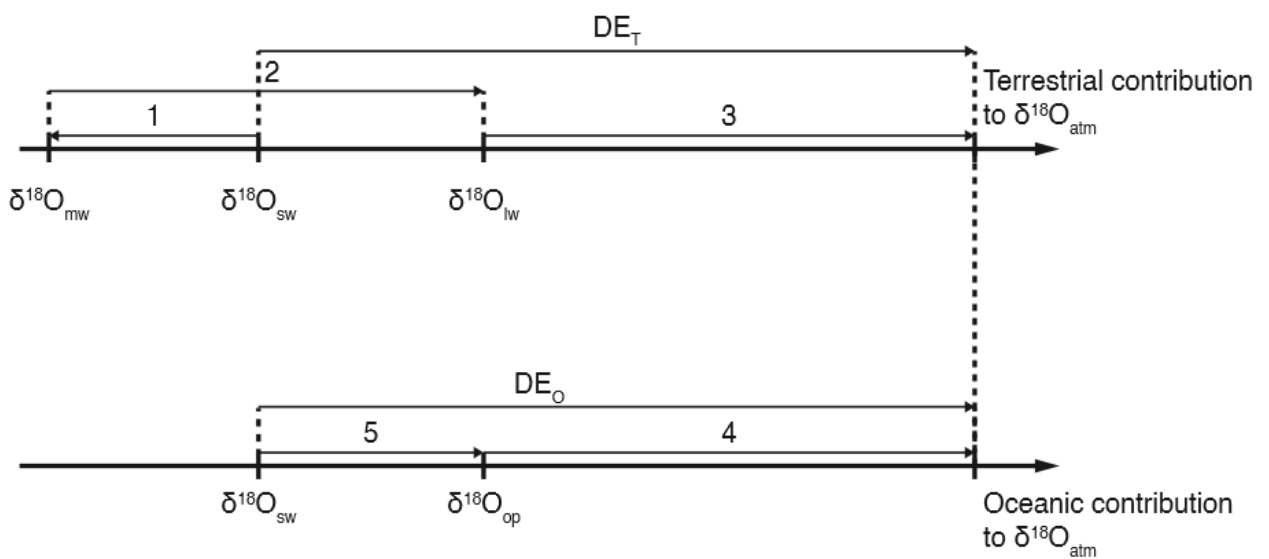


Figure 0.27 : Diagramme des principales contributions au  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ . (1) Fractionnement de l'eau associé à l'évaporation et aux précipitations. (2) Fractionnement de l'eau associée à l'évapotranspiration. (3) Fractionnement de l'oxygène atmosphérique associé à la respiration terrestre et au mélange avec l'oxygène issu de la photosynthèse des feuilles. (4) Fractionnement de l'oxygène atmosphérique associé à la respiration océanique et mélange avec l'oxygène issu de la photosynthèse océanique. (5) Fractionnement associé à la photosynthèse océanique.  $DE_{\text{terr}}$  = effet Dole terrestre ( $\approx 24 \text{ ‰}$ ) et  $DE_{\text{oceanic}}$  = effet Dole océanique ( $\approx 24 \text{ ‰}$ ) (issue de Landais et al., 2007).

Voici un tableau récapitulatif de l'état de l'art sur l'Effet Dole (Tableau 1.2) :

Tableau 0.2: Synthèse des valeurs des : a) discriminations isotopiques utilisées dans le calcul de l'effet Dole et b) estimations de l'effet Dole :  $DE_{terr}$ ,  $DE_{ocean}$ ,  $DE_{global}$

a)

| Auteurs                           | Terrestre   |   | Océanique                            |   | $\delta^{18}O_{lw}$ | Milieu de culture | Echelle d'étude        |
|-----------------------------------|---|---|--------------------------------------|---|---------------------|-------------------|------------------------|
|                                   | $^{18}\epsilon_{respiration}$<br>(‰)  | $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$<br>(‰) | $^{18}\epsilon_{respiration}$<br>(‰) | $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$<br>(‰) |                     |                   |                        |
| Dole et Jenks (1944)              |   | - 5                                     |                                      |   |                     | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |
| Lane et Dole, 1956                | 7 - 25  |   |                                      |   |                     | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |
| Kroopnick et Craig (1972)         |   |   |                                      | 19<br>(eucaryotes)<br>21<br>(Bactéries) |                     | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |
| Dongmann (1974)                   |   |   |                                      |   | 8                   | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |
| Guy et al. (1989), (1992), (1993) | $^{18}\epsilon_{respiration} =$<br>17 - 19<br>(COX)<br>24 - 26<br>(AOX)<br>$^{18}\epsilon_{mehler}$<br>= 15.3<br>$^{18}\epsilon_{photorespi}$<br>= 22.7 |   |                                      | 0                                       |                     | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |
| Farquhar et al. (1993)            |   |   |                                      |   | 4,4                 | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |
| Kiddon et al. (1993)              | 20  |   |                                      |   |                     | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |
| Quay et al. (1995)                | 17,6  |   |                                      |   |                     | Laboratoire       | Cellulaire / Organisme |

|                          |  |          |                      |                        |
|--------------------------|--|----------|----------------------|------------------------|
| Bender et al. (1994)     |  |          | Laboratoire          | Cellulaire / Organisme |
| Gillon et Yakir (2001)   |  | 6 - 8    | Laboratoire          |                        |
| Angert et Luz (2001)     | Sol :<br>14,5  |          | Naturel              | Communauté             |
| Angert et al. (2001)     | Sol :<br>12 ± 1  |          | Laboratoire          | Communauté             |
| Luz et al. (2002)        |  | 22,5 ± 1 | Naturel              | Communauté             |
| Luz et Barkan (2005)     |  | 0        | Naturel              | Communauté             |
| Helman et al. (2005)     | $^{18}\epsilon_{photorespi}$<br>= 22<br>$^{18}\epsilon_{mehler}$<br>= 10 | 0        | Laboratoire          | Cellulaire / Organisme |
| Landais et al. (2007)    | Sol global :<br>15,8 – 17,7  |          | Laboratoire / Modèle |                        |
| West et al. (2008)       |  | 6,5      | Modèle               |                        |
| Eisenstadt et al. (2010) |  | ~ 6      | Laboratoire          | Cellulaire / Organisme |
| Luz et Barkan (2011)     |  | 19,7     | Naturel              | Communauté             |

b)

|                           | DE global (‰) | DE <sub>terr</sub> (‰) | DE <sub>ocean</sub> (‰) |
|---------------------------|---------------|------------------------|-------------------------|
| Kroopnick et Craig (1972) | 23,5 ± 0,3    |                        |                         |
| Bender et al. (1994)      | 22,4          | 18,9                   | 20,8                    |
| Hoffmann et al. (2004)    | 25,9          | 17                     | 22,9                    |
| Barkan et Luz (2005)      | 23,88 ± 0,02  |                        |                         |
| Luz et Barkan (2011)      | 23,5 ± 2,3    | 23,5 ± 1,7             | 23,2                    |

## 1.6. Conclusion

En conclusion, nous pouvons donner quelques points clés des idées essentielles de ce chapitre 1 :

1. L'effet Dole global est actuellement considéré comme un marqueur des variations du cycle hydrologique (moussons) aux basses latitudes.

2. Cependant, de nombreuses études ont été faites pour quantifier les fractionnements biologiques qui définissent l'effet Dole global. Les résultats de ces études modifient la façon dont l'effet Dole est interprété. En particulier, l'effet Dole global a aussi été utilisé comme un marqueur des variations du ratio de productivité entre le terrestre et l'océan.

4. Les questions qui restent en suspens sont de savoir s'il existe un fractionnement photosynthétique terrestre ainsi que de savoir si les fractionnements biologiques (respiratoires et photosynthétiques terrestres et marins) varient dans le temps. En particulier, se focaliser sur les fractionnements terrestres biologiques des plantes car les études précédentes sont beaucoup plus concentrées sur le marin.

5. En outre, étudier si des variations de paramètres environnementaux, comme la température (Stolper et al., 2018) et la concentration en dioxyde de carbone jouent un rôle sur les valeurs des fractionnements biologiques, cela permettrait de considérer un panel encore plus large de paramètres influençant sur ces fractionnements et ainsi les estimer plus précisément dans le passé avec les variations des conditions environnementales et climatiques.

L'objectif de cette thèse dans les chapitres suivant est de continuer ce travail de quantification de ces fractionnements biologiques de manière plus précise et innovante.

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Ce chapitre a pour objectif de décrire les méthodes utilisées pour analyser la composition isotopique de l'oxygène de l'air dans les chambres biologiques afin de pouvoir mieux quantifier les coefficients de fractionnement associés aux processus biologiques.

Dans un premier temps, les expériences permettant d'étudier les flux isotopiques de l'oxygène lors de la respiration et de la photosynthèse ont été réalisées en chambres biologiques multiplexées à l'ECOTRON de Montpellier. La deuxième étape consistait à traiter les échantillons à analyser. Tout d'abord, les ampoules d'air ont été récupérées dans les chambres biologiques à l'ECOTRON de Montpellier ainsi que des ampoules remplies de feuilles et des ampoules avec de l'eau d'irrigation. Dans l'ensemble de ces échantillons, la composition isotopique de l'oxygène de l'air et de l'eau, soit les isotopes de l'oxygène 16, 17 et 18 et la concentration en dioxygène avec les espèces argon et diazote ont ensuite été analysées au LSCE. Pour cela, les échantillons d'air ont été purifiés sur une ligne dédiée afin d'éliminer les gaz pouvant créer des interférences lors de la mesure. L'eau des feuilles a été extraite grâce à une colonne de distillation et les échantillons d'eau ont été traités par la technique de fluorination pour transformer l'eau en dioxygène, plus facile à analyser.

L'ensemble des analyses a été fait par spectrométrie de masse au LSCE et par spectroscopie optique directement dans le circuit avec les chambres biologiques à l'ECOTRON de Montpellier. Ce chapitre 2 consiste à présenter les méthodes analytiques.

J'ai fait le choix de présenter succinctement la chambre biologique qui est par la suite entièrement détaillée dans le chapitre 3 dans l'article Paul et al. (2023). J'ai aussi choisi d'intégrer un article bientôt soumis qui présente l'ensemble du multiplexage avec trois



chambres en parallèle. Ces choix ont été faits afin de présenter tous les matériels et méthodes utilisés lors de cette thèse expérimentale.

## 2.1. Mesures de la composition isotopique de l'oxygène de l'air en système fermé dans des chambres biologiques

### 2.1.1. Description du montage de la chambre biologique fermée et contrôlée

Afin de pouvoir étudier les fractionnements associés aux processus biologiques de la respiration et de la photosynthèse, des chambres biologiques fermées et contrôlées ont été développées à l'ECOTRON de Montpellier. Ces chambres sont des adaptations des chambres utilisées par Milcu et al. (2013) que l'ECOTRON a pu récupérer. Un prototype de chambre biologique a été testé avant le commencement de la thèse afin d'en valider le principe de fonctionnement. Les premières manipulations faites sur la fétuque, dont les résultats ont été publiés dans Paul et al. (2023), avaient ainsi déjà été en partie réalisées avant la thèse sur cette chambre biologique. J'ai travaillé sur la dernière et quatrième expérience (nommée séquence 4) et j'ai traité et analysé l'entièreté des données des quatre expériences. A partir de la deuxième année de thèse, j'ai pu travailler sur un système multiplexé et automatisé, c'est-à-dire, sur plusieurs chambres en parallèle (les détails sont donnés dans l'article Paul et al. (in prep) dans la section 2.1.2). J'ai pu participer au développement de ce nouveau système multiplexé avec l'aide de l'ECOTRON de Montpellier (Clément Piel, Joana Sauze, Sébastien Devidal) ainsi que l'aide du LSCE (Amaëlle Landais, Frédérique Prié, Roxanne Jacob, Olivier Jossoud, Arnaud Dapoigny).

Comme il s'agit de mesurer des petits signaux isotopiques, il est nécessaire de travailler sur un système fermé et l'étude des flux se fait par accumulation du signal dans la

chambre. Tous les paramètres climatiques sont contrôlés dans la chambre et sont stabilisés (Fig.2.1).



*Figure 2.1 : Photographie de la chambre biologique dans le microcosme*

La description très détaillée de la chambre biologique décrite ci-dessous (Fig.2.2) est donnée dans l'article Paul et al. (2023) dans la section 3.2 du chapitre 3 et les modifications qui ont été apportées à cette chambre, au cours de cette thèse, sont présentées dans l'article Paul et al. (in prep) dans ce chapitre 2 dans la section 2.1.2.

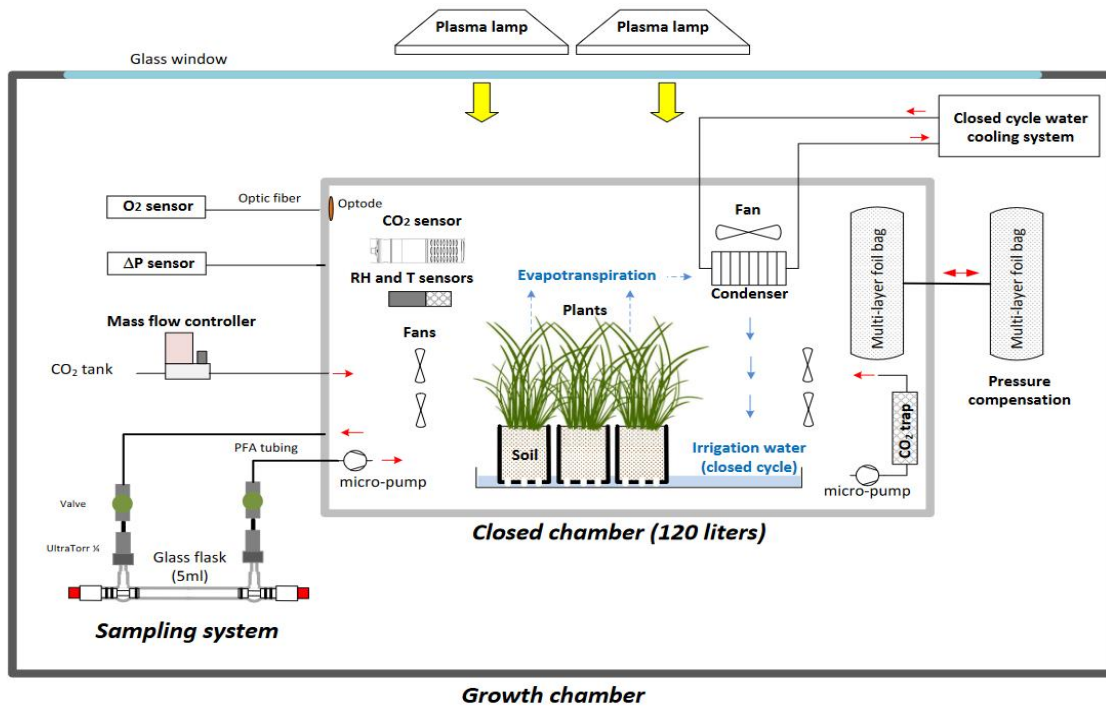


Figure 0.2 : Chambre biologique (extrait de Paul et al., 2023)

La chambre biologique est une chambre transparente, étanche à l'air ambiant et fabriquée à partir de polycarbonate soudé (épaisseur de paroi de 10 mm et volume de 120 L). La chambre a été utilisée comme un système fermé d'échange de gaz (Field et al., 1989) avec des paramètres environnementaux contrôlés et surveillés en continu. Voici l'ensemble de ces paramètres :

- Afin de contrôler la température et l'intensité lumineuse à l'intérieur de la chambre fermée, cette petite chambre a été placée dans une plus grande chambre de croissance à environnement contrôlé (nommé microcosme, <https://www.ecotron.cnrs.fr>) :
  - La lumière était fournie par deux lampes à plasma, avec PAR = 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, allumées pour les périodes de jour lors des expériences.
  - La température de l'air à l'intérieur de la chambre fermée a été régulée en moyenne à 19/20°C. Pour compenser l'effet de serre (par la chaleur

libérée par les lumières des microcosmes) lors des périodes de jour et ainsi avoir une température interne de la chambre stable, la température du microcosme est diminuée à 17°C. Pour la nuit, la température de celui-ci est à 20°C.

- L'humidité relative de l'air a été régulée entre 80 % et 90 % à l'aide d'un échangeur de chaleur (faisant office de condenseur) connecté à un système de refroidissement à l'eau à cycle fermé. Le condenseur a été positionné de manière à créer un cycle d'eau fermé dans la chambre biologique : la vapeur d'eau qui provient de l'évapotranspiration est condensée et permet ainsi l'irrigation du milieu.
- Afin que la concentration en CO<sub>2</sub> reste stable, d'une valeur proche de 400 ppm, pendant les périodes de jour, l'absorption photosynthétique de CO<sub>2</sub> a été compensée par des injections de CO<sub>2</sub> pur à l'aide d'un régulateur de débit massique. Pendant les périodes d'obscurité, un piège à chaux sodée connecté à une micro-pompe a été utilisé pour éliminer l'excès de CO<sub>2</sub> provenant de la respiration. La concentration atmosphérique de CO<sub>2</sub> pendant la nuit a été maintenue en dessous de 200 ppm.
- Afin d'assurer la stabilité de la pression atmosphérique dans la chambre fermée, un système de compensation de la pression, composé de deux sacs étanches au gaz de 10 L, reliés entre eux, a été utilisé. Chaque sac était à moitié rempli d'air atmosphérique : le premier a été installé dans la chambre fermée, tandis que le second était à l'extérieur de la chambre. De cette manière, chaque sac se gonflait ou se dégonflait en réponse aux variations de pression causées par l'absorption ou la libération d'O<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub>, et par les échantillonnages.

A savoir que l'air enfermé a été mélangé à l'aide de sept ventilateurs (avec moteur sans balais) et est considéré comme homogène.

En outre, un ensemble de capteurs ont permis de contrôler les évolutions, lors des expériences, de l'ensemble de ces paramètres climatiques :

- La température de l'air et du sol, l'humidité relative de l'air, et la concentration atmosphérique de CO<sub>2</sub> ont été mesurées et enregistrées à l'aide de l'enregistreur de données de la chambre de croissance (fréquence d'échantillonnage = 1 min).
- La concentration en O<sub>2</sub> a été mesurée en continu à l'aide d'un capteur optique (optode). La valeur mesurée de l'O<sub>2</sub> pour l'air atmosphérique a été ajustée à 20,9 % avant chaque séquence d'expériences.
- La différence de pression entre la chambre fermée et l'atmosphère a été régulièrement mesurée à l'aide d'un capteur différentiel.

En résumé, voici l'ensemble des consignes climatiques choisies pour les expériences, dans le tableau ci-dessous :

*Tableau 2.1 : Ensemble des paramètres climatiques contrôlés dans une chambre biologique*

| Paramètre contrôlé  | Température (°C) | Humidité relative (%) | Concentration CO <sub>2</sub> (ppm) | Concentration O <sub>2</sub> (%) | Pression (hPa) | Luminosité (μmol/m <sup>2</sup> /s) |
|---------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| Consigne climatique | 20               | 80 - 90               | 400 (jour)<br>200 (nuit)            | 20.9 (début expérience)          | Atmosphérique  | 200                                 |

Dans la version finale de la chambre biologique, multiplexée et automatisée, l'humidité relative dans chaque chambre a été contrôlée à l'aide d'un refroidisseur thermoélectrique (élément Peltier de 100 watts). Le côté refroidi du refroidisseur était en contact thermique avec une tige d'aluminium (1,5 cm de diamètre) connectée à un échangeur de chaleur agissant comme condenseur à l'intérieur de la chambre. La température du bloc du condenseur a été contrôlée à l'aide d'une thermistance, et l'eau

condensée a été dirigée vers le plateau en plastique contenant la plante à l'aide d'un tube en plastique de 8 mm. D'autres petites différences avec la première version de la chambre sont expliquées dans l'article Paul et al. (in prep) dans le chapitre 2, section 2.1.2.

### 2.1.2. Article<sup>1</sup> : *A multiplexing system for quantifying oxygen fractionation factors in closed chambers*

Comme expliqué dans la section précédente, des mesures en chambre seule ont été faites lors de la première année de thèse (chapitre 3). Un des longs travaux de cette thèse en collaboration avec l'ECOTRON a été de développer un système de multiplexage afin de pouvoir étudier plusieurs chambres en parallèles. Ceci a permis d'améliorer la reproductibilité des expériences et d'augmenter le nombre de données. Un long travail de réflexion a été nécessaire pour la mise en place du multiplexage, que cela soit d'un aspect technique (installation du système de circulation de l'air et des vannes et du système électrique) ainsi que pour automatiser le système entier via la création d'un programme python (écrit par Olivier Jossoud). Toute cette phase de test a duré plusieurs mois. Nous avons dû commencer par tester toutes les chambres, vérifier qu'elles fonctionnaient (systèmes de contrôle des paramètres, système d'ouverture et fermeture des vannes), ainsi que vérifier leur similarité dans la stabilisation des paramètres climatiques pour la comparaison des données ensuite. Nous avons aussi testé le système automatisé et multiplexé. En outre, un des challenges durant cette thèse a été d'intégrer un instrument optique laser (SARA-O<sub>2</sub>, reposant sur la technique OF-CEAS) dans le circuit fermé afin d'étudier en continu la composition isotopique en dioxygène des chambres en parallèle (description section 2.3.2.2). Cet instrument est le premier de ce type permettant la mesure en continu à haute précision

---

<sup>1</sup>La version proposée ici est la version finale avant soumission. Nous devons attendre avant de le soumettre car nous avons besoin de référer un article présentant les performances de l'instrument SARA-O<sub>2</sub> (cf annexe, Piel et al., *preprint*). Et cet article ne vient d'être soumis que très récemment.

de la composition isotopique du dioxygène c'est pourquoi nous avons aussi décrit ses performances dans l'article présenté en annexe de Piel et al., *preprint*).

A partir de ces expériences, nous n'étudions plus la composition isotopique en oxygène 17 puisque l'instrument laser n'est pas assez précis.

Dans cette section, je présente le système de multiplexage avec un article intitulé '*A multiplexing system for quantifying oxygen fractionation factors in closed chambers*'. Cet article présente les modifications des nouvelles chambres ainsi que tout le travail de l'installation du multiplexage et de comparaison des données entre celles procurées en continu par le SARA-O<sub>2</sub> et les données récupérées par le système d'ampoules en discontinu, ensuite analysée au LSCE par spectroscopie de masse (IRMS).

# A multiplexing system for quantifying oxygen fractionation factors in closed chambers

Clémence Paul<sup>1</sup>, Clément Piel<sup>2</sup>, Joana Sauze<sup>2</sup>, Olivier Jossoud<sup>1</sup>, Arnaud Dapoigny<sup>1</sup>, Daniele Romanini<sup>4</sup>, Frédéric Prié<sup>1</sup>, Sébastien Devidal<sup>2</sup>, Roxanne Jacob<sup>1</sup>, Alexandru Milcu<sup>2,3</sup> and Amaëlle Landais<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, LSCE - IPSL, CEA-CNRS-UVSQ, Université Paris-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Ecotron Européen de Montpellier (UAR 3248), Univ Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Campus Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France

<sup>3</sup> CEFÉ, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

<sup>4</sup> Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Univ Grenoble Alpes, CNRS/UGA, Saint-Martin-d'Hères, France

Correspondence: Clémence Paul ([clemence.paul@lsce.ipsl.fr](mailto:clemence.paul@lsce.ipsl.fr))



## Abstract

The study of isotopic ratios of atmospheric oxygen in fossilized air trapped in ice core bubbles enables the reconstruction of variations in the hydrological cycle at low latitudes and past productivity. However, to refine these interpretations, it is necessary to better quantify fractionation of oxygen in the biological processes such as photosynthesis and respiration. We set up a system of closed biological chambers in which we studied the evolution of elemental and isotopic composition of O<sub>2</sub> due to biological processes. To easily replicate experiments, we developed a multiplexing system described in details in the manuscript. We compared measurements of elemental and isotopic composition of O<sub>2</sub> using two different measurement techniques: optical spectrometry (Optical-Feedback Cavity- Enhanced Absorption Spectroscopy, i.e. OF-CEAS technique), which enables higher temporal resolution and continuous data collection and infrared mass spectrometry (IRMS) with a flanged air recovery system, thus validating the data analysis conducted through the OF-CEAS technique. As a first application, we investigated isotopic discrimination during respiration and photosynthesis. We conducted a 5-day experiment using maize (*Zea mays* L.) as model species. The <sup>18</sup>O discrimination value for maize during dark plant respiration was determined as  $- 17.8 \pm 0.9 \text{ ‰}$  by IRMS and  $- 16.1 \pm 1.1 \text{ ‰}$  by optical spectrometer. We also found a value attributed to the isotopic discrimination of terrestrial photosynthesis equal to  $+ 3.2 \pm 2.6 \text{ ‰}$  by IRMS and  $9.6 \pm 5.4 \text{ ‰}$  by optical spectrometer. These findings were consistent with a previous study by Paul et al. (2023). These results validate both, the multiplexing system and the OF-CEAS technique for studying biological fractionations. Moreover, those results suggest that the contribution of terrestrial productivity to the Dole effect is not negligible.

# 1. Introduction

Oxygen, the most abundant chemical element on Earth, is present in all the geological layers, both internally and externally. In the surface layers of the Earth (atmosphere, biosphere, ocean), it is produced from water through the well-known biological process of photosynthesis. Consumption of O<sub>2</sub> is mainly due to respiration. These fluxes are responsible for the seasonal variations of dioxygen concentration in the atmosphere and play a role in the longer-term evolution of O<sub>2</sub> (Stolper et al., 2016). Oxygen consists of three stable isotopes: <sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O and <sup>18</sup>O. By measuring the ratios of these isotopes, we can document the physicochemical and biological processes involved in the oxygen cycle. We use the δ<sup>18</sup>O notation to express the isotopic signal of oxygen compared to a reference isotopic ratio (Eq.1):

$$\delta^{18}O_{calibrated} = \left[ \frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{sample}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{standard}} - 1 \right] \times 1000 \quad (1)$$

Oxygen isotopes do not have the same thermodynamic properties. Thus, during phase changes, fractionation occurs which is measured by the fractionation factor  $\alpha$  (Eq.2):

$$^{18}\alpha = \frac{^{18}R_{product}}{^{18}R_{substrat}} \quad (2)$$

Where  $^{18}R$  is the ratio of the concentration:  $^{18}R = \frac{n(^{18}O)}{n(^{16}O)}$  and  $n$  the number of moles of O<sub>2</sub> containing <sup>18</sup>O or <sup>16</sup>O.

The isotopic composition of dioxygen in the atmosphere,  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in air, is often noted  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ . This signal, measured in the air bubbles in ice cores, can be related to the past variations of the hydrological cycle of water in the low latitudes, the relative proportion of oceanic vs terrestrial productivity as well as to the biosphere productivity (Bender et al., 1994; Luz et al., 1999; Malaizé et al., 1999; Blunier et al., 2002; Severinghaus et al., 2009; Landais et al., 2010; Brandon et al., 2020; Yang et al., 2022). The second application can be done using  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  only as long as the fractionation coefficients of  $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$  associated with biological processes are known. The third application (biosphere productivity reconstruction) relies on the observation that biological productivity processes (respiration and photosynthesis) fractionate oxygen in a mass dependent manner (i.e. there is a consistent relationship between changes in  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , approximately equal to 0.5), while dioxygen originating from exchanges with the stratosphere has an isotopic composition affected by mass independent fractionation (hence a relationship between changes in  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  significantly different from 0.5 i.e. between 1 and 2). The relative proportion of biosphere productivity vs stratospheric exchange fluxes sets the value of the relationship between  $\delta^{17}\text{O}$  vs  $\delta^{18}\text{O}$  in the troposphere, which has been often described as  $\Delta^{17}\text{O} = \ln(1 + \delta^{17}\text{O}) - 0.516 \times \ln(1 + \delta^{18}\text{O})$  (Luz et al., 1999). In parallel, the same parameter  $\Delta^{17}\text{O}$  measured in the air dissolved in the ocean permits to constrain the gross biosphere productivity when combined with the concentration of  $\text{O}_2$  measured as the ratio  $\text{O}_2/\text{Ar}$  (Luz et al., 2000).

Despite our system can in theory enable determination of the triple isotopic composition of  $\text{O}_2$  (through IRMS), we will focus on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in the present study. We thus concentrate on fractionation coefficients needed to interpret  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  records only.

Several studies conducted over the years at the cell level (Guy et al., 1993; Angert et al., 2001; Helman et al., 2005; Eisenstadt et al., 2010; Stolper et al., 2018) have revealed

variations in oxygen fractionation among different biological species and methods employed. Guy et al. (1993) conducted investigations on spinach thylakoids, cyanobacteria (*Anacystis nidulans*) and diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*), and showed that respiration fractionates the oxygen by about 21 ‰. Kroopnick and Craig (1972) measured this effect on plankton incubated in natural seawater and gave a value of around 21 ‰ too. Luz and Barkan (2002) found a respiratory fractionation of 21.6 ‰ on incubation experiments with natural plankton in Lake Kinneret. Finally, the global average oceanic respiratory fractionation value given by Luz and Barkan (2011) is 19.7 ‰, on samples in the Celtic Sea, Southern Ocean, North Atlantic and Red Sea. For terrestrial respiration, Bender et al. (1994) gave a global respiratory fractionation value of 18 ‰. Angert et al. (2001) focused on soil samples and gave a soil respiratory fractionation (roots and micro-organisms) of around 12 ‰. This lower value is the result of the role of roots in limiting oxygen diffusion in the consumption site.

Furthermore, Guy et al. (1993) showed that photosynthesis does not fractionate oxygen between the water consumed and the dioxygen produced by the organism. Conversely, Eisenstadt et al. (2010) found a discrimination up to 6 ‰ for oceanic photosynthesis on a study on oceanic phytoplankton, whereas Paul et al. (2023) found a positive discrimination of  $3.7 \pm 1.3$  ‰ for terrestrial photosynthesis with an experiment performed at the scale of a closed controlled biological chamber with *Festuca arundinacea*.

The variety of values found for the different studies can be attributed to the different set-up used, different environment or different species. To determine robust values of fractionation coefficients, it is necessary to proceed in a systematic way and use the same set-up for a large variety of plants and environments.

In this study, we present an automated setup which can be used to perform numerous systematic studies of the fractionation factor of oxygen during biological processes. Similar to the study of Paul et al. (2023), we used closed controlled biological chambers to quantify oxygen fractionation factors associated with respiration and photosynthesis of *Festuca arundinacea*. The novelty is that we worked with up to three closed chambers simultaneously in an automated way which allows an exploration of numerous different plant species and climatic conditions. Moreover, the isotopic analyses are now performed with an optical spectrometer (Optical-Feedback Cavity-Enhanced Absorption Spectroscopy, i.e. OF-CEAS technique) in addition to IRMS (Isotopic Ratio Mass Spectrometry). This spectrometer allows studying the concentration and the isotopic composition of O<sub>2</sub> in the different chambers in a continuous way.

This manuscript is organized as follows. First, we will present new developments on closed biological chambers compared to the study of Paul et al. (2023) as well as the multiplexing system integrating continuous measurements of elemental and isotopic composition of O<sub>2</sub>. Then, we will present the results of a biological experiment where photosynthesis and respiration took place. Finally, we will provide estimate of fractionation factors through two analytical techniques: optical spectrometry and isotopic ratio mass spectrometry (IRMS).

## 2. Material and Methods

### 2.1. Growth chamber and closed system

A set of three airtight transparent welded polycarbonate chambers (120 L volume) were adapted from the chamber described in Paul et al. (2023) and Milcu et al. (2013). The main controlled environmental parameters inside the closed chambers were temperature, light intensity, CO<sub>2</sub> concentration, relative humidity and differential pressure.

CO<sub>2</sub> mixing ratio during light period (when the CO<sub>2</sub> flux is dominated by plant photosynthesis) was regulated with short (30 seconds) pulses of pure CO<sub>2</sub> provided at regular intervals (90 seconds for a sequence with three chambers) to each chamber using a mass flow controller (F200CV, Bronkhorst, The Netherlands) and a Valco selector (EUTF-SD12MWE, VICI AG International, Switzerland). During the dark period (when CO<sub>2</sub> flux arises from plant and soil respiration) the injection of pure CO<sub>2</sub> is restricted, and instead, a CO<sub>2</sub> trap is engaged. The CO<sub>2</sub> trap comprised a 0.5-liter cylinder filled with soda lime and was connected to a NMS020B KNF micropump.

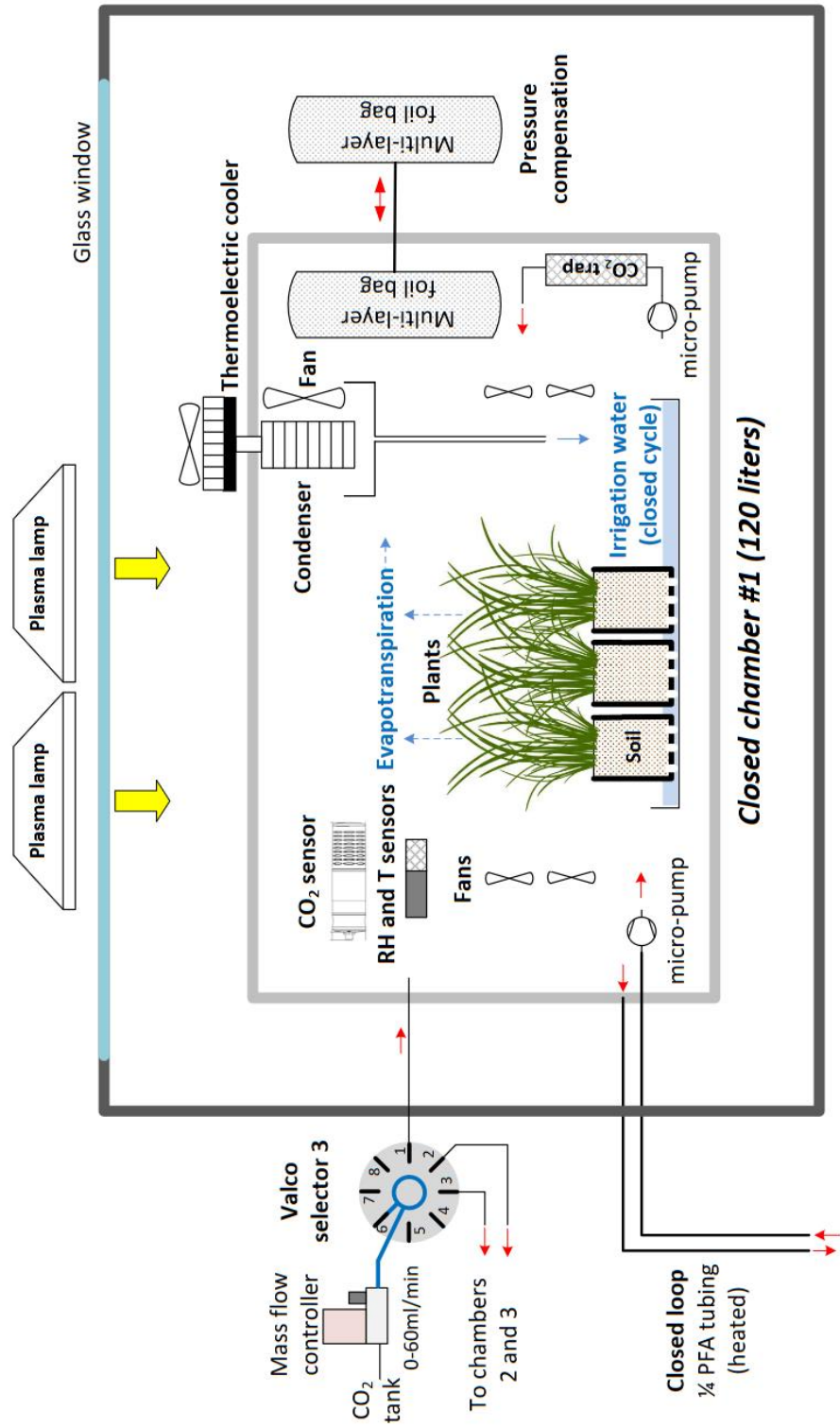
Unlike the system described in Paul et al. (2023) (Fig.1), relative humidity in each chamber was controlled using a thermoelectric cooler (100 watt, ET-161-12-08-E Adaptive). The cooled side of the cooler was in thermal contact with an aluminum rod (1.5 cm diameter) connected to a heat exchanger acting as condenser inside the chamber. The temperature of the condenser block was monitored with a thermistor, and the condensed water was directed to the plastic tray containing the plant using an 8 mm plastic tube.

Each chamber was used as a closed gas exchange system, and placed in a separate controlled environment growth chamber, in the Microcosms experimental platform of the

Montpellier European Ecotron. The temperature of the growth chamber was automatically adjusted in order to keep constant the temperature inside the closed chamber (usually between 20 and 21°C during dark period and around 18°C during light period because of the greenhouse effect in the chamber). Air and soil temperature were monitored using 4 NTC probes (CTN 35, Carel). Air relative humidity and temperature were monitored with a capacitive humidity sensor and a PT100 (PFmini72, Mitchell Instruments, USA). Air CO<sub>2</sub> mixing ratio was monitored using a K30 probes (K30, Senseair).

To find potential leaks in each chamber, helium tests were regularly performed.

a)



« Microcosm » growth chamber

Multiplexer with automated flask sampling system + O<sub>2</sub> isotopes analyser



b)



Figure 1. The set-up of the closed chamber system hosting a vegetation-soil atmosphere analogue of the terrestrial biosphere. (a) Schematic of the closed chamber setup used for the terrestrial biosphere model. The closed chamber was enclosed in a larger growth chamber. Main environmental parameters inside the closed chamber were actively controlled and monitored: temperature ( $T$ ), light intensity,  $\text{CO}_2$ , relative humidity ( $\text{RH}$ ), pressure differential ( $\Delta P$ ). The water cycle in the closed chamber is shown in blue. (b) Photograph of the closed chamber used in the experiment with *Zea Mays*.

## 2.2. Multiplexing system

With this set-up, we continuously measured the isotopic composition of  $\text{O}_2$  using an online optical spectroscopy instrument, hereafter the isotopic analyzer. For each chamber, air circulated through two external closed loops connected by a tee. The first loop is made

of 1/8-inch PFA tubing and used a Valco selector (12 positions 1/8 inch, EUTF-SD12MWE, VICI AG International, Switzerland) to enable the air to circulate from one closed chamber through the isotopic analyzer and back to the closed chamber (Fig.2). The Valco valve selected the origin of the air to be sent to the isotopic analyzer. Five different origins can be selected (but more can be added): three different closed system chambers and two reference gases ((1) dried atmospheric air (with a magnesium perchlorate trap), (2) synthetic air (Alphagaz 2, Air Liquide, France) or dry natural air with 23 % O<sub>2</sub> (Natural Air, Air Liquide Espana, Spain)). Air at the entrance of the isotopic analyzer was dried with a 20 cm long trap (6 mm PFA tube filled with magnesium perchlorate, renewed daily), and filtered (Millex-FH 0.45 µm/50 mm PTFE hydrophobic filter, Merck, Germany).

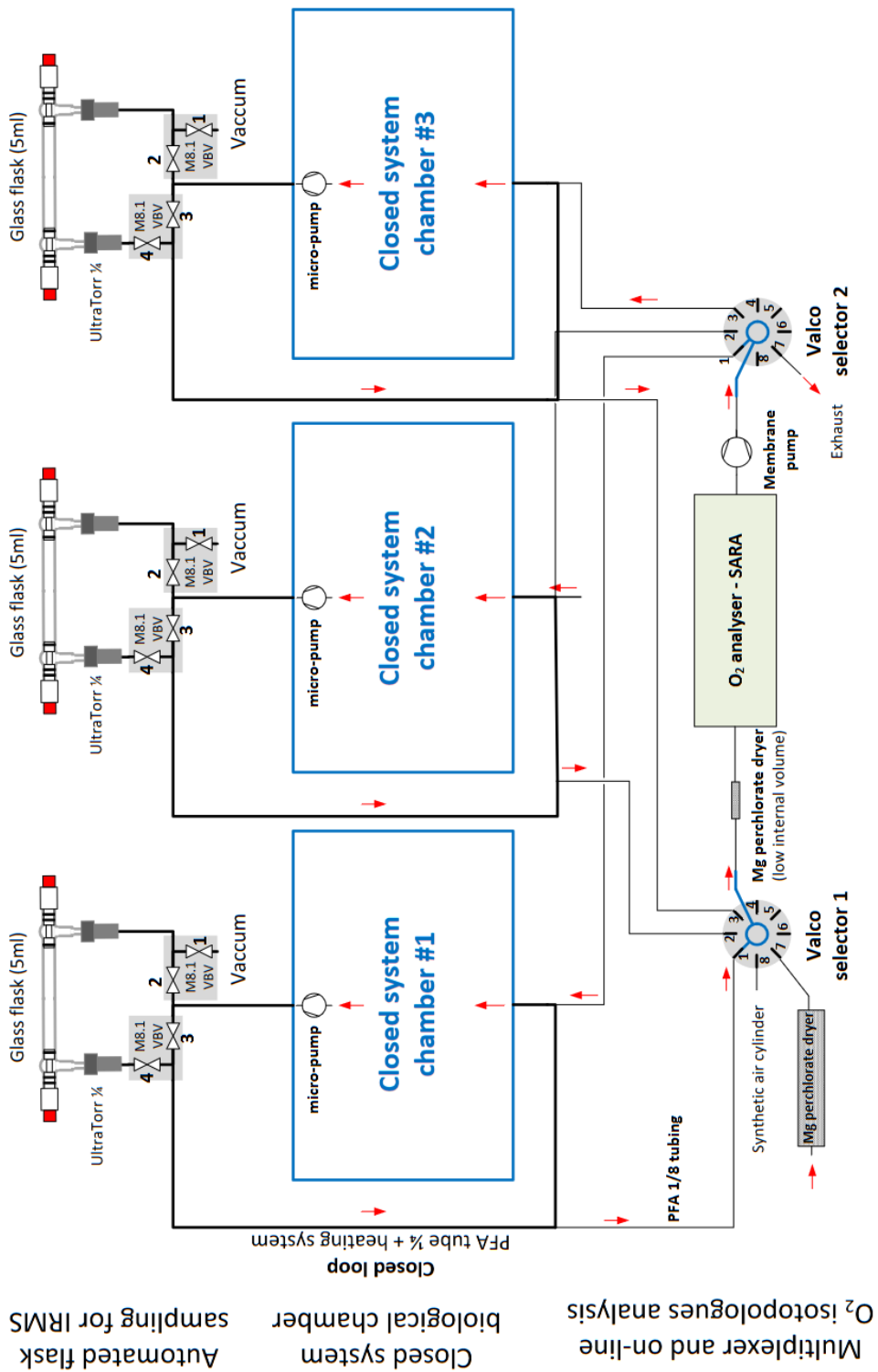


Figure 2. Diagram of the multiplexing system: the enclosed atmosphere of three biological system chambers circulates through automated flask sampling systems using loops employing ¼" PFA tubing and micro-pumps. Subsequently, air from these loops is sub-sampled using 1/8-inch PFA tubes and Valco selectors and analyzed with an isotope analyzer.

Once analyzed, the air stream entered a membrane pump (N811KN.18, KNF, Germany), and subsequently the common port of a second Valco selector (12 positions 1/8 inch, EUTF-SD12MWE, VICI AG International, Switzerland). The air was then either redirected to its chamber of origin (closed circuit) or vented outside of the chamber through an exhaust port for the calibration gases. The multiplexer composed of two Valco valves ensure three functions : (1) "calibration" : dried ambient air or synthetic air is provided to the spectrometer, and the outlet is vented to the atmosphere, (2) "purge": the remaining air still present inside the spectrometer is vented to the atmosphere, until it is fully replaced by the new stream of air (in order to avoid cross contamination of the air between chambers, or contamination of a given chamber with the calibration stream), (3) "measurement": the air sub-sampled from a given chamber is flowing through the spectrometer, and then back to the chamber. A typical sequence is described in Table 1.

*Table 1. Typical measurement sequence with the optical spectrometer. Note that a small amount (around 5 mL) of air sampled from the chamber is wasted (Valco 2 exhausts to atmosphere) during the purging phase.*

| Phase       | Duration (s) | Valco 1<br>(Port selected) | Valco 2<br>(Port selected) | Targeted<br>chamber |
|-------------|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| Calibration | 300          | 7                          | 7                          | -                   |
| Purge       | 20           | 1                          | 7                          | 1                   |
| Measurement | 280          | 1                          | 1                          | 1                   |
| Calibration | 300          | 7                          | 7                          | -                   |
| Purge       | 20           | 2                          | 7                          | 2                   |
| Measurement | 280          | 2                          | 2                          | 2                   |
| Calibration | 300          | 7                          | 7                          | -                   |
| Purge       | 20           | 3                          | 7                          | 3                   |
| Measurement | 280          | 3                          | 3                          | 3                   |

The second loop, used in parallel to the first one described above, is dedicated to the sampling of air for further analysis by IRMS, as already done in Paul et al. (2023) (Fig.2). Air sampled from each chamber was circulating continuously into a closed loop (PFA tubing, 1/4-inch, total length between 5 and 10 m depending on the chamber location relative to the measurement system) using a micropump with a flow rate of approximately 1 L/min (NMS020B, KNF, Germany), through an automated flask sampling system. All tubes were heated using self-regulating heating cable (15 W/m, reference), and the sampling system was located in a temperature regulated enclosure (25 to 30°C). The sampling system was made of two three-way pneumatic valves for each chamber (M8.1 VBV, Rotarex) connected to a glass flask (5mL, as described in Paul et al., 2023) with two Ultra-Torr fittings (SS-4-UT-9, Swagelok, USA) and ensured three functions as described in Table 1: (1) "Purge": the flask is isolated from the closed loop and connected to a vacuum pump (1 to 5 mbar), (2) "Sampling": the air from the loop is flowing through the sampling flask and back to the loop, (3) "Hold": the flask is isolated from the closed loop in order to be manually closed and collected. During a typical sequence, each flask was evacuated ("purge") for 10 minutes, then the "sampling" was activated for at least 30 minutes, and "hold" was triggered at a time selected by the user using a computer-controlled system (Table 2).

Table 2. Sampling sequence with the flask sampling system.

| State    | Valves |        |        |        | Air flow       | Duration (min) |
|----------|--------|--------|--------|--------|----------------|----------------|
|          | 1      | 2      | 3      | 4      |                |                |
| Purge    | Open   | Closed | Open   | Closed | Flask bypassed | 10             |
| Sampling | Closed | Open   | Closed | Open   | Through flask  | 30             |
| Hold     | Closed | Closed | Open   | Closed | Flask bypassed | to be adjusted |

### *2.2.2. Description of control commands*

The control software was developed using open-source Python libraries (PyQt5 for the GUI) and homemade drivers to interact with the various elements (valves, sensors, regulators, etc.) through serial connections. It included a user interface displaying the state of relevant components and the value of the different sensors. The software had three main functions:

- controlling the chamber's CO<sub>2</sub> injection rate: the desired CO<sub>2</sub> rate target can be set and the automatic regulation can be turned on or off using the GUI (Graphical User Interface). The CO<sub>2</sub> trap state and the CO<sub>2</sub> injection flow rate were also displayed. Real-time plots showed the CO<sub>2</sub> in ppm of each chamber, for quick and easy visual control.
- controlling the flow path of the optical spectrometry analyzer, by sending commands to the upstream and downstream valves. A sequencer can be used to define how long and in which order the chambers or calibration gases should be measured by the optical spectrometer.
- controlling the flask sampling. This part controls the pneumatic valves which create the flow path for purging, filling or holding the content the flask. The duration of the purge and the absolute timestamp of the sampling can be set individually for each chamber, for automatic sampling, while manual operation is still possible.

Furthermore, the control software retrieved concentration data from the optical spectrometer via an Ethernet connection and merged it with the flow path data into a unified, time-consistent file for convenient future analysis.

### 2.2.3. Mass spectrometry and optical spectrometry analyses

#### 2.2.3.1. Mass spectrometry analyses technique

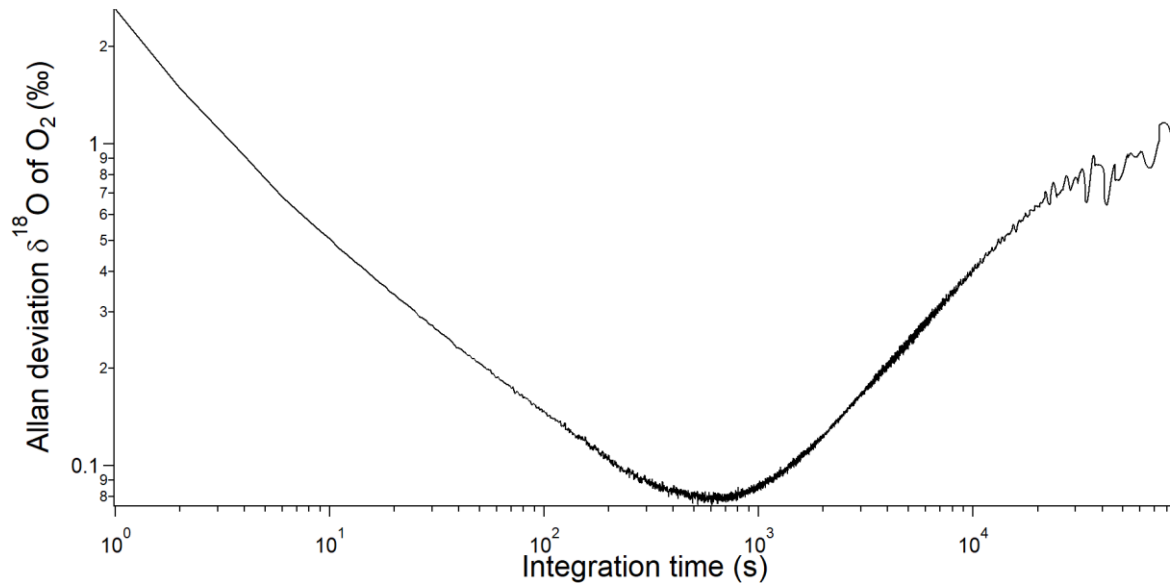
In order to be able to compare the evolutions of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$  measured by the mass spectrometer and the optical spectrometer during light and dark periods, we collected the air in the chamber via the flask sampling system during one - dark period (night 1) and one light period (day 2). We collected 6 flasks for the dark period and 5 flasks for the light period.

The air sampled by the flask system of the second loop was transported to LSCE. The air collected was purified by a semi-automatic separation line (Capron et al., 2010) and analyzed by a Delta V plus dual inlet mass spectrometer (Thermo Electron Corporation). One run consists of 2 series of 16 measurements for each sample and measures the isotopic composition of the air:  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$  (Extier et al., 2018).

#### 2.2.3.2. Optical spectrometry analyses (OF-CEAS technique)

The description of the OF-CEAS laser optical spectrometer is detailed in Piel et al. (*preprint*). The spectrometer measured simultaneously  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  mixing ratio. In our case, because of an experimental problem during the experiment, the instrument was working with a slightly deteriorated precision.

a)



b)

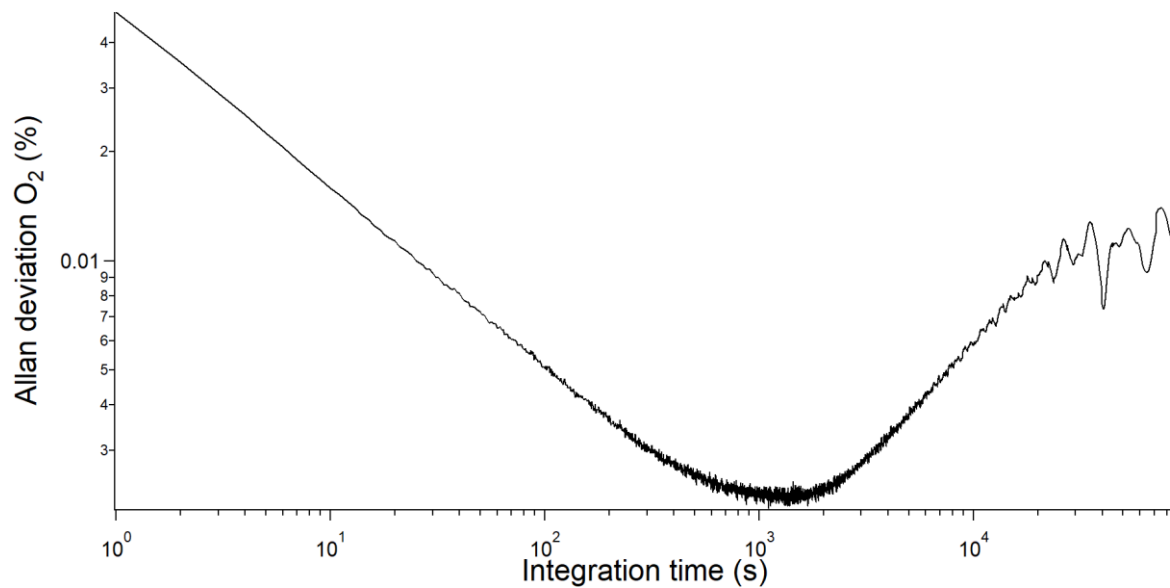


Figure 3. Allan deviation for (a)  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and (b)  $\text{O}_2$  concentration from optical spectrometry during our studies (i.e. deteriorated mode).

In order to estimate the instrument overall precision versus raw measurement integration time, we used Allan deviation which is the square root of Allan variance (Werle, 2011). The minimum of the curve can be interpreted as the best precision the instrument can achieve



and the optimum integration time. In our case (Fig.3), the best precision was 0.08 ‰ and 22 ppm for  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\text{O}_2$  mixing ratio respectively, with an optimum integration time of 10 minutes. Furthermore, the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  level remains consistently below 0.1 ‰ for a duration of 20 minutes. Based on this trend, we can infer that calibrating the instrument every 20 minutes would prevent any drift-related issues.

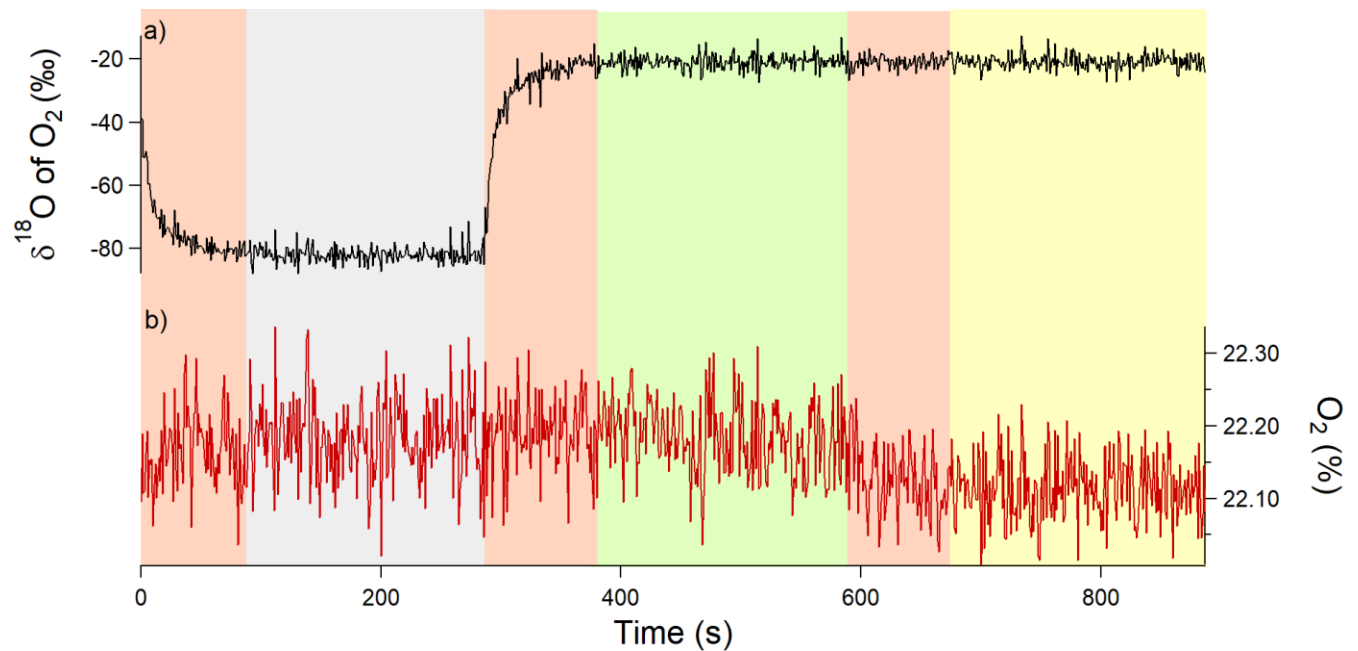


Figure 4. Example of an 18-minute measurement sequence for a closed chamber with two calibrations. Grey rectangle corresponds to calibration 1, i.e. synthetic air (with a  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  value of -60 ‰ measured by IRMS), measured for 6 min. Green rectangle corresponds to calibration 2, i.e. atmospheric air, measured for 6 min. Yellow rectangle corresponds to the air measurement of the closed chamber measured for 6 min. All the pink rectangle represents the memory effect of the analyzer, those measurement points were removed from the processed and analyzed data (i.e. first 2 minutes removed). (a)  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in black and (b)  $\text{O}_2$  concentration in red.

For our sequence of measurements, we choose two calibration gases: the atmospheric air which is the reference gas and a synthetic gas which had an isotopic signature of - 60 ‰ for the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and a concentration of  $\text{O}_2$  of 23 %. The sequence of measurements experiments was then: 6 min of measurement of synthetic air - 6 min of measurement of

atmospheric air - 6 min of measurement of air in the chamber. This sequence was then applied to each of the 3 chambers and a full sequence lasted 18 min (Fig.4).

We had a clear memory effect when switching from one gas to another (Fig.4). As a consequence, we removed the data of the first 2 minutes before averaging the measurements over the last 4 minutes (the instrument provided measurements at a frequency of 3 Hz) to get one averaged value. Finally, there was a dependence of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  on the concentration of  $\text{O}_2$  for the spectrometry analyzer and for this study, the correction for the influence of  $\text{O}_2$  concentration on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  is given by:  $\delta^{18}\text{O}_{\text{corr}} = \delta^{18}\text{O}_{\text{measured}} - (0.3736 \times [\text{O}_2] + 0.0165)$  (details in Piel et al., preprint).

#### 2.2.4. Experimental run

We present here the results of one experiment performed on growing maize (*Zea mays* L.) on a typical compost soil (*Terreau universel*, Botanic, France. Composition: black and blond peat, wood fibre, green compost and vermicompost manure, organic and organo-mineral fertilizers and micronutrient fertilizers) in three closed chambers in parallel. The experiment lasted five days, with alternating dark and light periods as follows: day 1 (6 h light) / night 1 (37 h dark) / day 2 (6 h light) / night 2 (56 h dark) / day 3 (10 h light). The dark periods were imposed to be longer than the light periods because the production rate of oxygen during photosynthesis was much stronger than the consumption rate of oxygen by respiration.

### 2.2.5. Quantification of fractionation factors associated with respiration and photosynthesis process

In order to calculate the fractionation factors associated with dark respiration and photosynthesis of soil and maize, we used the equations 3 and 4 (for details, refer to Paul et al., 2023).

The isotopic discrimination for dark respiration,  $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$ , is given by:

$$^{18}\epsilon_{dark\_respi} = ^{18}\alpha_{dark\_respi} - 1 = \frac{\ln\left(\frac{\delta^{18}O_t + 1}{\delta^{18}O_{t0} + 1}\right)}{\ln\left(\frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}}\right)} \quad (3)$$

Where  $^{18}\alpha_{dark\_respi}$  is the dark respiration fractionation factor,  $t_0$  is the starting time of each dark period and  $t$  is the time of the experiment.

$\frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}}$  is linked to  $\delta\left(\frac{O_2}{N_2}\right)$  as:

$$\frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}} = \frac{\frac{\delta\left(\frac{O_2}{N_2}\right)_t + 1}{1000}}{\frac{\delta\left(\frac{O_2}{N_2}\right)_{t0} + 1}{1000}} \quad (4)$$

Photosynthesis fractionation factor,  $^{18}\alpha_{photosynthesis}$ , is calculated as:

$$^{18}\alpha_{photosynthesis} = \frac{n(O_2)_t / n(O_2)_{t0} \times a^{18}R + ^{18}R_t \times (F_{photosynthesis} - F_{dark\_respi} + ^{18}\alpha_{dark\_respi} \times F_{dark\_respi})}{^{18}R_{lw} \times F_{photosynthesis}} \quad (5)$$

Where  $a^{18}R = \frac{d^{18}R}{dt}$ , during the light period,  $F_{photosynthesis}$  and  $F_{dark\_respi}$  are, respectively, photosynthesis and dark respiration fluxes of oxygen and  $lw$  stands for leaf water.

Note that because maize is a C4 plant, we consider that photorespiration and Mehler reaction were not involved in the O<sub>2</sub> consumption by the plant.

### 3. Results: comparison between mass-spectrometry and optical-spectrometry analysis

Figure 5 presents the evolution of the elemental concentration and isotopic composition of dioxygen in the biological chambers during the experiment described in the previous section. Because of calibration, averaging and switch from one chamber to another every 18 minutes, the optical spectrometry analyzer provides only one  $\delta^{18}O$  of O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentration value every 54 minutes in each chamber.

During dark periods, when there was only soil and plant respiration,  $\delta^{18}O$  of O<sub>2</sub> increased by 1 ‰ and  $\delta O_2/N_2$  decreased by 50 – 60 ‰ (Fig.5). During the light period, when both photosynthesis of plant and respiration in the plant and soil occurred, the  $\delta^{18}O$  of O<sub>2</sub> decreased by 1 ‰ and  $\delta O_2/N_2$  increased by around 50 ‰ at a rate twice as fast as the decrease of respiration rate observed during night periods.

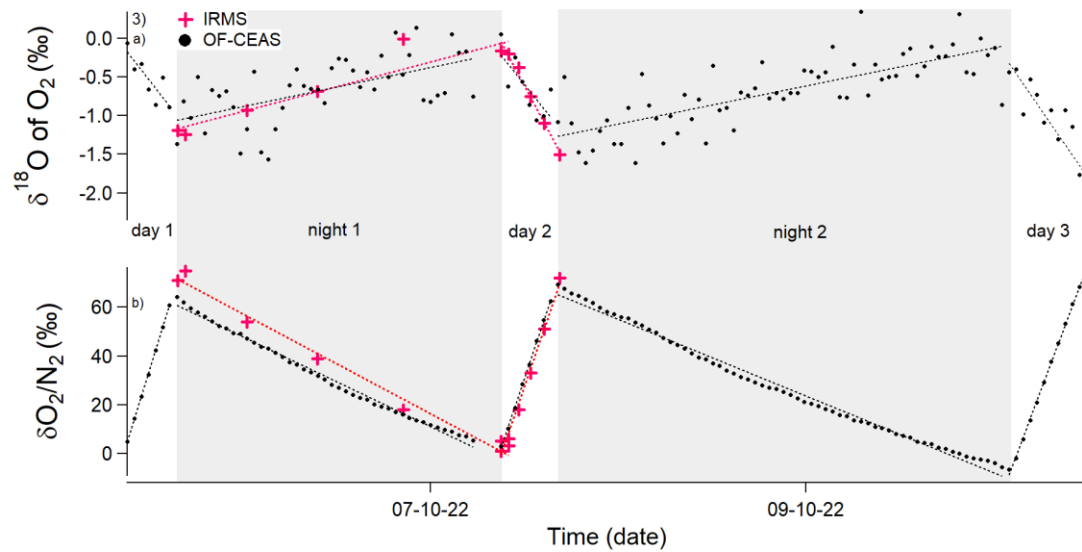
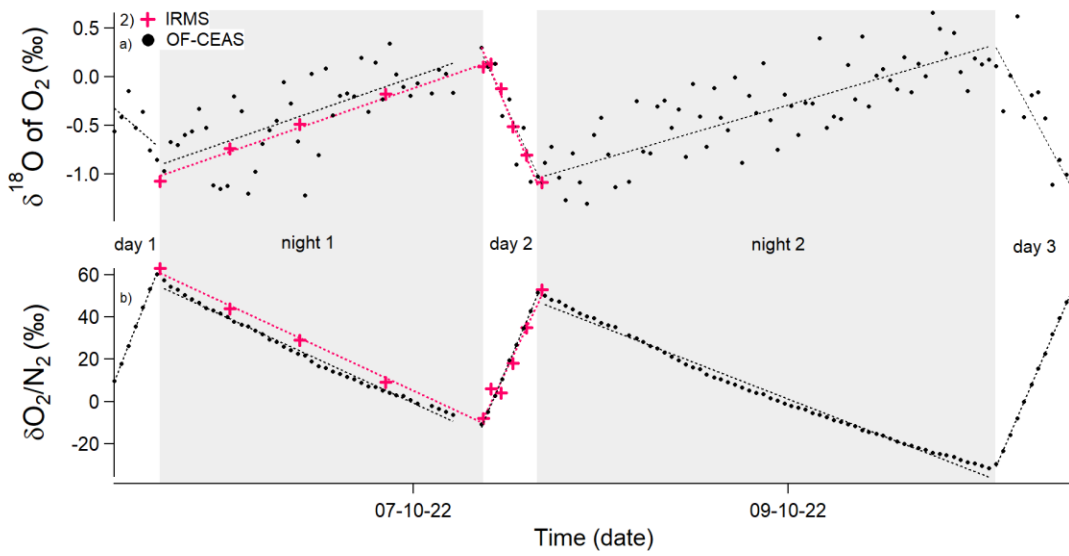
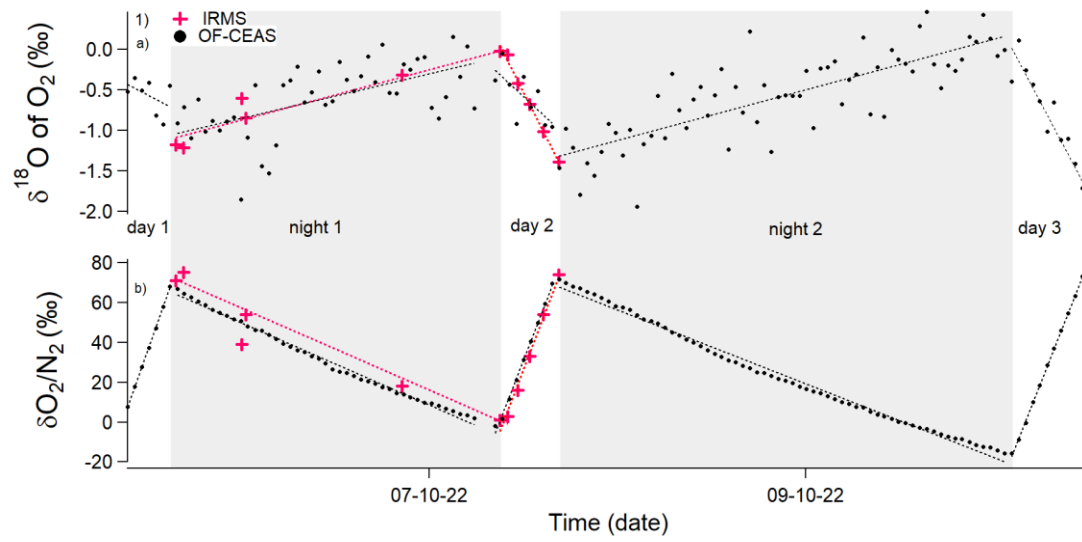


Figure 5. Evolution of the different isotopic ratios of the soil and maize experiment due to dark respiration and photosynthesis (starting 05/10/22 and ending 10/10/22) in closed chambers over 5 days. Grey rectangles correspond to dark periods and white rectangles to light periods. (1) corresponds to chamber 1, (2) chamber 2, (3) chamber 3. (a)  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  variations. (b)  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$  variations. Black points: optical spectrometer's data (OF-CEAS). Red stars: data obtained by IRMS. Red dashed line: linear regression of optical spectrometer data for one period (dark or light). Black dashed line: linear regression of IRMS data for one period (dark or light).

In Figure 5, the optical spectrometer-derived  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  data displayed a higher degree of scattering compared to the data obtained through the use of IRMS. Nonetheless, the regression slopes computed for each period (dark and light period) demonstrate a general comparability, regardless of whether they are derived from the IRMS or optical spectrometer data (see Table 3). This finding holds significant importance as the fractionation factors were determined based on the values of these regression slopes.

Table 3. Average and standard deviation of the isotopic discriminations of maize and the number of data for all the experiment (with data of the three chambers) on which they were calculated

| Isotopic discriminations of maize       | Average (‰) and standard deviation |                  | Number of data |         |
|---|------------------------------------|------------------|----------------|---------|
|   | IRMS                               | OF-CEAS          | IRMS           | OF-CEAS |
| $^{18}\epsilon_{\text{dark\_respi}}$    | $- 17.8 \pm 0.9$                   | $- 16.1 \pm 1.1$ | 18             | 249     |
| $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$ | $3.2 \pm 2.6$                      | $9.6 \pm 5.4$    | 21             | 78      |

The  $R^2$  given by the IRMS was more robust (between 0.64 and 0.99) than for the optical spectrometer (between 0.20 and 0.64) (Table 4).

Table 4. Comparison between IRMS and optical spectrometer linear regression slopes  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  vs  $\delta\text{O}_2/\text{N}_2$ ) and associated  $R^2$  for each period of each chamber.

|                      | Chamber 1 |             | Chamber 2 |             | Chamber 3 |             |
|----------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|                      | IRMS      | OF-<br>CEAS | IRMS      | OF-<br>CEAS | IRMS      | OF-<br>CEAS |
| slope dark period 1  | 0.66      | 0.42        | 0.67      | 0.64        | 0.64      | 0.50        |
| $R^2$ dark period 1  | 0.98      | 0.20        | 0.93      | 0.44        | 0.87      | 0.34        |
| slope light period 2 | -4.55     | -2.00       | -4.18     | -4.59       | -4.50     | -3.04       |
| $R^2$ light period 2 | 0.99      | 0.46        | 0.97      | 0.86        | 0.98      | 0.56        |

From the results displayed on Figure 5 and the regression slopes of Table 3, it was possible to calculate the isotopic discrimination found for dark respiration as  $^{18}\epsilon_{\text{dark\_respi}}$  :  $-17.8 \pm 0.9 \text{ ‰}$  and  $-16.1 \pm 1.1 \text{ ‰}$  for IRMS and optical spectrometer respectively. For photosynthesis, the isotopic discrimination found for  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  is  $+3.2 \pm 2.6 \text{ ‰}$  and  $+9.6 \pm 5.4 \text{ ‰}$  for IRMS and optical spectrometer respectively. The high uncertainty for the determination of  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  was the result of a too small number of measurement points during the light periods and to the large difference observed between IRMS and optical spectrometer measurements for chamber 1. This was largely due to the deteriorated performances of the optical spectrometer which should be improved in future studies.

## 4. Discussion and conclusion

We have presented above a new automated multiplexing system which opens new perspectives for the study of gas exchange between plant and the atmosphere. In particular, the automation system has the following advantages.

- 1- It provides continuous measurements of the isotopic and elemental composition of dioxygen in the biological chamber which frees us from the constraint of manual sampling. Moreover, it provides access to the near-real time evolution of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration during the experiment, in contrast to the delay of the IRMS measurements in classical system. This is particularly important if an adjustment of the environmental conditions is needed in the course of the experiment (e.g. duration of dark and light periods).
- 2- It permits to run replicate experiments in a very convenient way which opens the way to systematic studies over a large range of environmental conditions, plant and soil types.
- 3- Because our development is associated with open code and classical and relatively low costs sensors (except for the optical spectrometer), it is easily adaptable to other biological experiments. Coupled with other optical spectrometers (e.g. commercial Picarro or LGR trace gas instruments optimized for closed systems), this experimental setup could thus be used to quantify the exchange of trace gases such as  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_4$  (and their isotopologues) between the plant/soil system and the atmosphere.



When applied to the determination of the fractionation factor associated with dark respiration and photosynthesis of maize, our results ( $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$  of  $-17 \pm 2$  ‰ and  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$  of  $+6.4 \pm 6$  ‰) are in general agreement with values found in the literature. Guy et al. (1989) found a value equal to  $-17$  to  $-19$  ‰ for respiration for *Phaeodactylum tricornutum* on terrestrial plants. Helman et al. (2005) found a value of  $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$  equal to  $-17.1$  ‰ for bacteria from the Lake Kinneret and for *Synechocystis* a value equal to  $-19.4$  ‰. Also, Paul et al. (2023) calculated a value for *Festuca arundinacea* equal to  $-19.1 \pm 2.4$  ‰. Our value for  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$  for maize is also close to the value determined by Paul et al. (2023) of  $+3.7 \pm 1.3$  ‰ for *Festuca arundinacea* species. In both cases we observe a positive value. Our value hence confirms the existence of an apparent isotopic discrimination for terrestrial photosynthesis.

Still, the very large uncertainty on the isotopic fractionation factors is due to the fact that our optical spectrometer was not working in its optimal state and that too much time was devoted to the calibration. It has been found that the difference in isotopic and elemental compositions of dioxygen for the two calibration gases was stable over the whole duration of the experiment. Therefore, this suggests that it is enough to measure both calibration gases only twice every day to check the stability of the linearity and to measure only one gas of calibration every 15-20 minutes during the day. Future studies should hence make use of an upgraded instrument and less frequent calibrations.

## References

Angert, A., Luz, B., and Yakir, D.: Fractionation of oxygen isotopes by respiration and diffusion in soils and its implications for the isotopic composition of atmospheric O<sub>2</sub>, *Global Biogeochemical Cycles*, 15, 871–880, <https://doi.org/10.1029/2000GB001371>, 2001.

Bender, M., Sowers, T., Dickson, M.-L., Orchardo, J., Grootes, P., Mayewski, P. A., and Meese, D. A.: Climate correlations between Greenland and Antarctica during the past 100,000 years, *Nature*, 372, 663–666, <https://doi.org/10.1038/372663a0>, 1994.

Blunier, T., Barnett, B., Bender, M. L., and Hendricks, M. B.: Biological oxygen productivity during the last 60,000 years from triple oxygen isotope measurements, *Global Biogeochemical Cycles*, 16, <https://doi.org/10.1029/2001GB001460>, 2002.

Brandon, M., Landais, A., Duchamp-Alphonse, S., Favre, V., Schmitz, L., Abrial, H., Prié, F., Extier, T., and Blunier, T.: Exceptionally high biosphere productivity at the beginning of Marine Isotopic Stage 11, *Nat Commun*, 11, 2112, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15739-2>, 2020.

Capron, E., Landais, A., Lemieux-Dudon, B., Schilt, A., Masson-Delmotte, V., Buiron, D., Chappellaz, J., Dahl-Jensen, D., Johnsen, S., Leuenberger, M., Loulergue, L., and Oerter, H.: Synchronising EDML and NorthGRIP ice cores using  $\delta^{18}\text{O}$  of atmospheric oxygen ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ) and CH<sub>4</sub> measurements over MIS5 (80–123 kyr), *Quaternary Science Reviews*, 29, 222–234, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.07.014>, 2010.

Eisenstadt, D., Barkan, E., Luz, B., and Kaplan, A.: Enrichment of oxygen heavy isotopes during photosynthesis in phytoplankton, *Photosynth Res*, 103, 97–103, <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9518-z>, 2010.

Extier, T., Landais, A., Bréant, C., Prié, F., Bazin, L., Dreyfus, G., Roche, D. M., and Leuenberger, M.: On the use of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  for ice core dating, *Quaternary Science Reviews*, 185, 244–257, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.02.008>, 2018.

Guy, R. D., Fogel, M. L., and Berry, J. A.: Photosynthetic Fractionation of the Stable Isotopes of Oxygen and Carbon, *Plant Physiol.*, 101, 37–47, <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.37>, 1993.

Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B., and Kaplan, A.: Fractionation of the Three Stable Oxygen Isotopes by Oxygen-Producing and Oxygen-Consuming Reactions in Photosynthetic Organisms, *Plant Physiology*, 138, 2292–2298, <https://doi.org/10.1104/pp.105.063768>, 2005.

Landais, A., Dreyfus, G., Capron, E., Masson-Delmotte, V., Sanchez-Goñi, M. F., Desprat, S., Hoffmann, G., Jouzel, J., Leuenberger, M., and Johnsen, S.: What drives the millennial and orbital variations of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ?, *Quaternary Science Reviews*, 29, 235–246, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.07.005>, 2010.

Luz, B. and Barkan, E.: Assessment of Oceanic Productivity with the Triple-Isotope Composition of Dissolved Oxygen, *Science*, 288, 2028–2031, <https://doi.org/10.1126/science.288.5473.2028>, 2000.

Luz, B., Barkan, E., Bender, M. L., Thiemens, M. H., and Boering, K. A.: Triple-isotope composition of atmospheric oxygen as a tracer of biosphere productivity, *Nature*, 400, 547–550, <https://doi.org/10.1038/22987>, 1999.

Malaizé, B., Paillard, D., Jouzel, J., and Raynaud, D.: The Dole effect over the last two glacial-interglacial cycles, *J. Geophys. Res.*, 104, 14199–14208, <https://doi.org/10.1029/1999JD900116>, 1999.

Milcu, A., Allan, E., Roscher, C., Jenkins, T., Meyer, S. T., Flynn, D., Bessler, H., Buscot, F., Engels, C., Gubsch, M., König, S., Lipowsky, A., Loranger, J., Renker, C., Scherber, C., Schmid, B., Thébault, E., Wubet, T., Weisser, W. W., Scheu, S., and Eisenhauer, N.: Functionally and

phylogenetically diverse plant communities key to soil biota, *Ecology*, 94, 1878–1885, <https://doi.org/10.1890/12-1936.1>, 2013.

Paul, C., Piel, C., Sauze, J., Pasquier, N., Prié, F., Devidal, S., Jacob, R., Dapoigny, A., Jossoud, O., Milcu, A., and Landais, A.: Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation–soil–atmosphere analogue of the terrestrial biosphere in closed chambers, *Biogeosciences*, 20, 1047–1062, <https://doi.org/10.5194/bg-20-1047-2023>, 2023.

Severinghaus, J. P., Beaudette, R., Headly, M. A., Taylor, K., and Brook, E. J.: Oxygen-18 of O<sub>2</sub> Records the Impact of Abrupt Climate Change on the Terrestrial Biosphere, *Science*, 324, 1431–1434, <https://doi.org/10.1126/science.1169473>, 2009.

Stolper, D. A., Bender, M. L., Dreyfus, G. B., Yan, Y., and Higgins, J. A.: A Pleistocene ice core record of atmospheric O<sub>2</sub> concentrations, *Science*, 353, 1427–1430, <https://doi.org/10.1126/science.aaf5445>, 2016.

Stolper, D. A., Fischer, W. W., and Bender, M. L.: Effects of temperature and carbon source on the isotopic fractionations associated with O<sub>2</sub> respiration for <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O ratios in *E. coli*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 240, 152–172, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.07.039>, 2018.

Werle, P.: Accuracy and precision of laser spectrometers for trace gas sensing in the presence of optical fringes and atmospheric turbulence, *Appl. Phys. B*, 102, 313–329, <https://doi.org/10.1007/s00340-010-4165-9>, 2011.

Yang, J.-W., Brandon, M., Landais, A., Duchamp-Alphonse, S., Blunier, T., Prié, F., and Extier, T.: Global biosphere primary productivity changes during the past eight glacial cycles, *Science*, 375, 1145–1151, <https://doi.org/10.1126/science.abj8826>, 2022.

## Author contributions

AL and CPi designed the project. CPi, JS, SD and CPa carried out experiments at ECOTRON of Montpellier and CPa, FP, RJ, AD and OJ at LSCE. CPa, CPi and AL analyzed the data from the optical spectrometer and CPa and AL analysed the data from IRMS. CPa, CPi and AL prepared the manuscript with contributions from AM.

## Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Union H2020 Programme (H2020/20192024)/ERC grant agreement no. 817493 (ERC ICORDA) and ANR HUM117. The authors acknowledge the scientific and technical support of PANOPLY (Plateforme ANalytique géOsciences Paris-saclay), Paris-Saclay University, France. Our thanks also to go to AQUA-OXY (CNRS project). This study benefited from the CNRS resources allocated to the French ECOTRONS Research Infrastructure, from the Occitanie Region and FEDER investments as well as from the state allocation 'Investissement d'Avenir' AnaEE- France ANR-11-INBS-0001. We would also like to thank Abdelaziz Faez and Olivier Ravel from ECOTRON of Montpellier for their help and Emeritus Prof. Phil Ineson from University of York.

## 2.2. Analyses et préparations des échantillons d'air et d'eau

Lorsque les ampoules d'air sont récupérées des chambres biologiques de l'ECOTRON de Montpellier, elles ont été ensuite envoyées au LSCE afin d'analyser la composition isotopique en dioxygène par spectrométrie de masse (considérée comme méthode de référence). Ces échantillons sont d'abord purifiés grâce à la ligne de purification du LSCE afin qu'il ne reste plus que l'O<sub>2</sub>, l'argon et parfois l'azote. Ainsi, le CO<sub>2</sub> et l'eau sont éliminés au maximum des échantillons (description section 2.2.1).

En outre, à l'ECOTRON de Montpellier, des échantillons de feuilles sont récupérés au début et à la fin des expériences afin de pouvoir mesurer la composition isotopique de l'oxygène de l'eau grâce à une ligne d'extraction de l'eau foliaire au LSCE (description section 2.2.2). Il est important d'avoir la mesure de la composition isotopique de l'oxygène de l'eau des feuilles puisque la photosynthèse utilise cette eau et ainsi produit de l'O<sub>2</sub>. De plus, la mesure de la composition isotopique au début et à la fin de l'expérience a permis d'estimer la variation de sa valeur au cours du temps.

En outre, l'eau d'irrigation dans les chambres est récupérée lors des expériences à l'ECOTRON de Montpellier en début et fin des manipulations (dans des flacons de 15 cm<sup>2</sup>) afin de mesurer aussi par la suite la composition isotopique de l'oxygène de l'eau et quantifier son évolution pendant l'expérience. Pour la préparation de cette eau d'irrigation, avant analyse, il est nécessaire de la filtrer (22 µm) pour enlever les particules présentes (terreau etc.) et de transvaser cette eau dans des petits flacons étanches (2 cm<sup>3</sup>) ensuite congelés pour qu'il n'y ait pas de contamination en attente de l'analyse.

### 2.2.1. Lignes de purification

Lors de cette thèse, j'ai pu utiliser deux lignes de purification dont le principe est le même mais qui se différencient par ce qui est étudié : s'il était question de vouloir analyser dans les isotopes de l'oxygène, l'oxygène 17, j'utilisais la ligne dénommée

« oxygène 17 » et sinon la ligne dénommée « O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> » qui permet une préparation plus rapide afin de mesurer seulement le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'O<sub>2</sub>.

La ligne oxygène 17 a été utilisée principalement pour les expériences associées à une chambre biologique de la première année de thèse car les expériences ont duré plus longtemps (chapitre 3), environ 2 mois, ce qui a permis d'étudier l'évolution du  $\Delta^{17}\text{O}$  de l'O<sub>2</sub>, un signal très faible qui ne peut être bien détecté que sur des expériences longues et avec une fréquence d'échantillonnages bien supérieure.

La ligne de purification O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, plus simple, a été utilisée lorsque les expériences en chambres biologiques multiplexées ont commencé, car nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'effet Dole et nous voulions valider l'approche avec l'instrument optique laser SARA-O<sub>2</sub> (description dans la section 2.2.3.2 de l'article *A multiplexing system for quantifying oxygen fractionation factors in closed chambers*) qui lui ne mesure pas le  $\Delta^{17}\text{O}$  de O<sub>2</sub> car il n'est pas assez précis pour l'oxygène 17.

En outre, j'ai utilisé la ligne oxygène 17 en 3<sup>ème</sup> année de thèse, puisque la pénurie mondiale d'hélium a obligé le développement d'une nouvelle technique pour piéger l'air en fin de ligne de purification. Ce développement avait déjà été entrepris par Frédéric Prié avant la « pénurie » pour la ligne de préparation pour la mesure de  $\Delta^{17}\text{O}$  de O<sub>2</sub> et a pu être finalisé rapidement pendant ma thèse. J'ai donc utilisé uniquement cette ligne à partir de la pénurie d'hélium liquide (Octobre 2022).

#### 2.2.1.1. Ligne de purification de l'air pour l'analyse du $\Delta^{17}\text{O}$ de O<sub>2</sub>

Les prélèvements d'air dans la chambre de culture sont réalisés à partir d'ampoules (5 mL) qui isolent l'échantillon de l'air extérieur. Les ampoules sont par la suite disposées sur une ligne de purification afin de séparer le O<sub>2</sub> de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>, ce qui permet d'obtenir une bonne précision sur le  $\delta^{17}\text{O}$  et  $\delta^{18}\text{O}$  de l'air atmosphérique ainsi que pour le  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  (permettant de calculer le rapport de mélange d'oxygène).

La ligne de purification est préalablement pompée pour qu'aucun résidu issu d'expériences précédentes ne vienne contaminer l'échantillon. Ensuite, un programme informatique écrit en python permet d'automatiser le transfert de l'échantillon, présent dans l'ampoule, via des pièges et une colonne chromatographique pour faire les séparations. Après le passage par ces étapes, l'air est transféré vers un porte-échantillons multiport en acier inoxydable (également appelé rosette). Le transfert se fait par une succession d'ouverture et de fermeture des vannes qui sont disposées le long de la ligne. La rosette est refroidie dans un réservoir d'hélium liquide à  $-269^{\circ}\text{C}$  ou dans l'azote liquide tout au long de l'expérience (Fig.2.3 et 2.4).

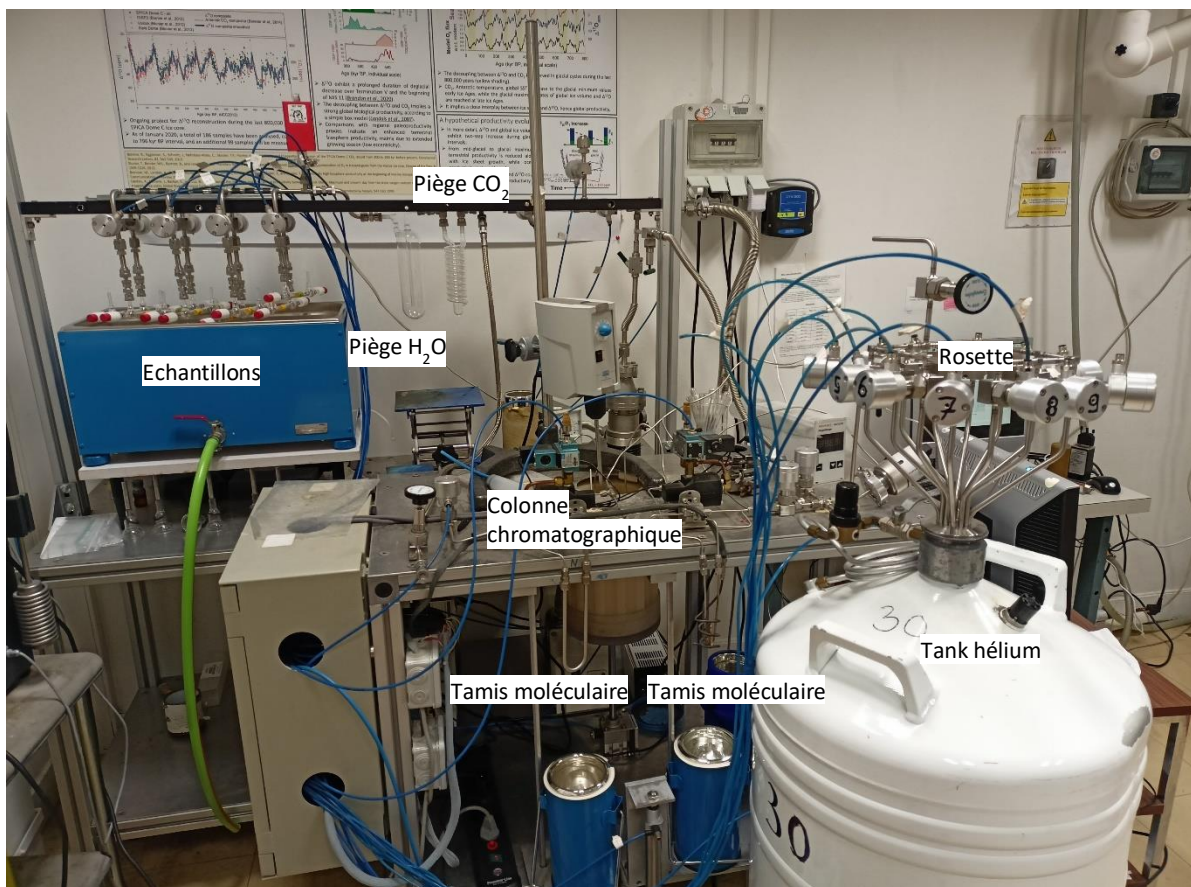


Figure 2.3 : Lignes de purification de l'air pour l'analyse du  $\Delta^{17}\text{O}$  de  $\text{O}_2$ .



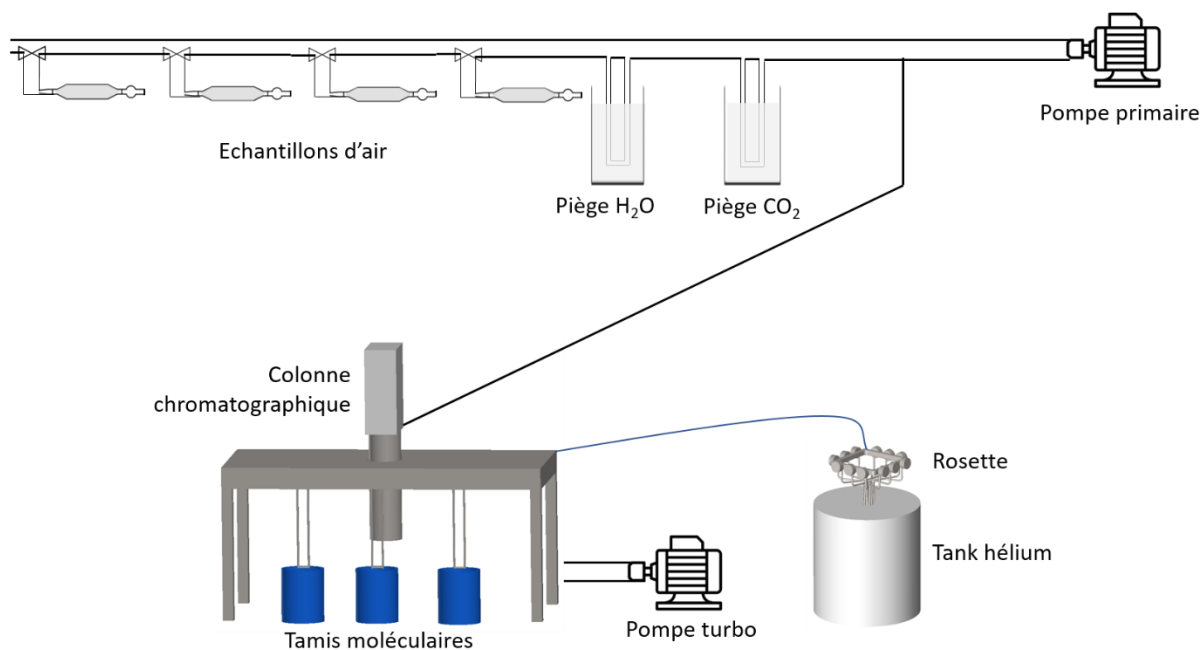


Figure 2.4 : Schéma simplifié des lignes de purification de l'air pour l'analyse du  $\Delta^{17}\text{O}$  de  $\text{O}_2$ .

Voici le protocole détaillé de la purification de l'air : deux ampoules d'air extérieur, l'air extérieur étant le standard, sont déposées sur la ligne ainsi que six échantillons récupérés de l'ECOTRON. L'air des ampoules passe d'abord dans des pièges à  $\text{H}_2\text{O}$  ( $-90^\circ\text{C}$ ) et à  $\text{CO}_2$  immergés dans de l'éthanol refroidi à  $-90^\circ\text{C}$  et dans de l'azote liquide ( $-196^\circ\text{C}$ ), respectivement (Fig.2.3 et 2.4). L'échantillon de gaz est transféré dans une colonne remplie de tamis moléculaire à  $-196^\circ\text{C}$ , puis dans une colonne chromatographique ( $1\text{ m} \times 2\text{ mm}$ ) dont le gaz porteur est l'hélium afin de séparer l' $\text{O}_2$  et l'Ar du  $\text{N}_2$ . Finalement, le gaz passe par une autre colonne remplie de tamis moléculaire ( $5\text{ \AA}$ ) afin de purifier l' $\text{O}_2$  et l'Ar de l'He restant. L'air extrait est ensuite piégé dans des tubes en acier inoxydable dans un collecteur à 8 ports immergés dans de l'hélium liquide ( $4,13\text{ K}$ ). Cette immersion a été remplacée par un piégeage à l'azote liquide à partir d'Octobre 2022 pour cause de pénurie mondiale et le multiport a dû être retravaillé avec du tamis moléculaire à l'intérieur afin de permettre le piégeage. La méthode suit la description de Barkan et Luz (2003). Une différence est à noter tout de même : la colonne chromatographique est plus longue ( $1\text{ m}$  au lieu de  $20\text{ cm}$ ) et est

maintenue à une température plus élevée (0°C au lieu de -90°C). Le transfert total d'un échantillon depuis l'ampoule jusqu'à la canne du multiport dure 40 min environ.

Quand le transfert est terminé, la rosette est retirée du réservoir d'hélium et est ensuite réchauffée avec un pistolet thermique. Ensuite, la ligne est remise à pomper jusqu'à la prochaine utilisation.

#### *2.2.1.2. Ligne de purification pour l'étude du $\delta^{18}O_{atm}$ et du $\delta O_2/N_2$*

Cette ligne de purification se différencie de la ligne « oxygène 17 », puisque les seuls pièges présents sont celui de l'eau et du CO<sub>2</sub> et l'air ne passe pas par des tamis moléculaires, ni par la colonne chromatographique (Fig.2.3 et 2.4). L'étude de l'oxygène 17 ne peut pas se faire avec cette rosette. Le transfert d'un échantillon prend environ 6 min jusqu'à la rosette.

#### *2.2.1.3. Développement et description d'une nouvelle rosette multiports pour la ligne « oxygène 17 »*

En raison de la pénurie globale d'hélium et afin de pouvoir continuer les analyses d'air, Frédérique Prié a développé, d'après Abe et al. (2008), une nouvelle rosette avec refroidissement par azote liquide et non avec l'hélium comme auparavant (Fig.2.5). Après sa réalisation, j'ai testé les performances de cette rosette avant de l'utiliser en routine.



Figure 2.5 : Nouvelle rosette développée pour la ligne « oxygène 17 ».

Cette rosette est branchée sur la ligne de purification « oxygène 17 » à la place de la rosette initialement utilisée dans l'hélium liquide. La rosette est déposée dans un tank d'azote liquide à environ  $-196^{\circ}\text{C}$ . Dans chaque tube de la rosette, il y a trois billes de silice pour le tamis moléculaire ( $5 \text{ \AA}$ , 3 - 4 mm). Lorsque la séquence de transfert du mélange  $\text{O}_2 + \text{Ar}$  est terminée, la rosette est déposée dans une bouilloire à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min.

Voici les résultats de deux tests qui ont été faits pour chaque canne de la rosette, soit pour 8 ports. Le test consistait à remplir chaque ampoule d'air extérieur (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Comparaison entre deux rosettes avec des airs extérieurs. Test 1 avec l'ancienne rosette avec l'hélium et test 2 avec la nouvelle rosette avec l'azote. Les numéros correspondent à chaque numéro de canne de rosette. La moyenne et l'écart-type (en gras) sont calculés sur tous les ports de la rosette.

| Date           | Échantillon    | $\delta^{18}\text{O}$ de $\text{O}_2$<br>(‰) | $\delta^{17}\text{O}$ de $\text{O}_2$<br>(‰) | $\Delta^{17}\text{O}$ de $\text{O}_2$<br>(ppm) | $\delta_{\text{O}_2/\text{Ar}}$<br>(‰) |
|----------------|----------------|--|--|--|--|
| Test<br>Hélium | avec Air ext 1 | 12.870                                       | 6.644  | 23.316   | 52                                     |
|                | Air ext 2      | 12.874                                       | 6.649  | 26.568   | 53                                     |
|                | Air ext 3      | 12.792                                       | 6.623  | 42.685   | 53                                     |
|                | Air ext 4      | 12.747                                       | 6.587  | 29.517   | 53                                     |
|                | Air ext 5      | 12.565                                       | 6.503  | 38.640   | 52                                     |
|                | Air ext 6      | 12.483                                       | 6.457  | 34.385   | 52                                     |
|                | Air ext 7      | 12.454                                       | 6.445  | 37.242   | 50                                     |

|                 |                   |                   |               |               |               |            |
|-----------------|-------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|------------|
|                 | Air ext 8         | 12.483            | 6.451         | 29.179        | 52            |            |
|                 | <b>Moyenne</b>    | <b>12.658</b>     | <b>6.545</b>  | <b>32.691</b> | <b>52</b>     |            |
|                 | <b>Ecart-type</b> | <b>0.162</b>      | <b>0.081</b>  | <b>5.546</b>  | <b>0.6</b>    |            |
| Test avec Azote | Air ext 1         | 13.129            | 6.764         | 10.910        | 69            |            |
|                 | Air ext 2         | 12.990            | 6.696         | 14.164        | 68            |            |
|                 | Air ext 3         | 13.011            | 6.709         | 16.389        | 68            |            |
|                 | Air ext 4         | 13.034            | 6.721         | 16.424        | 69            |            |
|                 | Air ext 5         | 13.006            | 6.691         | 1.056         | 71            |            |
|                 | Air ext 6         | 12.968            | 6.672         | 1.539         | 69            |            |
|                 | Air ext 7         | 12.984            | 6.698         | 18.876        | 69            |            |
|                 | Air ext 8         | 12.957            | 6.675         | 9.952         | 69            |            |
|                 |                   | <b>Moyenne</b>    | <b>13.001</b> | <b>6.703</b>  | <b>11.164</b> | <b>69</b>  |
|                 |                   | <b>Ecart-type</b> | <b>0.036</b>  | <b>0.021</b>  | <b>5.299</b>  | <b>0.5</b> |

Nous pouvons remarquer que la dispersion des points de mesures pour le  $\delta^{18}\text{O}$  de  $\text{O}_2$ , le  $\delta^{17}\text{O}$  de  $\text{O}_2$ , le  $\Delta^{17}\text{O}$  de  $\text{O}_2$  et  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  avec la rosette avec azote ont des dispersions meilleures qu'avec l'hélium (écart-type du Tableau 2.2 : pour le  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$ , 0.6 et 0.5 respectivement). En outre, nous pouvons voir que les résultats sont très homogènes pour le  $\delta^{18}\text{O}$  de  $\text{O}_2$  et pour le  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  sur les différentes cannes de la rosette avec azote.

### 2.2.2. Ligne d'extraction de l'eau des feuilles

D'après les travaux de Flanagan et al. (1991), nous savons désormais que la composition isotopique de l'eau des feuilles est significativement différente de celle de l'eau d'irrigation. C'est au niveau des feuilles que le phénomène d'évapotranspiration a lieu. L'évapotranspiration entraîne un fractionnement de diffusion, un fractionnement à l'équilibre et l'évapotranspiration dépend des variations de l'humidité du milieu (comme expliqué dans le chapitre 1 section 1.2.2.1).

L'enjeu de cette manipulation est d'extraire toute l'eau foliaire, sans fractionner, et sans extraire en même temps des composés organiques (interférents potentiels pour la mesure).

Voici le protocole d'extraction de l'eau des feuilles (Fig.2.6) :

1. Les feuilles sont placées dans des flacons ( $30 \text{ cm}^3$ ) qui ne permettent aucun échange avec l'extérieur. L'extraction de l'eau des feuilles se fait grâce à une ligne de distillation.
2. La ligne est mise sous vide avant toute manipulation à l'aide d'une pompe primaire. Lors de cette étape, les feuilles sont congelées (les flacons sont placés dans un Dewar rempli d'azote liquide) pour ne pas affecter la composition isotopique de l'eau qui est à l'intérieur.
3. Lorsque le pompage est arrêté, l'azote liquide est remplacé dans le Dewar par une bouilloire. Ainsi, les échantillons avec les feuilles sont chauffés entre 75 et 80°C. Puisque le système est sous-vide, la chaleur provoque la transformation de l'eau des feuilles en vapeur d'eau.
4. D'autres flacons ( $30 \text{ cm}^3$ ) disposés sur la ligne et pompés depuis le début de la manipulation (donc sont sous-vide) sont placés au-dessus d'un Dewar rempli d'azote liquide à -90°C. Ainsi, avec le froid, les molécules d'eau évaporées des flacons remplis de feuilles sont transférées vers ces flacons sous-vide et la vapeur d'eau est condensée.
5. L'extraction dure 6 heures, ce qui permet d'assurer que l'eau des feuilles a été récupérée dans son intégralité.
6. L'eau liquide récupérée est ensuite transférée dans des petits flacons en plastique de 2 mL, où un charbon actif est ajouté afin d'éliminer de l'eau extraite les composés volatils produits par les plantes.
7. Ces nouveaux flacons sont agités pendant 12 heures.

8. Avant analyse, si elle n'est pas faite directement après, les flacons sont conservés au congélateur à environ  $-20^{\circ}\text{C}$ .



*Figure 2.6 : Photographie de la ligne d'extraction de l'eau des feuilles.*

### 2.2.3. Fluorination : transformation de l'eau en $\text{O}_2$ pour l'analyse de la composition isotopique triple de l'oxygène dans l'eau

Lorsque les échantillons d'eau sont préparés, c'est-à-dire, ceux avec l'eau des feuilles (section 2.2.2) et l'eau d'irrigation des chambres biologiques, récupérés à l'ECOTRON, ces eaux sont transformées en  $\text{O}_2$  grâce à la technique par fluorination élaborée par Barkan et Luz (2005).

Avant toutes les manipulations, les échantillons d'eau sont conservés à l'état solide par - 20°C dans des congélateurs afin d'éviter l'évaporation et le fractionnement des molécules d'eau.

Voici le protocole et le principe de la fluorination (Fig.2.7) :

1. Les flacons en plastique de 2 mL sont dégelés et déposés dans la ligne de fluorination.
2. Deux microlitres d'eau sont injectés, sous un flux continu d'hélium (20 ml/min), dans un tube en nickel chauffé (370°C), rempli de  $\text{CoF}_3$  où la molécule d'eau est cassée afin de former du dioxygène et de l'acide fluorhydrique (HF) selon la réaction suivante :



3. L'HF est piégé avec de l'azote liquide à la sortie du tube de nickel.
4. Pendant 20 minutes, l'oxygène produit est ensuite collecté dans une colonne remplie de tamis moléculaire (5 Å) à -196 °C.
5. Ensuite, la colonne de tamis moléculaire est chauffée pendant 1 minute et l' $\text{O}_2$  gazeux est libéré puis piégé pendant 5 minutes dans un collecteur en acier inoxydable (la rosette multiport) qui est immergé dans de l'hélium liquide, (comme expliqué précédemment (section 2.2.1) ce système a aussi été adapté pour fonctionner avec de l'azote liquide).
6. Une fois les transferts terminés, le reste d'eau qui n'a pas été injecté est mis au congélateur. La rosette, avec les échantillons transformés, est connectée à l'IRMS pour analyses.

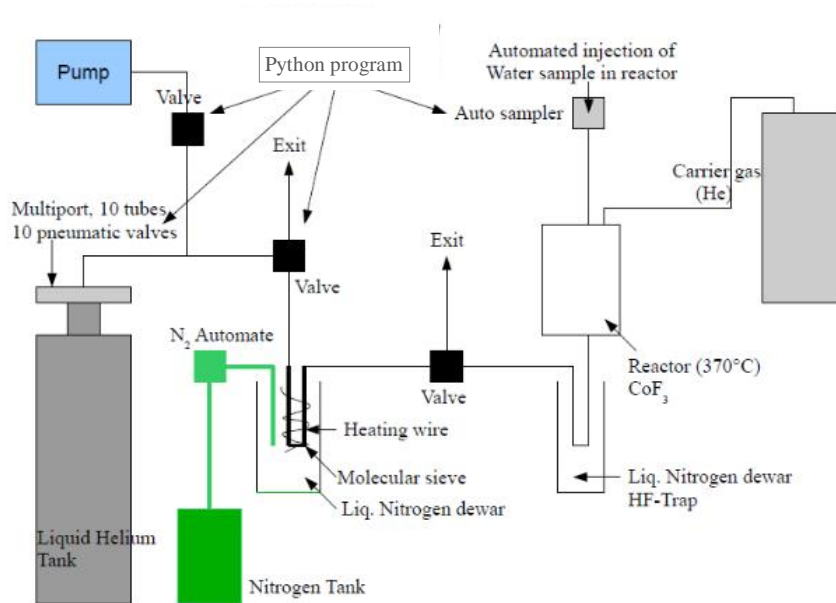


Figure 2.7 : Schéma de la ligne de fluorination (d'après Renato Winkler, 2012).

## 2.3. Instruments de mesures

### 2.3.1. Spectromètres de masse

Les rapports des différents isotopes de l'oxygène dans les échantillons d'O<sub>2</sub> récupérés après purification ou fluorination sont analysés par spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui permet de déterminer la composition en éléments chimiques d'un échantillon. Le principe de base de cette méthode est la distinction des éléments chimiques par leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Les molécules de l'échantillon à analyser sont ionisées (ions positifs produits, cations) puis accélérées par un champ électrique. Puis, ce faisceau d'ions traverse un aimant qui permet de modifier la trajectoire de ces ions selon leur rapport  $m/z$ . Les ions sont par la suite réceptionnés dans plusieurs détecteurs de type cage de Faraday (collecteurs). Chaque ion a une position spécifique à un rapport  $m/z$ . L'intensité du signal reçu par un détecteur indique la quantité d'un constituant dans l'échantillon, et



les rapports d'intensité entre plusieurs détecteurs permettent de calculer les rapports isotopiques.

Deux spectromètres de masses ont été utilisés au cours de cette thèse, le MAT253 (Thermo®) afin d'analyser le  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  et le  $\Delta^{17}\text{O}$  de  $\text{O}_2$  et le ratio  $\text{O}_2/\text{Ar}$ . Et le Delta V (Thermo®) afin d'analyser le  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  et le ratio  $\text{O}_2/\text{N}_2$ . Ces deux spectromètres de masse ont été utilisés en fonction de la ligne de préparation utilisée (section 2.2.1).

### 2.3.1.1. MAT253

Les mesures de  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$  et  $^{32}\text{O}_2/^{40}\text{Ar}$  ( $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$ ) ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre de masse multicollecteur Thermo Scientific MAT253 fonctionnant en mode double entrée (*dual inlet*). Pour chaque échantillon d'air extrait, 3 séries de 24 mesures à double entrée ont été effectuées pour le  $\delta^{18}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$  par rapport à un gaz étalon de laboratoire obtenu en mélangeant de l' $\text{O}_2$  et de l'Ar commercial en concentration atmosphérique. La moyenne des trois séries a été calculée pour chaque échantillon et l'écart moyen standard est donné sur l'incertitude de la mesure elle-même. Les écarts-types regroupés qui en résultent avant les corrections sont de 0,05 ‰, 0,02 ‰, 6,4 ‰ et 6 ppm pour les mesures  $\delta^{18}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$ ,  $\delta^{17}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$ ,  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  et le calcul de  $\Delta^{17}\text{O}$  de  $\text{O}_2$ , respectivement. Une 4<sup>ème</sup> série de mesures est faite pour le  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  en mode suivi de masse (*peak jumping*) car la géométrie du collecteur du MAT253 ne permet pas de faire la même mesure que pour le  $\delta^{18}\text{O}$  et le  $\delta^{17}\text{O}$ . Une alternance de la mesure entre 1) la concentration en argon de l'échantillon et du standard et 2) la concentration en  $\text{O}_2$  de l'échantillon et du standard sont faits deux fois. La précision sur le  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  est de 0.9 ‰.

Les mesures sont calibrées par rapport à l'air atmosphérique. Les mesures d'air extérieur sont faites sur deux échantillons en début de chaque manipulation quotidienne. Ces mesures servent de standard pour les échantillons de gaz. Le premier

échantillon d'air mesuré est toujours écarté en raison des effets d'adsorption sur le piège à eau dans la ligne de purification.

Finalement, les valeurs de nos échantillons sont données avec la formule suivante :

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{ext air corr}} = \left[ \frac{(\delta^{18}\text{O}_{\text{échantillon}}/1000) + 1}{(\delta^{18}\text{O}_{\text{ext air corr}}/1000) + 1} - 1 \right] \times 1000 \quad (2.2)$$

$$\delta^{17}\text{O}_{\text{ext air corr}} = \left[ \frac{(\delta^{17}\text{O}_{\text{échantillon}}/1000) + 1}{(\delta^{17}\text{O}_{\text{ext air corr}}/1000) + 1} - 1 \right] \times 1000 \quad (2.3)$$

### 2.3.1.2. Delta V

Le spectromètre de masse ThermoFisher Delta V est aussi utilisé avec un module de double entrée. Chaque mesure comprend deux cycles. Le gaz étalon utilisé est de l'air sec sans CO<sub>2</sub>. Au cours de chaque cycle, le rapport entre l'échantillon et l'étalon de travail est déterminé 16 fois.

### 2.3.2. Spectromètre optique (technique OF-CEAS)

La technique OF-CEAS (*Optical Feedback Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy*) utilisée dans le spectromètre optique SARA-O<sub>2</sub>, dont le principe de fonctionnement a été breveté par Daniele Romanini (*Introduction to Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy (OF-CEAS)*, Romanini, 2014) du LiPhy (Fig.2.8). Les instruments de type « SARA » sont actuellement commercialisés par l'entreprise AP2E à Aix-en-Provence et le SARA-O<sub>2</sub> repose sur un environnement électronique et une cavité optique de cette

entreprise modifiés et optimisés par Daniele Romanini spécifiquement pour la mesure des isotopes de l'oxygène. Le principe général de l'instrument est expliqué dans cette section.

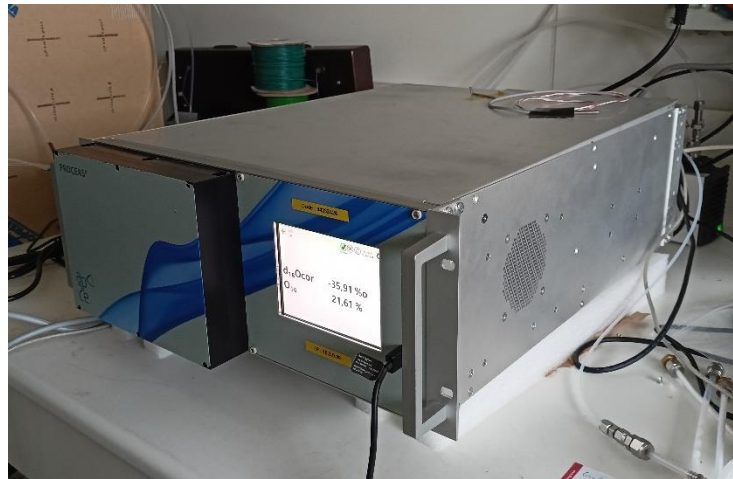


Figure 2.8 : Photographie du SARA-O<sub>2</sub>.

Le SARA-O<sub>2</sub> a été utilisé lors des expériences en multiplexage. Il permet l'étude de la composition isotopique et élémentaire en oxygène avec de faibles incertitudes, en particulier sur le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'O<sub>2</sub> ( $1 \sigma < 0.05 \text{ ‰}$  pour le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'O<sub>2</sub> sur 10 minutes et  $1 \sigma < 0.02 \%$  pour la concentration de O<sub>2</sub> sur 10 minutes). L'ensemble des caractéristiques de l'instrument est détaillé dans l'article Piel et al. (*preprint*) en annexe dans lequel je suis co-auteur. Il est intégré dans le circuit fermé avec les chambres en simultanée (le détail de cette intégration est donné dans l'article Paul et al. (in prep) dans la section 2.1.2). L'air de chaque chambre est analysé à tour de rôle (toutes les heures ou demi-heures en fonction des périodes) par l'instrument optique avec pour calibration deux gaz : l'air atmosphérique (utilisé comme référence) et un air synthétique (avec une valeur de  $\delta^{18}\text{O}$  de l'O<sub>2</sub> de - 60 ‰). L'intérêt du SARA-O<sub>2</sub> est d'avoir des données en temps réel et en continu (si sur une seule chambre). Ces données ont été fréquemment comparées à des valeurs récupérées de manière discontinue avec le système d'ampoules par IRMS (méthode de référence).

Le principe de base du SARA-O<sub>2</sub> est le principe d'absorption de la lumière par un échantillon. La lumière transmise par un milieu de longueur L et éclairé avec une intensité I<sub>0</sub> suit une loi de décroissance exponentielle sous le nom de loi de Beer-Lambert. La lumière utilisée est émise par une source laser pour cet instrument. Le laser émet une lumière d'une longueur d'onde précise  $\lambda$ . Quand il y a un échantillon à l'intérieur de la cavité de l'instrument, la lumière va être absorbée et va perdre en intensité (Fig.2.9). Plus l'échantillon est concentré, plus l'absorption est importante, de même si la cavité est plus longue. L'absorption est donc dépendante de la concentration de l'échantillon et de la longueur de la cavité. En outre, l'échantillon absorbe des longueurs d'ondes spécifiques (Fig.2.9). Pour le dioxygène, des raies d'absorption spécifiques ont été sélectionnées dans le visible (rouge sombre, vers 760 nm). Lorsque le laser émet une longueur d'onde, celle-ci passe par deux polariseurs (atténuateurs) : le premier sélectionne une polarité de la lumière et le deuxième permet à la lumière de revenir sur le laser sans que la lumière ne soit trop intense (ce qui permet la stabilisation du signal).

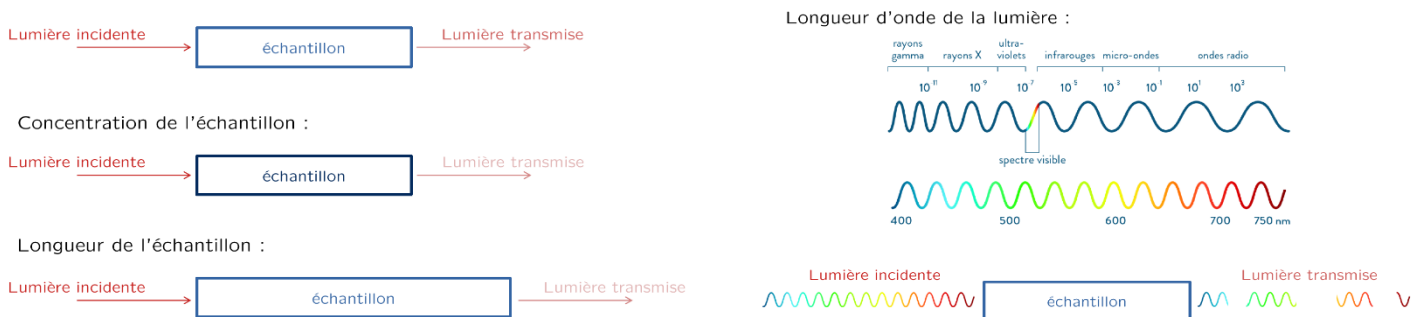


Figure 2.9 : Principes de base de l'absorption de la lumière.

Désormais, expliquons le trajet de l'échantillon dans les différentes parties de l'instrument. Tout d'abord, au niveau de la cavité optique, l'échantillon arrive à l'entrée de l'instrument (température à environ 26°C) et passe par un filtre de 2  $\mu\text{m}$  pour filtrer les poussières afin d'éviter de salir les miroirs. Ensuite, l'air passe par la buse sonique (orifice critique) qui permet de stabiliser le débit (19 sccm ou  $\text{cm}^3/\text{min}$ ). L'échantillon entre ensuite dans la cavité optique par son centre. Cette cavité est réglée en pression

à l'aide d'une électrovanne (150 mbar) et en température (autour de 40 - 45°C). Cette cavité est constituée de miroirs de haute réflectivité aux deux extrémités. L'échantillon est ensuite rejeté au niveau de la pompe. L'ensemble des éléments sont schématisés de manière simplifiée dans la figure 2.10.

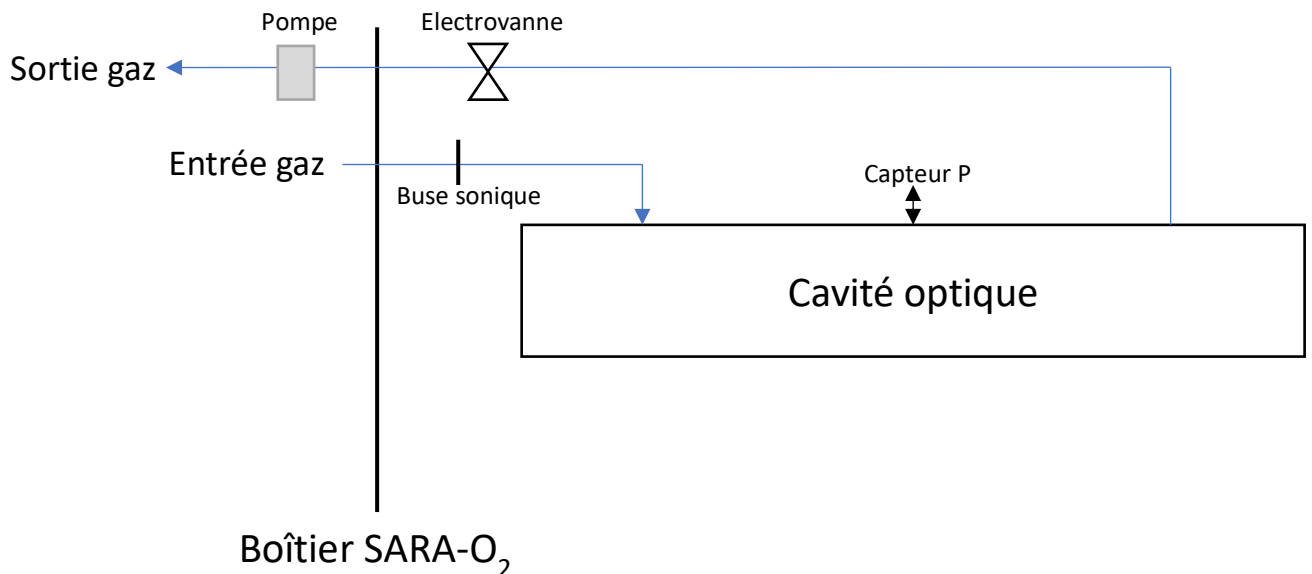


Figure 2.10 : Schéma simplifié du circuit du gaz dans l'instrument optique laser SARA-O<sub>2</sub>.

Maintenant, regardons le trajet et les propriétés du laser dans l'instrument (Fig.2.11). Tout d'abord, la lumière du laser va être injectée dans la cavité à l'aide de deux miroirs à 45°. Le deuxième miroir est monté sur un piézoélectrique (PZT) qui permet un déplacement du miroir afin d'ajuster la distance entre le laser et la cavité (condition nécessaire afin que la rétroaction fonctionne).

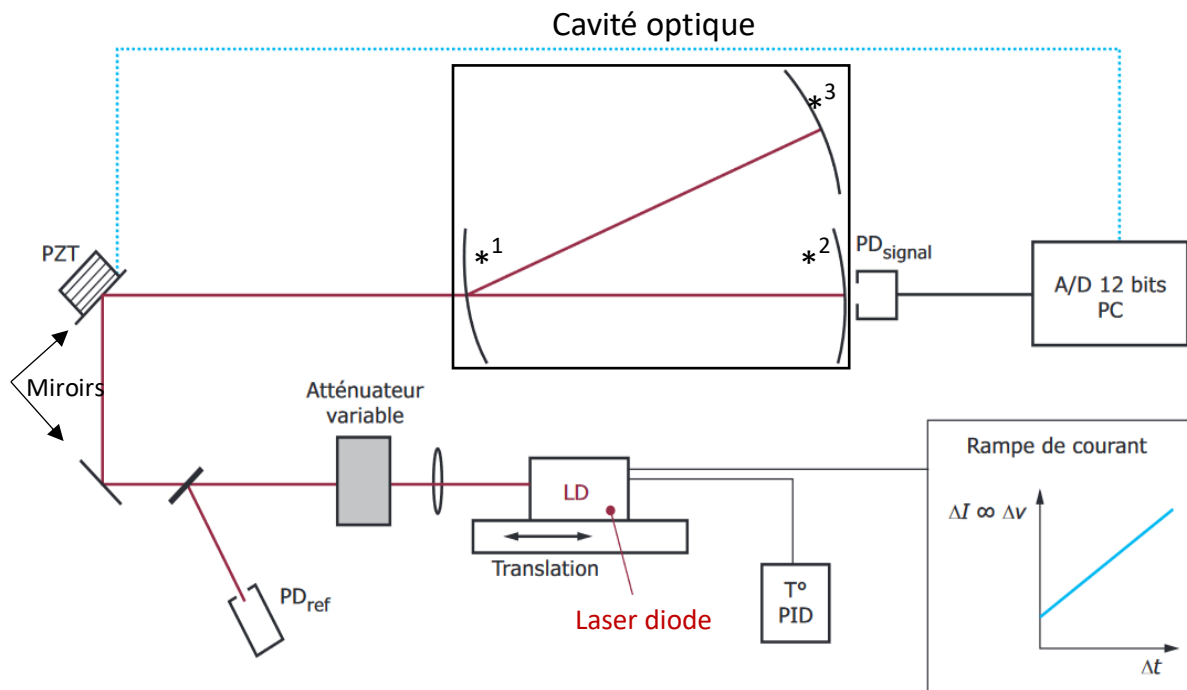


Figure 2.11 : Schéma de principe du système optique du SARA-O<sub>2</sub>. Les astérisques indiquent les trois miroirs de la cavité optique en V. La PD signal est la photodiode qui mesure le signal optique transmis par la cavité et la PDref est la photodiode de référence qui permet de connaître l'intensité lumineuse avant d'être envoyée dans la cavité. PZT = piézoélectrique. Le PID est le contrôle « proportionnel-intégral-dérivé ». Le spectre de transmission est proportionnel au rapport entre le signal transmis et le signal de référence (d'après Kassi et Romanini, 2014).

Lorsque le laser arrive au niveau de la cavité, il y a deux miroirs de part et d'autre de la cavité. Ces deux miroirs permettent d'aligner le faisceau lumineux dans la cavité optique. Une partie de la lumière est réfléchiée et une autre partie est transmise par les deux miroirs (1 et 2 sur la figure 2.11) : la lumière fait ainsi des allers-retours (Fig.2.12) et à chaque fois une petite partie du signal est transmise par le deuxième miroir vers la sortie. Une photodiode mesure le spectre en sortie de cette cavité. C'est le principe de la cavité optique résonante.

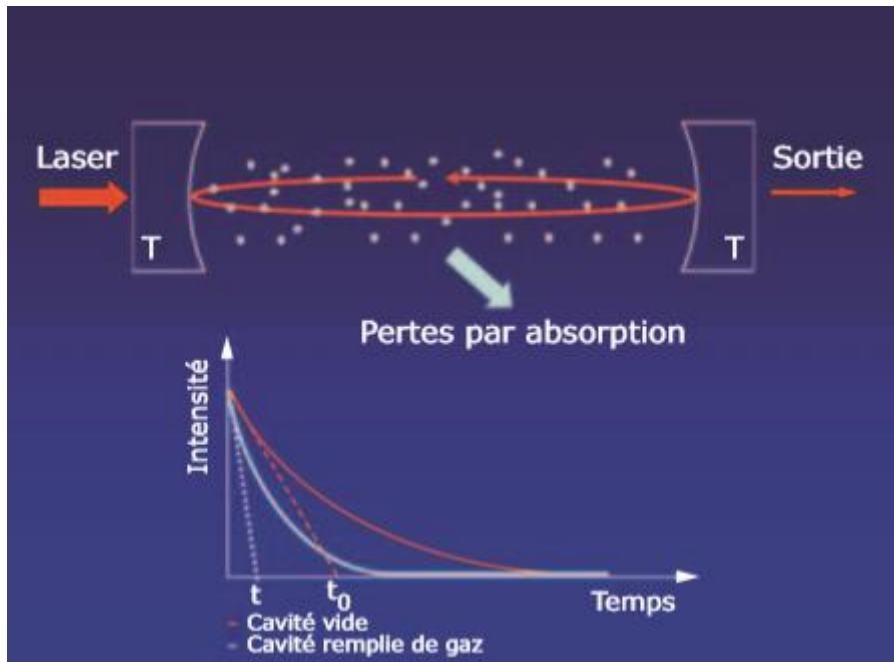


Figure 2.12 : Principe de la cavité optique résonante, avec les deux miroirs aux deux extrémités et la lumière du laser qui fait des aller-retours (d'après Kassi et Romanini, 2014).

Une rampe en courant appliquée sur le laser permet au laser d'effectuer un balayage en longueur d'onde afin de couvrir l'ensemble du spectre optique des isotopes de l'O<sub>2</sub> (760.94 – 761.05 nm, du rouge clair au rouge foncé). Le laser envoie donc un ensemble de plusieurs longueurs d'ondes dans le rouge (écart inférieur au nanomètre). A la sortie, les différentes longueurs d'ondes balayées par le laser dont une petite partie de la lumière est transmise par le miroir vers la photodiode, se superposent ou non, il s'agit d'interférences. En fonction de la longueur d'onde, la cavité optique va transmettre un maximum de lumière, il s'agit d'interférence constructives (transmission égale à 1), ou ne transmettre aucune lumière, il s'agit alors d'interférences destructives (transmission nulle). Un pic de transmission (résonance) est obtenu lorsque la longueur d'onde vérifie la condition suivante :  $L = m \times \lambda / 2$ , où  $m$  est un nombre entier et  $L$  la longueur de la cavité. Le faisceau laser est alors en résonance avec la cavité optique, sinon cela fait un creux (Fig.2.13).

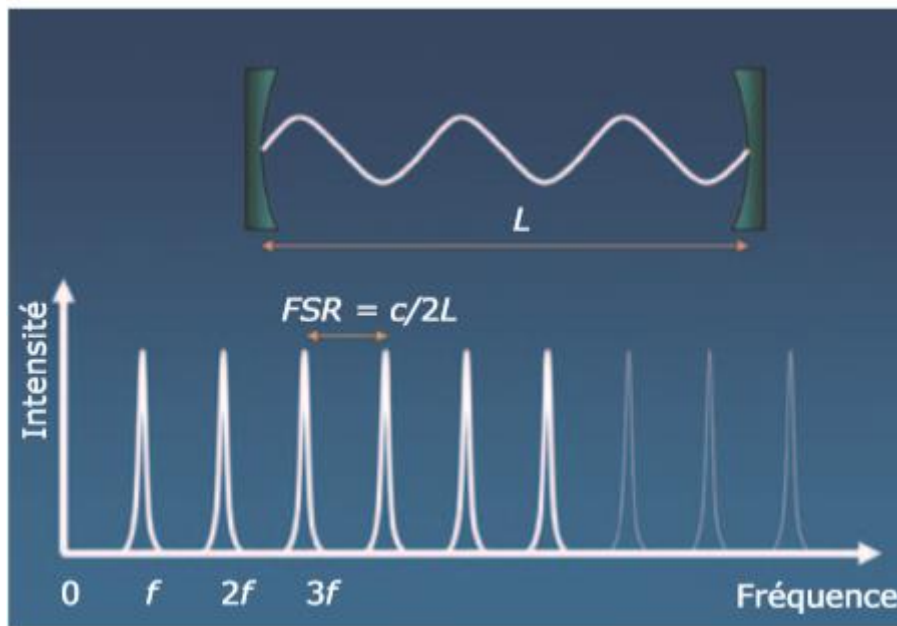


Figure 2.13 : Modes de résonance. FSR = Free Spectral Range (d'après Kassl et Romanini, 2014).

La particularité de la technique utilisée dans le SARA-O<sub>2</sub> est de récupérer une partie de la lumière réfléchi par la cavité optique afin d'effectuer une rétroaction optique et ainsi verrouiller la longueur d'onde d'émission du laser sur chaque pic de transmission de la cavité. Le problème qui se pose pour une cavité à deux miroirs est qu'une partie des photons renvoyés dans le laser n'auront pas transité dans la cavité, et ne permettront pas de contribuer à une stabilisation de la longueur d'onde. Pour contourner ce problème, il suffit d'utiliser un système de miroir en V en (Fig.2.14) en utilisant un troisième miroir (miroir 3 de la figure 2.11). Ainsi, la lumière arrive par un miroir légèrement incliné dans la cavité optique, ce qui permet de renvoyer les photons directement réfléchis hors de l'axe du laser (flèche rose), tandis que les photons résonants sont renvoyés dans l'axe optique du laser (flèche blanche).



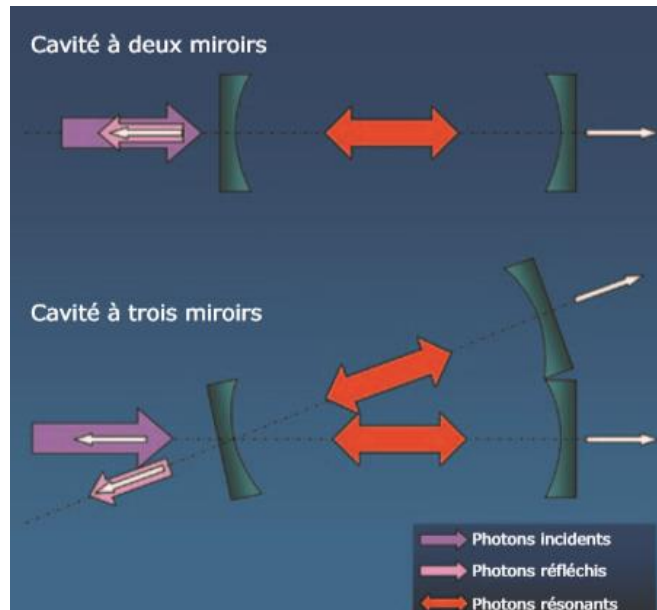


Figure 2.14 : Cavité optique en V, avec trois miroirs permettant la rétroaction optique (d'après Kassi et Romanini, 2014).

Par cette méthode, la fréquence émise est stable pendant un temps suffisamment long pour acquérir un signal d'absorption stable sur la photodiode. Avec cette méthode, les modes de résonances n'ont plus une forme de pic mais de U inversé (Fig.2.15).

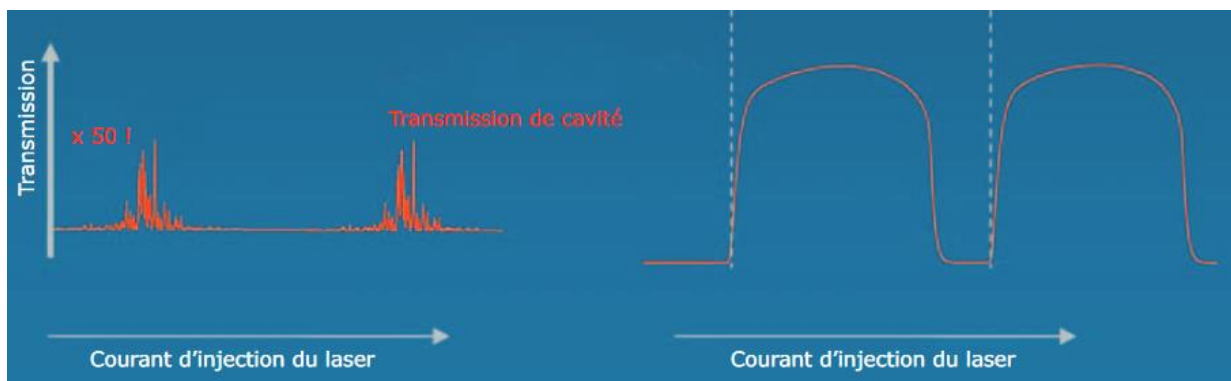


Figure 2.15 : Pic de résonance en l'absence de rétroaction optique (gauche), pic de résonance en forme de U inversé avec rétroaction optique (droite) (d'après Kassi et Romanini, 2014).

En plus de permettre la stabilisation de la longueur d'onde par rétroaction optique, la cavité à 3 miroirs en V permet de multiplier par deux la longueur de cavité pour un

même encombrement de l'instrument, et ainsi maximiser la longueur d'interaction lumière-gaz.

Lorsqu'il n'y a pas de molécule d'O<sub>2</sub> dans la cavité, il n'y a pas d'absorption : le spectre mesuré par la photodiode en sortie de cavité donne un ensemble de modes balayés de même hauteur (Fig.2.16). Si un échantillon de gaz est envoyé dans la cavité, il va y avoir des creux dans l'ensemble de ces modes de résonances (Fig.2.16). Ces creux signifient que la lumière a été absorbée par l'échantillon.

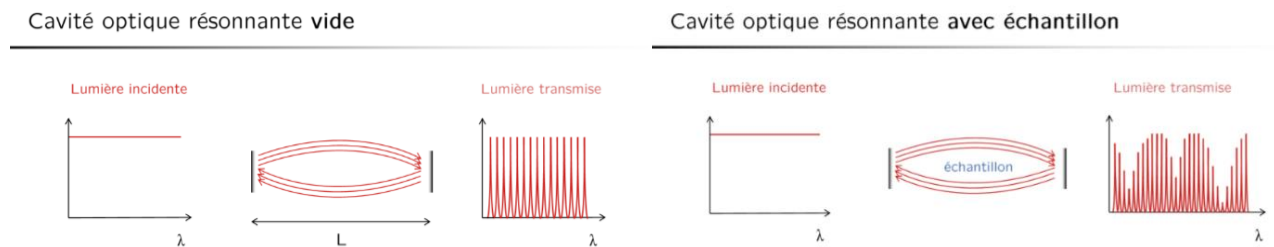


Figure 2.16 : Modes de résonance sans échantillon (gauche) et avec absorption par l'échantillon (droite).

La courbe reliant les maximums de chaque mode est inversée et donne le spectre d'absorption de l'échantillon pour l'oxygène 16, 17 et 18. L'amplitude des raies est proportionnelle à la concentration de l'élément mesuré (Fig.2.17). Dans la figure 2.17, la droite verte représente le spectre de référence donné par la photodiode de référence. Le pic du <sup>16</sup>O<sup>16</sup>O est saturé (Fig.2.17), ainsi un traitement spécial des spectres est réalisé pour pouvoir tout de même mesurer précisément la concentration associée.

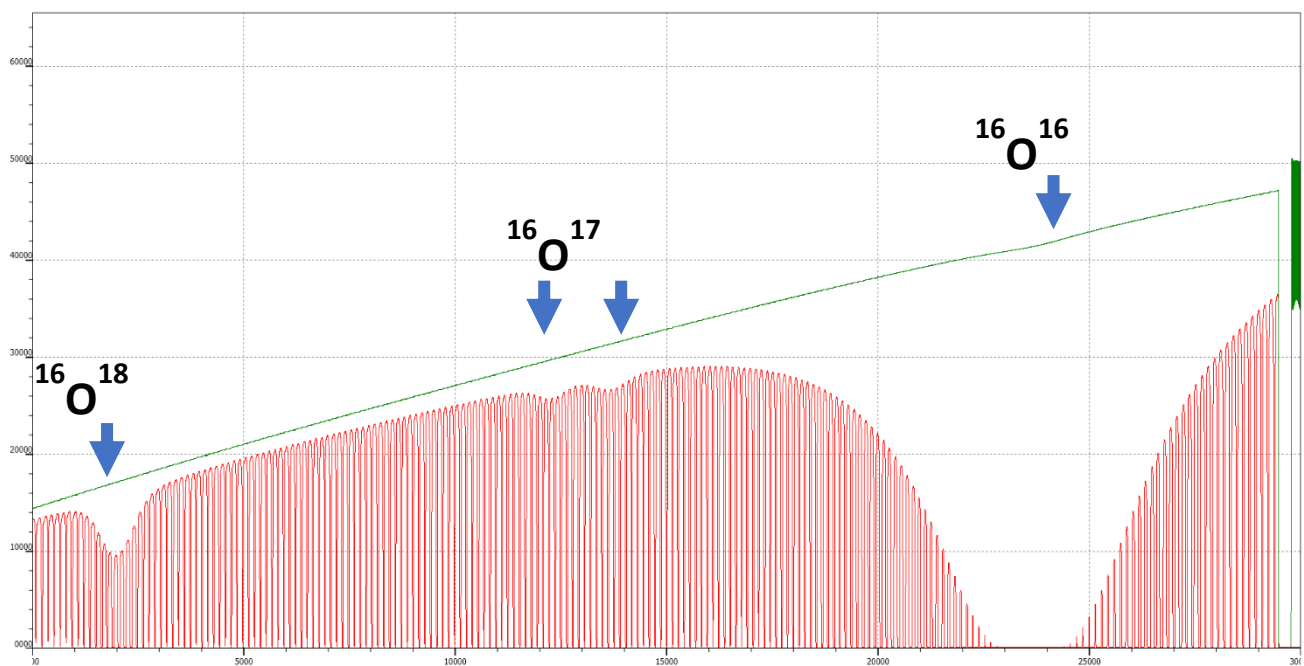


Figure 2.17 : Spectre d'absorption (modes de résonances en rouge) pour l'oxygène 16/18, 16/17 et 16/16 après passage d'un échantillon de gaz avec du dioxygène. La droite verte est le spectre de référence donné par la photodiode de référence.

## Chapitre 3 : *Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation-soil-atmosphere analog of the terrestrial biosphere in closed chambers*

### 3.1. Introduction

L'étude des fractionnements photosynthétiques et respiratoires terrestres permet de mieux interpréter les variations du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et de l'effet Dole global dans le passé. L'étude de ces fractionnements via une chambre biologique fermée et contrôlée est une méthode innovante et plus précise que les études passées dans la littérature car 1) l'échelle d'étude est plus large (sol-plantes-atmosphère), tel un petit écosystème, 2) tous les paramètres climatiques sont contrôlés et stabilisés, 3) le système est fermé donc est un système d'accumulation de gaz. Cette article, paru dans *Biogeosciences*, de l'EGU, présente l'ensemble du développement et la description de la mise en place de cette chambre de manière à ce quelle soit performante, ainsi que les fractionnements trouvés pour trois répétitions d'expériences avec la Fétuque et du sol.

3.2. Article : *Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation-soil-atmosphere analog of the terrestrial biosphere in closed chambers*



# Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation–soil–atmosphere analogue of the terrestrial biosphere in closed chambers

Clémence Paul<sup>1</sup>, Clément Piel<sup>2</sup>, Joana Sauze<sup>2</sup>, Nicolas Pasquier<sup>1</sup>, Frédéric Prié<sup>1</sup>, Sébastien Devidal<sup>2</sup>, Roxanne Jacob<sup>1</sup>, Arnaud Dapoigny<sup>1</sup>, Olivier Jossoud<sup>1</sup>, Alexandru Milcu<sup>2,3</sup>, and Amaëlle Landais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, LSCE/IPSL, CEA-CNRS-UVSQ, Université Paris-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup>Ecotron Européen de Montpellier (UAR 3248), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Campus Baillarguet, Université Montpellier, Montferrier-sur-Lez, France

<sup>3</sup>Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Université Montpellier, CNRS, Université Paul Valéry, EPHE, IRD, Montpellier, France

**Correspondence:** Clémence Paul (clemence.paul@lsce.ipsl.fr)

Received: 30 November 2021 – Discussion started: 16 December 2021

Revised: 25 August 2022 – Accepted: 16 February 2023 – Published: 16 March 2023

**Abstract.** The isotopic composition of dioxygen in the atmosphere is a global tracer which depends on the biosphere flux of dioxygen toward and from the atmosphere (photosynthesis and respiration) as well as exchanges with the stratosphere. When measured in fossil air trapped in ice cores, the relative concentration of <sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, and <sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> can be used for several applications such as ice core dating and past global productivity reconstruction. However, there are still uncertainties about the accuracy of these tracers as they depend on the integrated isotopic discrimination of different biological processes of dioxygen production and uptake, for which we currently have very few independent estimates. Here we determined the respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen from experiments carried out in a replicated vegetation–soil–atmosphere analogue of the terrestrial biosphere in closed chambers with growing *Festuca arundinacea*. The values for <sup>18</sup>O discrimination during soil respiration and dark respiration in leaves are equal to  $-12.3 \pm 1.7\text{‰}$  and  $-19.1 \pm 2.4\text{‰}$ , respectively. In these closed biological chambers, we also found a value attributed to terrestrial photosynthetic isotopic discrimination equal to  $+3.7 \pm 1.3\text{‰}$ . This last estimate suggests that the contribution of terrestrial productivity in the Dole effect may have been underestimated in previous studies.

## 1 Introduction

The oxygen cycle represents one of the most important biogeochemical cycles on Earth, as oxygen is the second most important gaseous component in the atmosphere. Oxygen is an essential component for life on Earth as it is consumed by all aerobic organisms through respiration and produced by autotrophic organisms through photosynthesis.

The analysis of the oxygen isotopic composition classically expressed as  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{17}\text{O}$  of O<sub>2</sub> in air bubbles trapped in ice cores is currently used to provide information on the variations of the low-latitude water cycle and the productivity of the biosphere during the Quaternary (Bender et al., 1994; Luz et al., 1999; Malaizé et al., 1999; Severinghaus et al., 2009; Blunier et al., 2002; Landais et al., 2010).  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub> is also a very useful proxy for ice core dating through the resemblance of its variations with the variations of precession or summer insolation in the Northern Hemisphere (Shackleton, 2000; Dreyfus et al., 2007). These tracers are however complex, and their interpretation relies on the precise knowledge of the various fractionation factors in the oxygen cycle.

First, interpreting the relationship between  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub> (or  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ) variations in ice core air and the low-latitude water cycle (e.g. Severinghaus et al., 2009; Landais et al., 2010;

Seltzer et al., 2017) is still debated because of the multiple processes involved. Dole (1936) reported the relative atomic weight of oxygen in the air and water of Lake Michigan and gave as a measure of the  $\delta^{18}\text{O}$  value between both of about 21 ‰. Barkan and Luz (2005) showed that  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  is enriched compared to the  $\delta^{18}\text{O}$  of water of the global ocean (taken here as the Vienna Standard Mean Ocean Water, VSMOW) with a value of 23.88 ‰. With the more recent values of Pack et al. (2017) of 24.15 ‰ and Wostbrock and Sharp (2021) of 24.05 ‰, we can envisage an enrichment of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  with respect to the VSMOW of about  $\sim 24$  ‰. This Dole effect is the result of several isotopic discriminations caused by biotic processes that enrich the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  relative to the oceanic values of water  $\delta^{18}\text{O}$ . First measurements have shown that the photosynthesis itself is not associated with a strong isotopic discrimination and produces oxygen with an isotopic composition which is close to the isotopic composition of the consumed water (Vinogradov et al., 1959; Stevens et al., 1975; Guy et al., 1993; Helman et al., 2005; Luz and Barkan, 2005). This is in contrast to the early results of Dole and Jenks (1944), who proposed a photosynthetic isotopic discrimination for plants and algae of 5 ‰. Vinogradov et al. (1959) challenged the results of Dole and Jenks (1944) by explaining that the  $^{18}\text{O}$  enrichment of  $\text{O}_2$  during their photosynthesis experiments is the result of contamination by atmospheric  $\text{O}_2$  and respiration. Guy et al. (1993) studied the photosynthetic isotopic discrimination on spinach thylakoids, cyanobacteria (*Anacystis nidulans*), and diatoms (*Phaeodactylum tricornerutum*) and found on average only a slight isotopic discrimination of 0.3 ‰, which they considered negligible. Luz and Barkan (2005) also corroborate this idea by studying photosynthetic isotopic discrimination on *Philodendron* and did not obtain a  $^{18}\text{O}$  enrichment of the  $\text{O}_2$  produced. This absence of isotopic discrimination can be theoretically explained by the process of  $\text{O}_2$  generation within photosynthesis (photosystem II) involving water oxidation by the oxygen evolving complex (Tcherkez and Farquhar, 2007). For the oceanic biosphere, the isotopic composition of  $\text{O}_2$  produced by photosynthesis is very close to the isotopic composition of the ocean. However, in terrestrial biosphere the  $\delta^{18}\text{O}$  of water split during photosynthesis (leaf water) is highly variable both spatially and temporally because of the decrease of  $\delta^{18}\text{O}$  of meteoric water toward higher latitudes (Dansgaard, 1974) and the enrichment in heavy isotopes in leaf water during evaporation (Dongmann et al., 1974). The mean  $\delta^{18}\text{O}$  enrichment of leaf water isotopic composition has been estimated between +4.5 ‰ and +6 ‰ with respect to the isotopic composition of mean global ocean water (Bender et al., 1994; Hoffmann et al., 2004). On top of this enrichment, the terrestrial and oceanic Dole effects are mostly explained by the respiratory isotopic discrimination of the order of magnitude of +18 ‰ (Bender et al., 1994).

Because of the isotopic enrichment in leaf water, the terrestrial Dole effect has been initially estimated to be 5 ‰

higher than the oceanic Dole effect and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  used to estimate changes in the balance between land and marine productivity (Wang et al., 2008; Bender et al., 1994; Hoffmann et al., 2004). However, the evidence by Eisenstadt et al. (2010) of isotopic discrimination up to +6 ‰ for marine phytoplankton photosynthesis rather suggests that the marine and terrestrial Dole effects are of the same order of magnitude. More specifically, Eisenstadt et al. (2010) determined several photosynthetic isotopic discrimination values depending on the phytoplankton studied (*Phaeodactylum tricornerutum*: 4.5 ‰, *Nannochloropsis* sp.: ‰, *Emiliania huxleyi*: 5.5 ‰, and *Chlamydomonas reinhardtii*: 7 ‰). If marine and terrestrial Dole effects are similar, then the past variations of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  cannot be attributed to different proportions of terrestrial or marine Dole effects. They would be better related to the low-latitude water cycle influencing the leaf water  $\delta^{18}\text{O}$  consumed by photosynthesis and then the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  produced by this process (with a larger flux in the low-latitude vegetated regions). This is supported by orbital and millennial variations of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  in phase with calcite  $\delta^{18}\text{O}$  in Chinese speleothem, a proxy strongly related to the intensity of the hydrological cycle in south-east Asia (Severinghaus et al., 2009; Landais et al., 2010; Extier et al., 2018). The aforementioned studies show that qualitative and quantitative interpretation of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  relies strongly on the estimate of  $\text{O}_2$  fractionation factors in the biological cycle, but data to constrain the fractionation factors associated with respiration and photosynthesis for the different ecosystems are sparse.

In addition to the use of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ , the combination of  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  provides a way to quantify variations in past global productivity (Luz et al., 1999). This method relies on the fact that  $\text{O}_2$ -fractionating processes in the stratosphere and within the biosphere lead to different relationships between  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ . Oxygen is fractionated in a mass-independent manner in the stratosphere, producing approximately equal  $^{17}\text{O}$  and  $^{18}\text{O}$  enrichments (Luz et al., 1999). On the contrary, the biosphere fractionating processes are mass-dependent such that the  $^{17}\text{O}$  enrichment is about half the  $^{18}\text{O}$  enrichment relative to  $^{16}\text{O}$ . We thus define a  $\Delta^{17}\text{O}$  anomaly as

$$\Delta^{17}\text{O} = \ln(1 + \delta^{17}\text{O}) - 0.516 \times \ln(1 + \delta^{18}\text{O}). \quad (1)$$

$\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  is equal to 0 by definition in the present-day troposphere (the standard for isotopic composition of atmospheric oxygen is the present-day atmospheric value).  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  is negative in the stratosphere, and increases in biosphere productivity lead to an increase of  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ . As for the interpretation of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ , the quantitative link between  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and biosphere productivity depends on the exact fractionation factors associated with biosphere processes (Brandon et al., 2020).

Several studies have been conducted to estimate the fractionation factors during biosphere processes of  $\text{O}_2$  production and consumption. These fractionation factors are then implemented in global modelling approaches involving the

use of models of global vegetation and oceanic biosphere for interpretation of  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  in terms of environmental parameters (Landais et al., 2007; Blunier et al., 2012; Reutenauer et al., 2015; Brandon et al., 2020). Most of the fractionation factors used in these modelling approaches were obtained from studies conducted at the cell level: cyanobacterium (Helman et al., 2005), *E. coli* (Stolper et al., 2018), and microalgae (Eisenstadt et al., 2010). In these studies, the underlying assumption is that the fractionation factor associated with  $\text{O}_2$  measured at the cell level can be applied at the ecosystem scale. Yet, results from studies conducted at a larger scale, e.g. at the soil scale by Angert et al. (2001) found a global terrestrial respiratory  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  discrimination for soil microorganisms varying between  $-12\text{‰}$  and  $-15\text{‰}$ . This is lower than the  $-18\text{‰}$  discrimination classically used for respiration, with diffusion in soil playing a role in addition to the biological respiration isotopic discrimination. Angert et al. (2001) also showed using experiments on roots of *Philodendron* plants and wheat seedlings that the respiratory discrimination of a soil with roots is lower (about  $-12\text{‰}$ ) than the  $-18\text{‰}$  discrimination associated with dark respiration. This is due to the low  $\text{O}_2$  concentration in roots whose presence favours a slower diffusion. Later, Angert et al. (2003) found an even larger spread of  $\text{O}_2$  isotopic discrimination in soil and showed that temperate and boreal soils have higher isotopic discrimination, respectively, of  $-17.8\text{‰}$  and  $-22.5\text{‰}$ .

It has been suggested that the strong discrimination observed for boreal and temperate soils is due to the involvement of the alternative oxidase pathway (AOX, Bendall and Bonner, 1971) in addition to the usual cyclooxygenase (COX) respiratory pathway. In the COX respiration pathway, present in the majority in plants, the cytochrome oxidase enzyme catalyses the oxygen reduction reaction. In the AOX pathway, the oxidation of ubiquinol molecules is directly coupled to the reduction of oxygen. Guy et al. (1989, 1992) showed that, for green tissues, the respiratory discrimination of the AOX pathway is much higher ( $-31\text{‰}$ ) than the one of the COX pathway ( $-21\text{‰}$ ). Similarly, Ribas-Carbo et al. (1995) found a higher respiratory discrimination in phytoplankton that engages the AOX pathway ( $-31\text{‰}$ ) relative to bacteria that engage the COX pathway ( $-24\text{‰}$ ).

Other studies had attempted to investigate the different respiratory discriminations in the light (dark respiration, Mehler reaction, and photorespiration). As during the light period, dark respiration can be inhibited (70 % inhibition found by Tcherkez et al., 2017, and Keenan et al., 2019), so that the other  $\text{O}_2$  consuming processes are important to consider. The Mehler reaction reduces oxygen to form a superoxide ion which is converted to hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in photosystem I and then further converted to water (Mehler, 1951). Photorespiration is the result of the oxygenase activity of Rubisco (Sharkey et al., 1998). This enzyme can oxidise ribulose-1,5-bisphosphate with an oxygen molecule  $\text{O}_2$ . This reaction causes a loss of  $\text{CO}_2$  incorporation, thus

decreasing the photosynthetic yield (Bauwe et al., 2010). Guy et al. (1993) first found a photorespiratory discrimination of  $-21.7\text{‰}$  and a  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  discrimination of  $-15.3\text{‰}$  for the Mehler reaction. Later, on a study performed on peas, Helman et al. (2005) found  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  discriminations of  $-21.3\text{‰}$  and  $-10.8\text{‰}$ , respectively, for photorespiration and the Mehler reaction.

The above-presented state of the art shows contrasting results for the determination of fractionation factors for the different photosynthesis and  $\text{O}_2$  uptake processes, thus underlining the importance of performing new measurements to correctly interpret global variations of the isotopic composition of oxygen. Moreover, because there may be a difference between the fractionation factors at the cell level and at a broader level as shown for dark respiration in soil, we will favour here an approach at the scale of a terrarium including plant and soil.

In this study we developed a simplified vegetation–soil–atmosphere analogue of the terrestrial biosphere in a closed chamber of  $120\text{ dm}^3$  with the aim of estimating the fractionation factors of atmospheric dioxygen due to soil respiration, plant respiration, and photosynthesis. With this set-up we carried out several experimental runs with soil only and soil with plants in order to estimate the isotopic discrimination of the different compartments and check values obtained at the cell level. The implications for our interpretation of the Dole effect are also discussed.

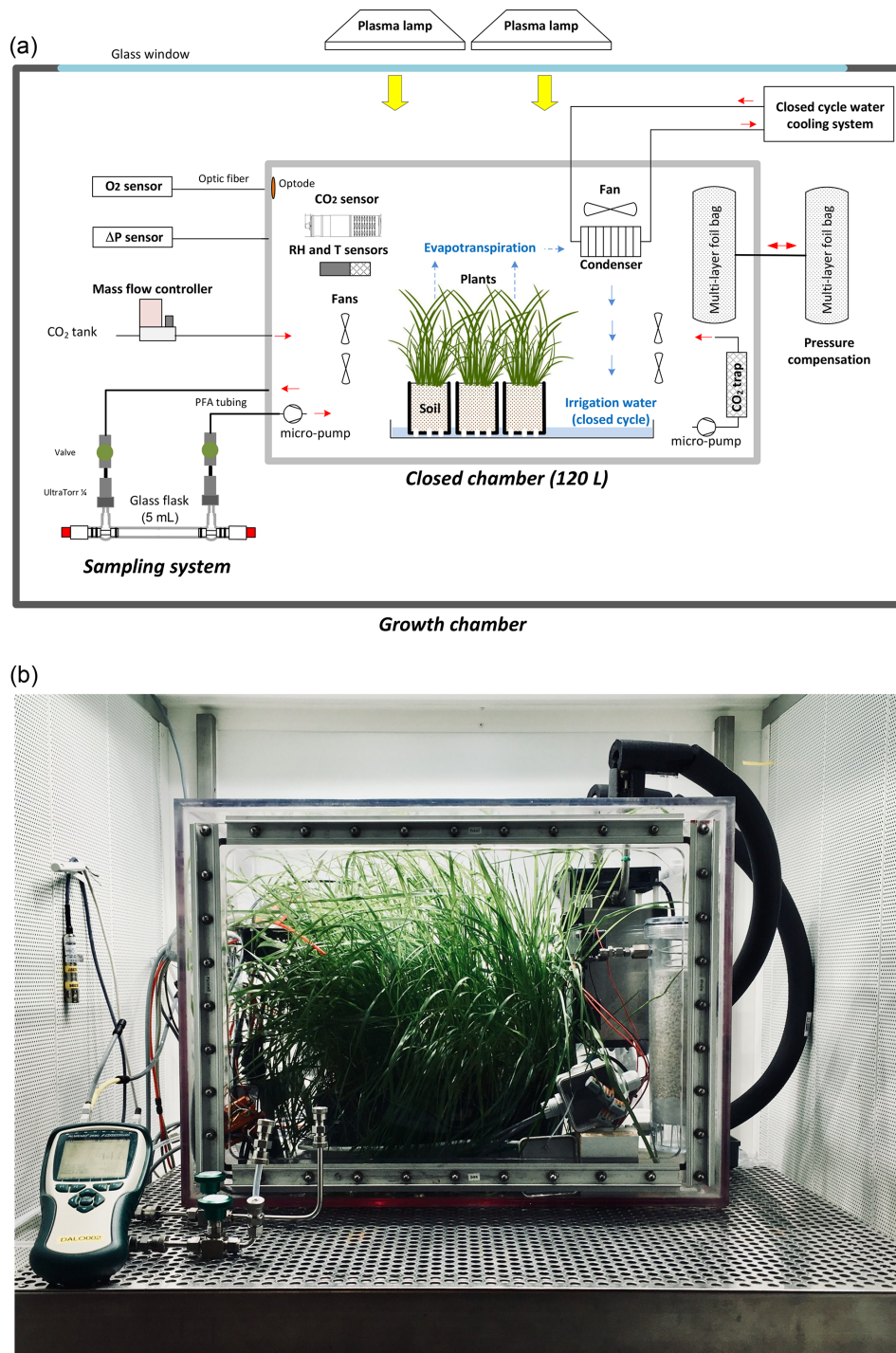
## 2 Material and methods

### 2.1 Growth chamber and closed system

#### 2.1.1 Plant growth and experimental set-up

Seeds of *Festuca arundinacea* (Schreb.), also commonly called tall fescue, were first sown in a commercial potting soil (Terreau universel, Botanic, France; composition: black and blond peat, wood fibre, green compost, and vermicompost manure, organic and organo-mineral fertilisers and micronutrient fertilisers). During 15 to 20 d, they were then placed in a growth chamber of the Microcosms experimental platform of the European Ecotron of Montpellier (<https://www.ecotron.cnrs.fr>, last access: 9 March 2023) under diurnal light–dark cycles (Table S1 in the Supplement), air temperature set at  $20^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{air}}$ ), air relative humidity (RH) at 80 %, and  $\text{CO}_2$  atmospheric concentration close to ambient air (concentration of  $\text{CO}_2 = 400\text{ ppm}$ ).

Twelve pots ( $8\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 12\text{ cm}$  with 180 to 200 g of dry soil) containing approximately 25 to 30 mature fescue plants were used for each experimental run. All plants were placed in a plastic tray filled with tap water inside an airtight transparent chamber manufactured from welded polycarbonate (10 mm wall thickness and 120 L volume) similar to the chambers used by Milcu et al. (2013) (Fig. 1). The sealing



**Figure 1.** A vegetation–soil–atmosphere analogue of the terrestrial biosphere in a closed chamber. (a) Schematic of the closed chamber set-up used for the terrestrial biosphere model. The 120 dm<sup>3</sup> gas tight closed chamber containing a terrestrial biosphere analogue is enclosed in a larger growth chamber from the Ecotron Microcosms platform. Main environmental parameters inside the closed chamber are actively controlled and monitored: temperature ( $T$ ), light intensity, CO<sub>2</sub>, relative humidity (RH), and pressure differential ( $\Delta P$ ). The water cycle in the closed chamber is shown in blue. (b) Photograph of the closed chamber used in the experiment with *Festuca arundinacea*.



of the closed chamber was checked before each experiment using helium.

To control temperature and light intensity inside the closed chamber, this smaller chamber was placed in a larger controlled-environment growth chamber. Light was provided by two plasma lamps (GAVITA Pro 300 LEP02; GAVITA) with  $\text{PAR} = 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , and air temperature inside the closed chamber was regulated at  $19 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  by adjusting the growth chamber temperature.

The closed chamber (Fig. 1) was used as a closed gas-exchange system with controlled, and continuously monitored, environmental parameters. Air and soil temperature (CTN 35, Carel), air relative humidity (PFmini72, Michell instrument, USA), and  $\text{CO}_2$  atmospheric concentration (GMP343, Vaisala, Finland) were measured and recorded using the growth chamber datalogger (sampling rate = 1 min).  $\text{O}_2$  concentration was continuously monitored using an optical sensor (Oxy1-SMA, Presens, Germany). Because precise  $\text{O}_2$  concentrations are determined in our samples by mass spectrometry (see next section), the measurements of the Oxy1-SMA were only used as a control during the experiment. The measured  $\text{O}_2$  value for atmospheric air was adjusted to 20.9 % before each sequence of experiments, and the same adjustment (offset) was then applied to the  $\text{O}_2$  record during the following sequence.

Air relative humidity was regulated between 80 % and 90 % using a heat exchanger (acting as a condenser) connected to a closed-cycle water cooling system. The condenser was positioned in a way to create a closed water cycle in the biological chamber (water vapour from evapotranspiration was condensed back into irrigation water). In order to keep the  $\text{CO}_2$  mixing ratio close to 400 ppm during the light periods, photosynthetic  $\text{CO}_2$  uptake was compensated with injections of pure  $\text{CO}_2$  using a mass flow controller (F200CV, Bronkhorst, the Netherlands). During the dark periods, a soda lime trap connected to a micro-pump (NMS 020B, KNF, Germany) was used to remove the excess  $\text{CO}_2$  coming from respiration.  $\text{CO}_2$  atmospheric concentration during the night was kept below 200 ppm.

To ensure atmospheric pressure stability in the closed chamber, a pressure compensation system, made of two connected 10 L gas tight bags (Restek multi-layer polyvinyl fluoride foil gas sampling bag, USA), was installed. Each bag was half full of atmospheric air; the first one was installed in the closed chamber while the second one was outside the chamber. This way, each bag inflated or deflated in response to pressure variations caused either by  $\text{O}_2$  or  $\text{CO}_2$  uptake or release. The pressure difference between the closed chamber and the atmosphere was regularly measured using a differential sensor (FD A602-S1K Almemo, Ahlborn, Germany).

Finally, the enclosed air was mixed using seven brushless fans and considered homogeneous.

## 2.1.2 Gas sampling

To measure the isotopic composition along the experiment, small samples of gas were collected in 5 mL glass flasks, made of two Louwers HV glass valves (1-way bore 9 mm Ref. LH10402008, Louwers Hanique, the Netherlands) welded together. Those flasks, previously evacuated, were mounted on PFA tubing (1/4th) using two 1/4th UltraTorr fittings (SS-4-UT-9, Swagelok, USA). Two manual valves (SS-4H, Swagelok, USA) were also installed on the PFA tubes to open or close the circuit. A micro-pump (NMS 20B, KNF, Germany) was finally turned on during air sampling to ensure closed chamber atmosphere circulation through the flask. The flow rate was equal to  $1.6 \text{ L min}^{-1}$ .

## 2.2 Isotopic measurements

### 2.2.1 Water extraction from leaf and isotopic analysis

After each experiment, the plant leaves were collected, placed in airtight flasks, and immediately frozen at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for at least 24 h to make sure there was minimal loss of water through vaporisation when the vial was opened later. The extraction of water from leaves was done according to the procedure detailed in Alexandre et al. (2018). The vial was fixed onto a cryogenic extraction line and was first immersed in a liquid nitrogen Dewar to prevent any sublimation of the water. The water extraction line was emptied of most of its air ( $< 10^{-5} \text{ Pa}$ ). Once this pressure was reached, the pump was turned off and a valve was closed in order to keep a constant static void within the system. The “reception” vial was then immersed in a liquid nitrogen Dewar which will act as a water trap, whilst the sample vial for the water was then transferred to a water bath maintained at  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ . The system was kept in these conditions for no less than 6 h, so that all the water present in the leaf and stems was extracted. Afterwards, in order to remove all of the organic compounds of the extracted water, an active charcoal was placed in the extracted water and left under agitation for the night.

For analysis of  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of water, leaf water was converted to  $\text{O}_2$  using a fluorination line for reaction of  $\text{H}_2\text{O}$  with  $\text{CoF}_3$  heated to  $370 \text{ }^\circ\text{C}$  at LSCE. The isotopic composition of the dioxygen was measured with an IRMS equipped with a dual inlet (Thermo Scientific MAT253 mass spectrometer). The standard that was chosen was an  $\text{O}_2$  standard calibrated against VSMOW. The precision was 0.015 ‰ for  $\delta^{17}\text{O}$ , 0.010 ‰ for  $\delta^{18}\text{O}$ , and 6 ppm for  $\Delta^{17}\text{O}$  (Eq. 1); for more details, refer to Landais et al. (2006).

The values of  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{17}\text{O}$  of leaf water measured with respect to VSMOW are then expressed with respect to the isotopic composition of dioxygen in atmospheric air (classical standard for  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  measurements). No consensus has been reached for the values of  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in atmospheric air with respect to  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{H}_2\text{O}$  of VSMOW. These differences are most probably to

be attributed to the different analytical techniques used for preparing and measuring the samples (Yeung et al., 2018; Wostbrock et al., 2021). In our case, because we use a similar set-up to the one developed by Barkan and Luz (2003) for the analyses of the triple isotopic composition of O<sub>2</sub> in the air (cf. next section), we have chosen to base our calculation on their estimates. In this study, we have thus chosen the value of 23.88‰ for δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> values with respect to VSMOW following Barkan and Luz, 2005. As for the δ<sup>17</sup>O of O<sub>2</sub> value with respect to the VSMOW value, we use two different possible estimates from these authors, either 12.03‰ (Luz and Barkan, 2011) or 12.08‰ (Barkan and Luz, 2005). We acknowledge that because of the absence of consensus, slightly different values could be obtained for the fractionation factors determined in this study if a different choice is made for the reference values of δ<sup>18</sup>O and δ<sup>17</sup>O of O<sub>2</sub> in atmospheric air with respect to δ<sup>17</sup>O and δ<sup>18</sup>O of H<sub>2</sub>O of VSMOW.

### 2.2.2 O<sub>2</sub> purification and isotopic analysis

The air samples collected in the closed chambers were transported to LSCE for analyses of the isotopic composition of O<sub>2</sub>. The flasks were connected on a semi-automatic separation line inspired from Barkan and Luz (2003) which was made up of eight ports in which two standards (outside air) and six samples were analysed daily (Brandon et al., 2020). After pumping the whole line, the air was circulated through a water trap (ethanol at −100 °C) and then through a carbon dioxide trap immersed in liquid nitrogen at −196 °C. After collection of the gas samples on a molecular sieve trap cooled at −196 °C, a helium flow carried it through a chromatographic column which was immersed in a water reservoir at 0 °C to separate the dioxygen and the argon from the dinitrogen. After separation of the dioxygen and argon from helium, the gas was collected in a stainless steel manifold immersed in liquid helium at −269 °C.

After collection, the samples were analysed by the IRMS, previously mentioned for leaf water analyses. The following ratios were measured: <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O, and O<sub>2</sub>/Ar (as an indicator of the O<sub>2</sub> concentration because Ar is an inert gas). δ<sup>17</sup>O and δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> each sample were obtained through three series of 24 dual inlet measurements against a standard made of O<sub>2</sub> and Ar. This sequence was followed by two peak jumping analyses of the O<sub>2</sub>/Ar ratio, including separate measurements of the O<sub>2</sub> and Ar signals for both the standard and the sample. The uncertainty associated with each measurement was obtained from the standard deviation of the three runs and from the repeated peak jumping measurement for δO<sub>2</sub>/Ar which was defined by  $\left[ \frac{\left(\frac{n(\text{O}_2)}{n(\text{Ar})}\right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{n(\text{O}_2)}{n(\text{Ar})}\right)_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000$ , and  $n(\text{O}_2)$  is the number of moles of O<sub>2</sub> and  $n(\text{Ar})$  the number of moles of Ar. The uncertainty values for Δ<sup>17</sup>O, δ<sup>18</sup>O, and δO<sub>2</sub>/Ar were, respectively, 10 ppm, 0.05‰, and 0.5‰.

Each day, we performed measurements of the dioxygen isotopic composition and O<sub>2</sub>/Ar ratio on two samples of outside air, which is the standard for the isotopic composition of O<sub>2</sub> (Hillaire-Marcel et al., 2021), so that the calibrated δ<sup>18</sup>O value for our sample was calculated as in Eq. (2).

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{calibrated}} = \left[ \frac{(\delta^{18}\text{O}_{\text{measured}}/1000) + 1}{(\delta^{18}\text{O}_{\text{outsideair}}/1000) + 1} - 1 \right] \times 1000 \quad (2)$$

## 2.3 Experimental runs

### 2.3.1 General strategy

Our goal was to calculate the fractionation factor associated with δ<sup>17</sup>O and δ<sup>18</sup>O for soil respiration, dark leaf respiration, and photosynthesis using the microcosm described above. In order to quantify the fractionation factors, we needed to work in closed and controlled conditions. Given the volume of the closed chamber (120 dm<sup>3</sup>, hence about 1.12 mol of O<sub>2</sub>) and the order of magnitude of dark respiration (order of magnitude of 0.08 μmol O<sub>2</sub> s<sup>−1</sup> for soil respiration) and net photosynthetic fluxes (order of magnitude of 0.45 μmol O<sub>2</sub> s<sup>−1</sup>) inside the chamber, we calculated that experiments should last from 3 d to more than 2 weeks so that more than  $\frac{1}{10}$  of the O<sub>2</sub> in the chamber can be recycled by the plant and soil. This recycling allows the creation of sufficiently large isotopic signals (especially Δ<sup>17</sup>O of O<sub>2</sub>) to be detected and measured. We set up two different experiments in the closed chamber, each experiment being repeated three or four times to characterise the experimental repeatability of the system.

The first experiment (repeated four times, i.e. in four sequences) aimed at studying the fractionation factors during soil respiration. The second experiment (repeated three times, i.e. in three sequences, each sequence being divided into several periods with or without light) aimed at studying the fractionation factors during dark respiration and photosynthesis of plants.

Prior to the aforementioned experiments, measurements were carried out on a closed empty chamber to check the absence of leaks as well as the absence of isotopic fractionation (Table S2).

### 2.3.2 Soil respiration experiment

To conduct the soil respiration experiment, 2.6 kg of soil (*Terreau universel, Botanic*) were placed in 12 different pots. The light was turned off during this experimental run (Table S1). We decided not to apply any diurnal cycles during dark respiration experimentations for two reasons. First, we wanted to prevent the development of algae, mosses, or any photosynthetic organisms in the chamber. Secondly, it was easier to optimise temperature control as the light radiation could increase the temperature inside the closed chamber. During this dark period, CO<sub>2</sub> from soil respiration accumulates in the biological closed chamber. To have a stable concentration of CO<sub>2</sub> during the whole dark period, the CO<sub>2</sub>

was trapped using soda lime. Four sequences were performed with respective durations of 53, 51, 43, and 36 d.

### 2.3.3 Photosynthesis and dark respiration experiment

We used the same soil with plants (*Festuca arundinacea*) grown before the start of the three sequences of the photosynthesis and dark respiration experiment. In order to obtain a significant change of the  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  signal in our closed  $120\text{ dm}^3$  chambers, the three experiments were run for 1 to 2 months.  $\text{CO}_2$  level was controlled to 400 ppm by a  $\text{CO}_2$  trap and  $\text{CO}_2$  injections. This was done to ensure that the  $\text{CO}_2$  in the chamber did not reach levels too far from the atmospheric composition as this could have affected the physiology of the plant. The light cycle was controlled to alternate between day (photosynthesis and respiration) and night conditions (respiration) (Table S1).

The values of the leaf water measurements are presented in Table S3. Because the experiments had to be carried in a closed chamber, we could not sample leaves during the experiment and only got a value at the end of each sequence. Nevertheless, we could compare the isotopic composition of the irrigation and soil water at the start and at the end of the experiment.

### 2.4 Quantification of fractionation factors

We detail below how we used the results from our experiments to quantify the associated fractionation factors. Notations used below are gathered in Table 1.

The isotopic fractionation factor of oxygen is expressed through the fractionation factor  $\alpha$ .

$${}^{18}\alpha = \frac{{}^{18}R_{\text{product}}}{{}^{18}R_{\text{substrat}}}, \tag{3}$$

where  $\alpha$  is the fractionation factor and  ${}^{18}R$  is the ratio of the concentration  ${}^{18}R = \frac{n({}^{18}\text{O})}{n({}^{16}\text{O})}$  with  $n$  the number of moles of  $\text{O}_2$  containing  ${}^{18}\text{O}$  or  ${}^{16}\text{O}$ .  ${}^{18}R$  is linked to the  $\delta^{18}\text{O}$  value through

$$\delta^{18}\text{O} = \left( \frac{{}^{18}R_{\text{sample}}}{{}^{18}R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000. \tag{4}$$

The isotopic discrimination is related to the isotopic fractionation factor through

$${}^{18}\varepsilon = {}^{18}\alpha - 1. \tag{5}$$

The same Eqs. (3), (4), and (5) can be proposed for  $\delta^{17}\text{O}$ , and the relationship between the fractionation factors  ${}^{17}\alpha$  and  ${}^{18}\alpha$  is written as

$$\theta = \frac{\ln {}^{17}\alpha}{\ln {}^{18}\alpha}. \tag{6}$$

In some studies, referred to later, the notation  $\gamma$  is also used with  $\gamma = \frac{{}^{17}\varepsilon}{{}^{18}\varepsilon}$ .

### 2.4.1 Soil respiration

Respiration is associated with isotopic fractionation. The light isotopes,  ${}^{16}\text{O}$ , are more easily integrated by microorganisms than the heavy isotopes,  ${}^{18}\text{O}$ , which hence remain in the atmosphere. We express the fractionation factor for soil respiration as

$${}^{18}\alpha_{\text{soil\_respi}} = \frac{{}^{18}R_{\text{respired}}}{{}^{18}R_{\text{air}}}. \tag{7}$$

In our experiment, the respiratory process took place in a closed reservoir so that we could calculate the fractionation factors from the evolution of the concentration and isotopic composition of dioxygen in the chamber. The number of molecules of dioxygen in the air of the closed chamber,  $n(\text{O}_2)$ , between time  $t$  and time  $t + dt$  can be written as

$$n(\text{O}_2)_{t+dt} = n(\text{O}_2)_t - dn(\text{O}_2), \tag{8}$$

with  $dn(\text{O}_2)$  the number of dioxygen molecules respired during the time period  $dt$ . A similar equation can be written for the number of dioxygen molecules containing  ${}^{18}\text{O}$  remaining in the air of the chamber:

$${}^{18}R_{t+dt} \times n(\text{O}_2)_{t+dt} = {}^{18}R_t \times n(\text{O}_2)_t - {}^{18}\alpha_{\text{soil\_respi}} \times dn(\text{O}_2). \tag{9}$$

The evolution of the isotopic ratio of oxygen,  ${}^{18}R$ , between time  $t$  and time  $t + dt$  can be written as:

$${}^{18}R_{t+dt} = {}^{18}R_t + d{}^{18}R \tag{10}$$

Combining equations Eqs. (8), (9), and (10); neglecting the second order term  $d{}^{18}R_t \times dn(\text{O}_2)_t$ ; and integrating from  $t_0$  (starting time of the experiment when the chamber is closed) to  $t$  leads to

$${}^{18}\varepsilon_{\text{soil\_respi}} = {}^{18}\alpha_{\text{soil\_respi}} - 1 = \frac{\ln \left( \frac{\frac{\delta^{18}\text{O}_t}{1000} + 1}{\frac{\delta^{18}\text{O}_{t_0}}{1000} + 1} \right)}{\ln \left( \frac{n(\text{O}_2)_t}{n(\text{O}_2)_{t_0}} \right)}. \tag{11}$$

Because argon is an inert gas, we can link  $\frac{n(\text{O}_2)_t}{n(\text{O}_2)_{t_0}}$  to  $\delta \left( \frac{\text{O}_2}{\text{Ar}} \right)$ , so that

$$\frac{n(\text{O}_2)_t}{n(\text{O}_2)_{t_0}} = \frac{\frac{\delta \left( \frac{\text{O}_2}{\text{Ar}} \right)_t}{1000} + 1}{\frac{\delta \left( \frac{\text{O}_2}{\text{Ar}} \right)_{t_0}}{1000} + 1}. \tag{12}$$

### 2.4.2 Dark respiration

In order to calculate the isotopic fractionation associated with soil and plant respiration during the dark period, we followed the same calculation as for the soil respiration (Sect. 2.4.1). In this case, we selected only night periods from each sequence of the photosynthesis and dark respiration experiment.

**Table 1.** List of variables used to quantify fractionations and their definitions (\* means either oxygen 17 or oxygen 18).

| Symbol                                    | Definition  | Origin of the value                               |
|---|---|---|
| $*\alpha$                                 | Fractionation factor  |   |
| $*\alpha_{\text{dark\_respi}}$            | Fractionation factor of soil and plant respiration during night periods   | Determined by our study                           |
| $*\alpha_{\text{dark\_leaf\_respi}}$      | Fractionation factor of leaf respiration during night periods   | Determined by our study                           |
| $*\alpha_{\text{Mehler}}$                 | Fractionation factor associated with Mehler respiration   | Value from Helman et al. (2005)                   |
| $*\alpha_{\text{photorespi}}$             | Fractionation factor associated with photorespiration   | Value from Helman et al. (2005)                   |
| $*\alpha_{\text{photosynthesis}}$         | Fractionation factor associated with photosynthesis   | Determined by our study                           |
| $*\alpha_{\text{soil\_respi}}$            | Fractionation factor associated with soil respiration   | Determined by our study                           |
| $*\alpha_{\text{total\_respi}}$           | Fractionation factor associated with total respiration during light period  | Determined by our study                           |
| $*\varepsilon$                            | Isotopic discrimination   |   |
| $*\varepsilon_{\text{dark\_respi}}$       | Isotopic discrimination of soil and plant respiration during night periods  | Determined by our study                           |
| $*\varepsilon_{\text{dark\_leaf\_respi}}$ | Isotopic discrimination of leaf respiration during night periods  | Determined by our study                           |
| $*\varepsilon_{\text{photosynthesis}}$    | Isotopic discrimination associated with photosynthesis  | Determined by our study                           |
| $*\varepsilon_{\text{soil\_respi}}$       | Isotopic discrimination of soil respiration associated with soil respiration experiment   | Determined by our study                           |
| $\theta$                                  | Ratio of $\ln(^{17}\alpha)$ to $\ln(^{18}\alpha)$   |   |
| $\theta_{\text{dark\_respi}}$             | Ratio of $\ln(^{17}\alpha_{\text{dark\_respi}})$ to $\ln(^{18}\alpha_{\text{dark\_respi}})$   | Determined by our study                           |
| $\theta_{\text{dark\_leaf\_respi}}$       | Ratio of $\ln(^{17}\alpha_{\text{dark\_leaf\_respi}})$ to $\ln(^{18}\alpha_{\text{dark\_leaf\_respi}})$                                 | Determined by our study                           |
| $\theta_{\text{photosynthesis}}$          | Ratio of $\ln(^{17}\alpha_{\text{photosynthesis}})$ to $\ln(^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}})$                                       | Determined by our study                           |
| $\theta_{\text{soil\_respi}}$             | Ratio of $\ln(^{17}\alpha_{\text{soil\_respi}})$ to $\ln(^{18}\alpha_{\text{soil\_respi}})$   | Determined by our study                           |
| $aN$                                      | Linear regression coefficient of the evolution of $n(\text{O}_2)$ as a function of time   | Determined by our study                           |
| $a^*R$                                    | Linear regression coefficient of the evolution of $R^*\text{O}$ as a function of time   | Determined by our study                           |
| $dn_{\text{photosynthesis}}$              | Number of moles of $\text{O}_2$ produced by photosynthesis between $t$ and $t + dt$   | Determined by our study                           |
| $dn_{\text{total\_respi}}$                | Number of moles of $\text{O}_2$ consumed by total respiration during light periods between time $t$ and $t + dt$                        | Determined by our study                           |
| $F_{\text{dark\_respi}}$                  | Dark respiration flux (normalised vs. number of moles of $\text{O}_2$ at the start of the experiment)                                   | Determined by our study                           |
| $F_{\text{Mehler}}$                       | Mehler flux (normalised vs. number of moles of $\text{O}_2$ at the start of the experiment)   | Determined by our study and Landais et al. (2007) |
| $F_{\text{photorespi}}$                   | Photorespiration $\text{O}_2$ flux (normalised vs. number of moles of $\text{O}_2$ at the start of the experiment)                      | Determined by our study and Landais et al. (2007) |
| $F_{\text{photosynthesis}}$               | Photosynthesis $\text{O}_2$ flux (normalised vs. number of moles of $\text{O}_2$ at the start of the experiment)                        | Determined by our study                           |
| $F_{\text{total\_respi}}$                 | Total respiration $\text{O}_2$ flux during light period (normalised vs. number of moles of $\text{O}_2$ at the start of the experiment) | Determined by our study                           |
| $f_{\text{dark\_respi}}$                  | Fraction of the dioxygen flux corresponding to dark respiration process   | Value from Landais et al. (2007)                  |
| $f_{\text{Mehler}}$                       | Fraction of the dioxygen flux corresponding to Mehler process   | Value from Landais et al. (2007)                  |
| $f_{\text{photorespi}}$                   | Fraction of the dioxygen flux corresponding to photorespiration process   | Value from Landais et al. (2007)                  |
| $n(\text{O}_2)$                           | Number of moles of $\text{O}_2$   | Determined by our study                           |
| $*R$                                      | Ratio of heavy ( $^{18}\text{O}$ or $^{17}\text{O}$ ) isotope to light isotope ( $^{16}\text{O}$ ) of $\text{O}_2$ in air               | Determined by our study                           |
| $*R_{\text{lw}}$                          | $*R$ of leaf water  | Determined by our study                           |

### 2.4.3 Photosynthesis

During photosynthesis, the oxygen atoms in the dioxygen produced by the plant come from the oxygen atom of water consumed by photosynthesis in the leaves, so that the fractionation factor during photosynthesis can be expressed as

$$^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}} = \frac{^{18}R_{\text{produced O}_2}}{^{18}R_{\text{lw}}}, \tag{13}$$

where lw stands for leaf water.

For our study of *Festuca arundinacea*, we consider that the water in the mesophyll layer can be represented by bulk leaf water.

Photosynthesis occurs during the light periods. However, it should be noted that dark respiration, photorespiration, and the Mehler reaction occur at the same time. In a first approach, we made the assumption that respiration rates remain the same during the light and dark periods. This assumption is probably true for soil respiration since flux of heterotrophic dark respiration is not expected to change for different light conditions if the other environmental drivers (e.g. humidity, temperature, soil organic matter) are constant. However, autotrophic dark respiration is expected to decrease during light periods compared to dark periods. As a consequence, we present sensitivity tests to the dependence of a vanishing dark respiration of leaves during the dark period in Table S4.

Thus, at each stage, dioxygen is both produced by photosynthesis and consumed by the aforementioned O<sub>2</sub> uptake processes (hereafter total\_respi) by the plant according to the mass conservation equation

$$n(\text{O}_2)_{t+dt} = n(\text{O}_2)_t - dn_{\text{total\_respi}} + dn_{\text{photosynthesis}}, \tag{14}$$

where  $dn_{\text{total\_respi}}$  is the number of molecules of O<sub>2</sub> consumed by dark respiration, photorespiration, and the Mehler reaction between time  $t$  and  $t + dt$ , and  $dn_{\text{photosynthesis}}$  is the number of molecules of O<sub>2</sub> produced by photosynthesis between  $t$  and  $t + dt$ .

The budget for <sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> can be written as

$$\begin{aligned} ^{18}R_{t+dt} \times \frac{n(\text{O}_2)_{t+dt}}{n(\text{O}_2)_{t0}} = & \\ ^{18}R_t \times \frac{n(\text{O}_2)_t}{n(\text{O}_2)_{t0}} - ^{18}R_t \times ^{18}\alpha_{\text{total\_respi}} & \\ \times \frac{dn_{\text{total\_respi}}}{n(\text{O}_2)_{t0}} + ^{18}R_{\text{lw}} \times ^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}} & \\ \times \frac{dn_{\text{photosynthesis}}}{n(\text{O}_2)_{t0}}, & \end{aligned} \tag{15}$$

where  $^{18}\alpha_{\text{total\_respi}}$  is the fractionation factors associated with each O<sub>2</sub> consuming process period throughout the whole experiment.

We introduced the normalised fluxes of photosynthesis and total respiration as

$$F_{\text{photosynthesis}} = \frac{dn_{\text{photosynthesis}}}{n(\text{O}_2)_{t0} \times dt}, \tag{16}$$

$$F_{\text{total\_respi}} = \frac{dn_{\text{total\_respi}}}{n(\text{O}_2)_{t0} \times dt}, \tag{17}$$

$$a^{18}R = \frac{d^{18}R}{dt}. \tag{18}$$

This led to the following expression of  $^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}}$ :

$$^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}} = \frac{n(\text{O}_2)_t / n(\text{O}_2)_{t0} \times a^{18}R + ^{18}R_t \times (F_{\text{photosynthesis}} - F_{\text{total\_respi}} + ^{18}\alpha_{\text{total\_respi}} \times F_{\text{total\_respi}})}{^{18}R_{\text{lw}} \times F_{\text{photosynthesis}}}. \tag{19}$$

This equation can be simplified at  $t = 0$  for  $^{18}R_t = ^{18}R_{t0} = 1$  and  $n(\text{O}_2)_t = n(\text{O}_2)_{t0}$ :  $^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}}$  depends on the values of  $^{18}\alpha_{\text{total\_respi}}$  and of  $F_{\text{total\_respi}}$ , themselves dependent on the values of  $^{18}\alpha_{\text{Mehler}}$  (fractionation factor associated with Mehler reaction),  $F_{\text{Mehler}}$  (flux of oxygen related to Mehler reaction),  $^{18}\alpha_{\text{dark\_respi}}$ ,  $F_{\text{dark\_respi}}$ ,  $^{18}\alpha_{\text{photorespi}}$  (fractionation factor associated with photorespiration), and  $F_{\text{photorespi}}$  (photorespiration flux of oxygen). These last four parameters could not be determined in our global experiment. Our determination of  $^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}}$  will thus rely on assumptions for the estimations of  $^{18}\alpha_{\text{Mehler}}$ ,  $F_{\text{Mehler}}$ ,  $^{18}\alpha_{\text{photorespi}}$ , and  $F_{\text{photorespi}}$ .

To separate the  $^{18}\alpha_{\text{dark\_respi}}$  from the other fractionation factors, we defined

$$\begin{aligned} ^{18}\alpha_{\text{total\_respi}} = & ^{18}\alpha_{\text{photorespi}} \times f_{\text{photorespi}} \\ & + ^{18}\alpha_{\text{Mehler}} \times f_{\text{Mehler}} \\ & + ^{18}\alpha_{\text{dark\_respi}} \times f_{\text{dark\_respi}} \end{aligned} \tag{20}$$

with

$$F_{\text{total\_respi}} = F_{\text{dark\_respi}} + F_{\text{photorespi}} + F_{\text{Mehler}}. \tag{21}$$

$f$  indicates the fraction of the total oxygen uptake flux corresponding to each process (dark respiration, photorespiration, and Mehler reaction) so that

$$f_{\text{dark\_respi}} + f_{\text{photorespi}} + f_{\text{Mehler}} = 1 \tag{22}$$

$$F_{\text{dark\_respi}} = f_{\text{dark\_respi}} \times F_{\text{total\_respi}} \tag{23}$$

$$F_{\text{photorespi}} = f_{\text{photorespi}} \times F_{\text{total\_respi}} \tag{24}$$

$$F_{\text{Mehler}} = f_{\text{Mehler}} \times F_{\text{total\_respi}}. \tag{25}$$

In the absence of further constraints, we used here as first approximation the global values from Landais et al. (2007) for  $f_{\text{dark\_respi}}$  (0.6),  $f_{\text{photorespi}}$  (0.3) and  $f_{\text{Mehler}}$  (0.1). Values for  $\alpha_{\text{photorespi}}$  and  $\alpha_{\text{Mehler}}$  were based on the most recent estimates of Helman et al. (2005).

### 3 Results

#### 3.1 Soil respiration

##### 3.1.1 Experimental data

During the four sequences, the respiration activity led to a decreasing level of the O<sub>2</sub> concentration measured by the optical sensor or through the δO<sub>2</sub>/Ar evolution from IRMS measurements (Fig. S1 in the Supplement). The comparison of the evolution of the O<sub>2</sub> concentration during the different sequences showed that respiratory fluxes were different with a maximum factor of 4 between the different sequences (Fig. S1). In parallel to the decrease in O<sub>2</sub> concentration, the δ<sup>18</sup>O increased as expected because respiration preferentially consumes the lightest isotopes: over the 51 d of the second soil respiration sequence, we observed a linear decrease of oxygen concentration by more than 5 % while δ<sup>18</sup>O increased by 8 ‰ (Fig. 2). A Mann–Kendall trend test showed that the Δ<sup>17</sup>O of O<sub>2</sub> does not show any statistically significant trend over the four sequences (Fig. S2) (*p* values were equal to 0.40, 0.08, 0.58, and 0.47, respectively).

##### 3.1.2 Fractionation factors

We used the 15 to 20 samples obtained during each sequence of the soil respiration experiment to draw the relative evolution of  $\ln(^{18}R_t/^{18}R_{t0})$  vs.  $\ln((\delta(\frac{O_2}{Ar})_t/1000 + 1)/(\delta(\frac{O_2}{Ar})_{t0}/1000 + 1))$  following Eq. (11) (Fig. 3). The slope of the corresponding regression line provided the isotopic discrimination  $^{18}\epsilon_{soil\_respi}$  and hence the fractionation factor  $^{18}\alpha_{soil\_respi}$  for each sequence (Table S5). It could be observed that despite differences in respiratory fluxes for the different sequences (the standard deviation is equal to 50 % of the average flux across sequences; see Table S5), the relationship between δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentration (or δO<sub>2</sub>/Ar), and hence the calculated fractionation factor associated with respiration, is not much affected.

Using the results of the four sequences, we determined the values for the mean isotopic discrimination  $^{18}\epsilon_{soil\_respi}$  ( $-12.3 \pm 1.7$  ‰), the mean isotopic discrimination  $^{17}\epsilon_{soil\_respi}$  ( $-6.4 \pm 0.9$  ‰), and the average  $\theta_{soil\_respi}$  ( $0.5164 \pm 0.0005$ ).

#### 3.2 Photosynthesis and dark respiration

##### 3.2.1 Experimental data

During the night periods, when only respiration occurred, we observed a decrease in O<sub>2</sub> concentration by 1 % within 3 d and a δ<sup>18</sup>O increase by 1 ‰ during the same period (Fig. 4). The evolution was qualitatively similar to that of soil respiration experiments with higher fluxes. We observed the same trends for the evolution of δO<sub>2</sub>/Ar during the night periods as for the respiration experiment. During light periods, there

was a marked decrease in δ<sup>18</sup>O (2 ‰) and a marked increase in the flux of oxygen released (1 %) during 1 d. We observed the same trends for the evolution of δO<sub>2</sub>/Ar during the night periods as for the respiration experiment.

The Mann–Kendall test (95 %) showed a significant increasing trend of the Δ<sup>17</sup>O of O<sub>2</sub> over sequences 1 and 2 (Fig. S3) ( $\approx 100$  ppm in 31 d for sequence 1,  $\approx 100$  ppm in 40 d for sequence 2), while no significant increase of Δ<sup>17</sup>O of O<sub>2</sub> is observed over sequence 3 (Fig. S3).

##### 3.2.2 Fractionation factors

###### Dark respiration

The average of the isotopic discrimination for dark respiration  $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$  and  $^{17}\epsilon_{dark\_respi}$  were calculated over the nine night periods, and we obtained values of, respectively,  $-17.0 \pm 2.0$  ‰ and  $-8.5 \pm 0.8$  ‰. The average of  $\theta_{dark\_respi}$  during the experiment was equal to  $0.5124 \pm 0.0084$  (details in Table S6).

The dark respiration of this experiment includes respiration of both soil and leaves. Because soil respiration fractionation factor has been determined above, it is possible to estimate here the fractionation factor for the dark leaf respiration, and we consider that respiration rate during dark and light periods do not vary:

$$F_{dark\_respi} = F_{soil\_respi} + F_{dark\_leaf\_respi}, \quad (26)$$

$$^{18}\alpha_{dark\_respi} = f_{soil\_respi} \times ^{18}\alpha_{soil\_respi} + f_{dark\_leaf\_respi} \times ^{18}\alpha_{dark\_leaf\_respi}, \quad (27)$$

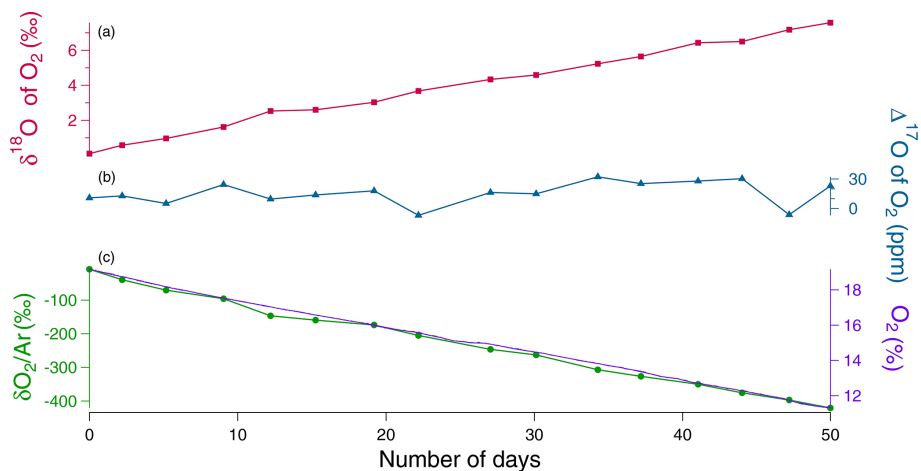
with  $F_{dark\_leaf\_respi}$  the flux of leaf respiration during the night,  $f_{soil\_respi}$  the fraction of soil respiration during night periods ( $F_{soil\_respi}/F_{dark\_respi}$ ), and  $f_{dark\_leaf\_respi}$  the fraction of dark leaf respiration during night periods ( $F_{dark\_leaf\_respi}/F_{dark\_respi}$ ).

$$^{18}\alpha_{dark\_leaf\_respi} = \frac{^{18}\alpha_{dark\_respi} - f_{soil\_respi} \times ^{18}\alpha_{soil\_respi}}{f_{dark\_leaf\_respi}} \quad (28)$$

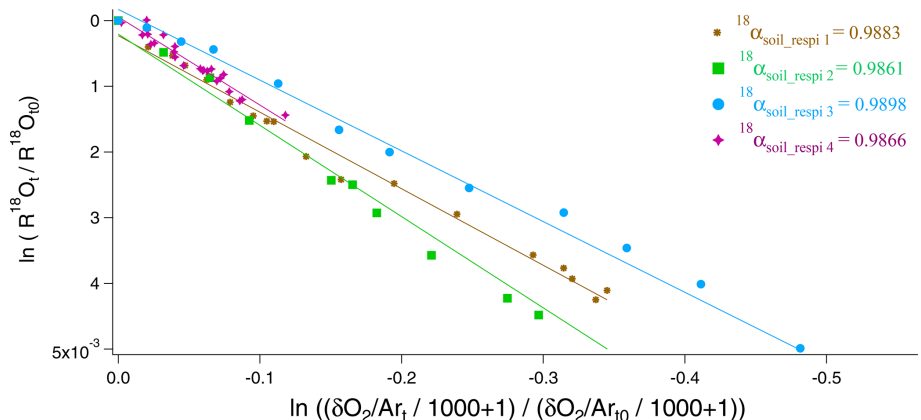
The isotopic discriminations  $^{18}\epsilon_{dark\_leaf\_respi}$  and  $^{17}\epsilon_{dark\_leaf\_respi}$  were, respectively, equal to  $-19.1 \pm 2.4$  ‰ and  $-9.7 \pm 0.9$  ‰. The average of  $\theta_{dark\_leaf\_respi}$  was equal to  $0.5089 \pm 0.0777$ . The standard deviations ( $1\sigma$ ) were calculated by a Monte Carlo method from the individual uncertainties of the  $^{18}\alpha_{dark\_respi}$ ,  $^{18}\alpha_{soil\_respi}$ ,  $F_{soil\_respi}$ , and  $F_{dark\_respi}$ .

###### Photosynthesis

In order to calculate an average value for the fractionation factor associated with photosynthesis from Eq. (19), we first calculated the averages of the flux of the O<sub>2</sub> consuming processes and of the fractionation factors associated with each



**Figure 2.** Evolution of the different concentrations and isotopic ratios in the sequence 2 of the soil respiration experiment (day 0 is the beginning of the sequence). **(a)**  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (red) variations. **(b)**  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (blue) variations. **(c)** Dioxygen concentration (purple) from the optical sensor and  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  variations (green) measured by IRMS.



**Figure 3.** Determination of  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  fractionation factors in the four respiration sequences.  $^{18}\alpha_{\text{soil\_respi } 1}$  (brown),  $^{18}\alpha_{\text{soil\_respi } 2}$  (green),  $^{18}\alpha_{\text{soil\_respi } 3}$  (blue), and  $^{18}\alpha_{\text{soil\_respi } 4}$  (purple) are, respectively, respiratory fractionation factors associated with sequences 1 to 4.

sequence:  $\langle F_{\text{total\_respi}} \rangle$  and  $\langle ^{18}\alpha_{\text{total\_respi}} \rangle$ . We also calculated the net  $\text{O}_2$  flux during light periods,  $aN = F_{\text{photosynthesis}} - F_{\text{total\_respi}}$ , as the linear regression,  $aN$ , of  $\frac{n(\text{O}_2)_t}{n(\text{O}_2)_{t0}}$  with time.  $a^{18}R$  is also obtained as a linear regression of  $^{18}R$  with time over each light period. Our data support our assumption that the regime was stationary over time and  $n(\text{O}_2)_t/n(\text{O}_2)_{t0}$  evolved linearly over time, which is why we were able to do linear regressions.

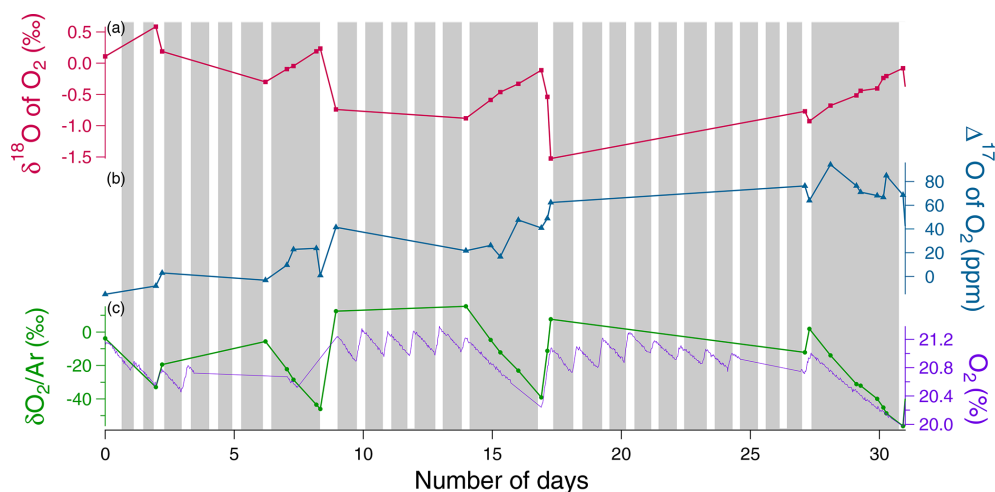
$$^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}} = \frac{a^{18}R + aN + \langle ^{18}\alpha_{\text{total\_respi}} \rangle \times \langle F_{\text{total\_respi}} \rangle}{^{18}R_{\text{lw}} \times F_{\text{photosynthesis}}} \quad (29)$$

The results of the eight individual  $\alpha_{\text{photosynthesis}}$  values are given in Table S10. The value of isotopic fractionation associated with the light period of period 1 of sequence 1 appeared clearly out of range. Following the Dixon’s outlier

detection test (Dixon, 1960), this value was considered an anomaly (likelihood > 99 %) and was removed from further analysis.

We finally estimated the values of  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  and  $^{17}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  as  $+3.7 \pm 1.3\text{‰}$  and  $+1.9 \pm 0.6\text{‰}$ , respectively. The average of  $\theta_{\text{photosynthesis}}$  was equal to  $0.5207 \pm 0.0537$ , a value which depends on the value taken for the  $\delta^{17}\text{O}$  value of atmospheric  $\text{O}_2$  vs. VSMOW (Sharp and Westbrock, 2021), see Table 2.

We performed different sensitivity tests (Sects. S1 and S2 in the Supplement). Sensitivity test 1 (Table S4) quantifies the influence of vanishing flux of dark leaf respiration during the day. This test shows that the assumption of similar flux of dark leaf respiration during the night, and light periods did not influence much the values of photosynthesis fractionation factors. It results in an additional uncertainty of 0.0006 and 0.0005 for the values of  $^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}}$  and  $^{17}\alpha_{\text{photosynthesis}}$ .



**Figure 4.** Example of the evolution of the different concentrations and isotopic ratios in the sequence 1 of photosynthesis and dark respiration experiment in the closed chamber over 31 d (day 0 is the beginning of the sequence). Grey rectangles correspond to night periods and white rectangles to light periods. (a)  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (red) variations. (b)  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  variations (blue). (c) Dioxygen concentration (purple) from the optical sensor and  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  variations (green) measured by IRMS.

**Table 2.** Summary of the mean values of the isotopic discriminations and  $\theta$  values for *Festuca arundinacea* of all sequences of (1) the soil respiration experiment and of (2) the respiration and photosynthesis experiment and the number of data on which they were calculated (\* is the value for  $\theta_{\text{photosynthesis}}$  that depends on the determination of the  $\delta^{17}\text{O}$  of atmospheric  $\text{O}_2$  vs.  $\delta^{17}\text{O}$  of VSMOW). We provide here the two different possible estimates using either 12.03‰ (Luz and Barkan, 2011) or 12.08‰ (Barkan and Luz, 2005): value determined with  $\delta^{17}\text{O} = 12.03\text{‰}$ /value determined with  $\delta^{17}\text{O} = 12.08\text{‰}$ .

| Isotopic discriminations and $\theta$ values of <i>Festuca arundinacea</i> | Average (‰)    | Standard deviation (‰) | No. of data |
|--|----------------|------------------------|-------------|
| $^{18}\epsilon_{\text{soil\_respi}}$                                       | -12.3          | 1.7                    | 4           |
| $^{17}\epsilon_{\text{soil\_respi}}$                                       | -6.4           | 0.9                    | 4           |
| $\theta_{\text{soil\_respi}}$  | 0.5164         | 0.0005                 | 4           |
| $^{18}\epsilon_{\text{dark\_respi}}$                                       | -17.0          | 2.0                    | 9           |
| $^{17}\epsilon_{\text{dark\_respi}}$                                       | -8.5           | 0.8                    | 9           |
| $\theta_{\text{dark\_respi}}$  | 0.5124         | 0.0084                 | 9           |
| $^{18}\epsilon_{\text{dark\_leaf\_respi}}$                                 | -19.1          | 2.4                    | 9           |
| $^{17}\epsilon_{\text{dark\_leaf\_respi}}$                                 | -9.7           | 0.9                    | 9           |
| $\theta_{\text{dark\_leaf\_respi}}$  | 0.5089         | 0.0777                 | 9           |
| $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$                                    | 3.7            | 1.3                    | 8           |
| $^{17}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$                                    | 1.9            | 0.6                    | 8           |
| $\theta_{\text{photosynthesis}}$   | 0.5207/0.5051* | 0.0537/0.0504*         | 8           |

Sensitivity tests 2 (Tables S7, S8 and S9) were performed on values of the  $\text{O}_2$  flux and associated fractionation factors for photorespiration and the Mehler reaction. They resulted in additional uncertainties of 0.0007 and 0.0005 for the values of  $^{18}\alpha_{\text{photosynthesis}}$  and  $^{17}\alpha_{\text{photosynthesis}}$  (Table S10).

Sensitivity tests 3 concerned the possible evolution of the isotopic composition of leaf water over the course of an experiment. The comparison of the  $\delta^{18}\text{O}$  of irrigation water and soil water at the end of the experiment shows a possible increase up to 2‰ (Table S3). We thus estimate that our values of leaf water  $\delta^{18}\text{O}$  measured at the end of the experiment may be overestimated by 1‰ compared to the mean value of

leaf water  $\delta^{18}\text{O}$  during the course of the experiment. Taking this possible effect into account would lead to a fractionation factor for photosynthesis higher by 1‰ compared to the presented one of  $3.7 \pm 1.3\text{‰}$ , hence a higher isotopic discrimination associated with photosynthesis.

Finally, we evaluated by a Monte Carlo calculation how the different uncertainties listed in the three sensitivity tests described above influence the final uncertainty on the photosynthesis isotopic discrimination. We found a final standard deviations ( $1\sigma$ ) equal to 0.3‰ for  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  and 0.15‰ for  $^{17}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$ .



## 4 Discussion

### 4.1 $\Delta^{17}\text{O}$ of $\text{O}_2$

The  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  is equal to 0 by definition for atmospheric air, and hence it should be equal to zero at the beginning of each experiment. The observed change during an experiment can only be driven by biological processes because the interaction with stratosphere is not possible in the closed chambers.

During the soil respiration experimental run, the  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  was constant. This directly reflects the  $\theta_{\text{soil\_respi}}$  value of  $0.5164 \pm 0.0005$  (Table 2) because  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  is defined with a slope of 0.516 between  $\ln(1 + \delta^{17}\text{O})$  and  $\ln(1 + \delta^{18}\text{O})$  (Eq. 1). This result is in good agreement and within the uncertainties given by Helman et al. (2005) with the  $\gamma$  value of 0.5174 (equivalent to a  $\theta$  of  $0.515 \pm 0.0003$ ) obtained with respiration experiments on several microorganisms.

During the experiment involving both oxygen uptake and photosynthesis, the  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  has a globally increasing trend with values reaching about 100 ppm after 1 month. Such behaviour is expected and was already observed by Luz et al. (1999), with  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  values reaching 150 ppm after a 200 d experiment within a closed terrarium. This increase cannot be explained by respiration because respiration does not modify  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ . It can be explained by photosynthesis producing oxygen with a  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  different from the atmospheric one. Previous analyses have shown that the  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{H}_2\text{O}$  of VSMOW (close to mean oceanic water) expressed vs. isotopic composition of atmospheric  $\text{O}_2$  has a value between 134 to 223 ppm (using a definition of  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{H}_2\text{O} = \ln(1 + \delta^{17}\text{O}) - 0.516 \times \ln(1 + \delta^{18}\text{O})$ ) (Sharp and Wostbrock, 2021). Within the water cycle, the slopes of  $\ln(1 + \delta^{17}\text{O})$  vs.  $\ln(1 + \delta^{18}\text{O})$  for the meteoric, evaporation, and evapotranspiration lines are larger than 0.516 (Meijer and Li, 1998 Landais et al., 2006) so that  $\Delta^{17}\text{O}$  of water consumed by the plants during photosynthesis should be slightly lower than the  $\Delta^{17}\text{O}$  of VSMOW expressed vs. isotopic composition of atmospheric  $\text{O}_2$  but still higher than the  $\Delta^{17}\text{O}$  of atmospheric  $\text{O}_2$ . Photosynthesis can thus explain the  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  increase in the closed chamber.

### 4.2 Fractionation factors associated with $\delta^{18}\text{O}$ of $\text{O}_2$ and implications for the Dole effect

The isotopic discrimination  $^{18}\epsilon_{\text{soil\_respi}} = -12.3 \pm 1.7\text{‰}$  for the soil respiration experiments is comparable to the average terrestrial soil respiration isotopic discrimination found by Angert et al. (2001) of  $-12\text{‰}$ . Still, among the diversity of soils studied by Angert et al. (2001), the soils showing the  $^{18}\epsilon$  values closest to our values are clay soil ( $^{18}\epsilon = -13\text{‰}$ ) and sandy soil ( $^{18}\epsilon = -11\text{‰}$ ). Soil respiration isotopic discriminations are less strong than isotopic discrimination due to dark respiration alone ( $-18\text{‰}$ , Bender et al., 1994). These lower values for soil respiration isotopic discrimination are

due to the roles of root diffusion in the soil (Angert et al., 2001). The soils studied by Angert et al. (2001) are, however, different from our soil, which was enriched in organic matter. Further experiments are then needed to understand the variability in  $^{18}\epsilon$  associated with soil respiration.

The isotopic discrimination for dark leaf respiration,  $^{18}\epsilon_{\text{dark\_leaf\_respi}} = -19.1 \pm 2.4\text{‰}$  is associated with a large uncertainty and would benefit from additional experiments with a higher sampling and measurement rate. Still, even if it was obtained on different organisms and experimental set-ups, this value is in agreement with the values for isotopic discrimination for dark respiration determined by Helman et al. (2005) on bacteria from the Lake Kinneret ( $^{18}\epsilon = -17.1\text{‰}$ ) and *Synechocystis* ( $^{18}\epsilon = -19.4\text{‰}$  and  $-19.5\text{‰}$ ) and Guy et al. (1989, 1992) on *Phaeodactylum tricornutum* and on terrestrial plants ( $-17\text{‰}$  to  $-19\text{‰}$  for COX respiration).

The average  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  is  $+3.7 \pm 1.3\text{‰}$  for *Festuca arundinacea* species, which goes against the classical assumption that terrestrial photosynthesis does not fractionate (Vinogradov et al., 1959; Guy et al., 1993; Helman et al., 2005; Luz and Barkan, 2005). Vinogradov explains that the low photosynthetic isotopic discrimination that can occur is due to contamination by atmospheric  $\text{O}_2$  or by respiration. Guy et al. (1993) corroborate this idea by finding a photosynthetic isotopic discrimination of  $0.3\text{‰}$  in cyanobacteria (*Anacystis nidulans*) and diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*) that they consider negligible. Luz and Barkan (2005) in their study on *Philodendron*, consider that there is no photosynthetic isotopic discrimination. Our value suggests that there is a terrestrial photosynthetic isotopic discrimination, and the value found for *Festuca arundinacea* is slightly smaller than the photosynthetic isotopic discrimination in the marine environment  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}} = +6\text{‰}$  found by Eisenstadt et al. (2010). More specifically, Eisenstadt et al. (2010) determined several photosynthetic isotopic discrimination values depending on the phytoplankton studied (*Phaeodactylum tricornutum*:  $4.5\text{‰}$ , *Nannochloropsis* sp.:  $3\text{‰}$ , *Emiliania huxleyi*:  $5.5\text{‰}$ , and *Chlamydomonas reinhardtii*:  $7\text{‰}$ ). One of the conclusions given by Eisenstadt et al. (2010) is that eukaryotic organisms enrich their produced oxygen more in  $^{18}\text{O}$  than the prokaryotic organisms. Our conclusion based on experiments performed with the *Festuca arundinacea* species is in agreement with these conclusions.

Our experiments were performed at the scale of the plants, which is different to previous studies performed at the scale of the chloroplast (e.g. Guy et al., 1993) where no evidence of oxygen fractionation has been found. We can thus not exclude that this fractionation attributed here to photosynthesis is due to oxygen-consuming processes not taken into account in our approach. Our main goal however is to interpret the global  $\delta^{18}\text{O}$  of atmospheric  $\text{O}_2$  using the fractionation observed at the scale of the plants. As a consequence, we believe that if there is a light-dependent oxygen fractionation process that we did not identify in our approach, it will also

be present at the global scale. It should thus be taken into account in our future interpretation of the Dole effect. We thus keep our estimate of the photosynthesis  $^{18}\text{O}$  discrimination described above but name it as an *effective* photosynthesis  $^{18}\text{O}$  discrimination at the scale of the plants because the details of the processes at play is not fully elucidated.

Finally, we should however note that we tested only one species. Additional experiments with different plants are needed to check if the positive effective fractionation factor should be applied for global Dole effect calculation. Still, this positive *effective*  $^{18}\text{O}$  discriminations during photosynthesis suggests that the terrestrial Dole effect may be higher than currently assumed and challenge the assumption that terrestrial and oceanic Dole effects have the same values (Luz and Barkan, 2011).

## 5 Conclusion

Using a simplified analogue of the terrestrial biosphere in a closed chamber, we found that the fractionation factors of soil respiration and dark leaf respiration at the biological chamber level agree with the previous estimates derived from studies at microorganism level. This is an important confirmatory step for the fractionation factors previously used to estimate the global Dole effect. More importantly, we document for the first time a significant *effective*  $^{18}\text{O}$  discrimination at the scale of the plant during terrestrial photosynthesis with the *Festuca arundinacea* species ( $+3.7 \pm 1.3\%$ ). If confirmed by future studies, this can have a substantial impact on the calculation of the Dole effect, with important consequences for our estimates of the past global primary production.

Our study showed the usefulness of closed chamber systems to quantify the fractionation factors associated with biological processes in the oxygen cycle at the plant level. The main limitation of our present study was the low sampling rate during our experiments which hampers the precision of the determined fractionation factors. Future work should use this validated set-up to multiply such experiments to improve the precision of fractionation factors and to explore the variability of fractionation factors for different plants and hence different metabolisms. A good application would be to study the difference between  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plants, because  $\text{C}_4$  plants do not photorespire.  $\text{C}_4$  plants, adapted to dry environments, have their own strategy and make very little photorespiration through specialised cells. This allows them to produce their own energy in an optimal way without the waste produced by photorespiration.

*Data availability.* All individual fractionation factors for each experiment are given in the Supplement.

*Supplement.* The supplement related to this article is available online at: <https://doi.org/10.5194/bg-20-1047-2023-supplement>.

*Author contributions.* AL and CPi designed the project. CPi, JS, and SD carried out experiments at ECOTRON of Montpellier and FP, CPa, RJ, AD, and OJ at LSCE. CPa, NP, and AL analysed the data. CPa and AL prepared the paper with contributions from NP, CPi, JS, and AM.

*Competing interests.* The contact author has declared that none of the authors has any competing interests.

*Disclaimer.* Publisher's note: Copernicus Publications remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

*Acknowledgements.* The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Union H2020 Programme (H2020/20192024)/ERC grant agreement no. 817493 (ERC ICORDA) and ANR HUM117. The authors acknowledge the scientific and technical support of PANOPLY (Plateforme ANalytique géOsciences Paris-sacLaY), Paris-Saclay University, France. This study benefited from the CNRS resources allocated to the French ECOTRONS Research Infrastructure, from the Occitanie Region and FEDER investments as well as from the state allocation "Investissement d'Avenir" AnaEE-France ANR-11-INBS-0001. We would also like to thank Abdelaziz Faez and Olivier Ravel from ECOTRON of Montpellier for their help, Anne Alexandre from CEREGE at Aix-en-Provence and Emeritus Prof. Phil Ineson from University of York.

*Financial support.* This research has been supported by the H2020 European Research Council (grant no. 817493).

*Review statement.* This paper was edited by Aninda Mazumdar and reviewed by two anonymous referees.

## References

- Alexandre, A., Landais, A., Vallet-Coulomb, C., Piel, C., Devidal, S., Pauchet, S., Sonzogni, C., Couapel, M., Pasturel, M., Cornuault, P., Xin, J., Mazur, J.-C., Prié, F., Bentaleb, I., Webb, E., Chalié, F., and Roy, J.: The triple oxygen isotope composition of phytoliths as a proxy of continental atmospheric humidity: insights from climate chamber and climate transect calibrations, *Biogeosciences*, 15, 3223–3241, <https://doi.org/10.5194/bg-15-3223-2018>, 2018.

- Angert, A., Luz, B., and Yakir, D.: Fractionation of oxygen isotopes by respiration and diffusion in soils and its implications for the isotopic composition of atmospheric O<sub>2</sub>, *Global Biogeochem. Cy.*, 15, 871–880, <https://doi.org/10.1029/2000GB001371>, 2001.
- Angert, A., Barkan, E., Barnett, B., Brugnoli, E., Davidson, E. A., Fessenden, J., Maneepong, S., Panapitukkul, N., Randerson, J. T., Savage, K., Yakir, D., and Luz, B.: Contribution of soil respiration in tropical, temperate, and boreal forests to the <sup>18</sup>O enrichment of atmospheric O<sub>2</sub>, *Global Biogeochem. Cy.*, 17, 1089, <https://doi.org/10.1029/2003GB002056>, 2003.
- Barkan, E. and Luz, B.: High precision measurements of <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O of O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>/Ar ratio in air, *Rapid Commun. Mass Sp.*, 17, 2809–2814, <https://doi.org/10.1002/rcm.1267>, 2003.
- Barkan, E. and Luz, B.: High precision measurements of <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O ratios in H<sub>2</sub>O, *Rapid Commun. Mass Sp.*, 19, 3737–3742, <https://doi.org/10.1002/rcm.2250>, 2005.
- Bauwe, H., Hagemann, M., and Fernie, A. R.: Photorespiration: players, partners and origin, *Trends Plant Sci.*, 6, 330–336, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.006>, 2010.
- Bendall, D. S. and Bonner Jr., W. D.: Cyanide-insensitive Respiration in Plant Mitochondria, *Plant Physiol.*, 47, 236–245, <https://doi.org/10.1104/pp.47.2.236>, 1971.
- Bender, M., Sowers, T., Dickson, M.-L., Orchardo, J., Grootes, P., Mayewski, P. A., and Meese, D. A.: Climate correlations between Greenland and Antarctica during the past 100,000 years, *Nature*, 372, 663–666, <https://doi.org/10.1038/372663a0>, 1994.
- Blunier, T., Barnett, B., Bender, M. L., and Hendricks, M. B.: Biological oxygen productivity during the last 60,000 years from triple oxygen isotope measurements, *Global Biogeochem. Cy.*, 16, 3–4, <https://doi.org/10.1029/2001GB001460>, 2002.
- Blunier, T., Bender, M. L., Barnett, B., and von Fischer, J. C.: Planetary fertility during the past 400 ka based on the triple isotope composition of O<sub>2</sub> in trapped gases from the Vostok ice core, *Clim. Past*, 8, 1509–1526, <https://doi.org/10.5194/cp-8-1509-2012>, 2012.
- Brandon, M., Landais, A., Duchamp-Alphonse, S., Favre, V., Schmitz, L., Abrial, H., Prié, F., Extier, T., and Blunier, T.: Exceptionally high biosphere productivity at the beginning of Marine Isotopic Stage 11, *Nat. Commun.*, 11, 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15739-2>, 2020.
- Dansgaard, W.: Stable isotopes in precipitation, *Tellus*, 16, 436–468, 1974.
- Dixon, W. J.: Simplified estimation from censored normal sample, *Ann. Math. Stat.*, 21, 488–506, <https://doi.org/10.1214/aoms/1177705900>, 1960.
- Dole, M.: The Relative Atomic Weight of Oxygen in Water and in Air A Discussion of the Atmospheric Distribution of the Oxygen Isotopes and of the Chemical Standard of Atomic Weights, *J. Chem. Phys.*, 4, 268, <https://doi.org/10.1063/1.1749834>, 1936.
- Dole, M. and Jenks, G.: Isotopic composition of photosynthetic oxygen, *Science*, 100, 409, <https://doi.org/10.1126/science.100.2601.409>, 1944.
- Dongman, G., Nürnberg, H. W., Förstel, H., and Wagoner, K.: On the enrichment of H<sub>2</sub><sup>18</sup>O in the leaves of transpiring plants, *Radiat. Environ. Bioph.*, 11, 41–52, <https://doi.org/10.1007/BF01323099>, 1974.
- Dreyfus, G. B., Parrenin, F., Lemieux-Dudon, B., Durand, G., Masson-Delmotte, V., Jouzel, J., Barnola, J.-M., Panno, L., Spahni, R., Tisserand, A., Siegenthaler, U., and Leuenberger, M.: Anomalous flow below 2700 m in the EPICA Dome C ice core detected using  $\delta^{18}\text{O}$  of atmospheric oxygen measurements, *Clim. Past*, 3, 341–353, <https://doi.org/10.5194/cp-3-341-2007>, 2007.
- Eisenstadt, D., Barkan, E., Luz, B., and Kaplan, A.: Enrichment of oxygen heavy isotopes during photosynthesis in phytoplankton, *Photosynth. Res.*, 103, 97–103, <https://doi.org/10.1007/s1120-009-9518-z>, 2010.
- Extier, T., Landais, A., Bréant, C., Prié, F., Bazin, L., Dreyfus, G., Roche, D. M., and Leuenberger, M.: On the use of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  for ice core dating, *Quaternary Sci. Rev.*, 185, 244–257, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.02.008>, 2018.
- Guy, R. D., Berry, J. A., Fogel, M. L., and Hoering, T. C.: Differential fractionation of oxygen isotopes by cyanide-resistant and cyanide sensitive respiration in plants, *Planta*, 177, 483–491, <https://doi.org/10.1007/BF00392616>, 1989.
- Guy, R. D., Berry, J. A., Fogel, M. L., Turpin, D. H., and Weger, H. G.: Fractionation of the stable isotopes of oxygen during respiration by plants: The basis of a new technique to estimate partitioning to the alternative path, *Plant Respiration. Molecular, Biochemical and Physiological Aspects*, SPB Academic Publishing, The Hague, the Netherlands, 443–453, 1992.
- Guy, R. D., Fogel, M. L., and Berry, J. A.: Photosynthetic fractionation of the stable isotopes of oxygen and carbon, *Plant Physiol.*, 101, 37–47, <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.37>, 1993.
- Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B., and Kaplan, A.: Fractionation of the three stable oxygen isotopes by oxygen-producing and oxygen-consuming reactions in photosynthetic organisms, *Plant Physiol.*, 138, 2292–2298, <https://doi.org/10.1104/pp.105.063768>, 2005.
- Hillaire-Marcel, C., Kim, S.-T., Landais, A., Ghosh, P., Assonov, S., Lécuyer, C., Blanchard, M., Meijer, H. A. J., and Steen-Larsen, H.: A stable isotope toolbox for water and inorganic carbon cycle studies, *Nat. Rev. Earth Environ.*, 2, 699–719, <https://doi.org/10.1038/s43017-021-00209-0>, 2021.
- Hoffmann, G., Cuntz, M., Weber, C., Ciais, P., Friedlingstein, P., Heimann, M., Jouzel, J., Kaduk, J., Maier Reimer, E., Seibt, U., and Six, K.: A model of the Earth's Dole effect, *Global Biogeochem. Cy.*, 18, 1–15, <https://doi.org/10.1029/2003GB002059>, 2004.
- Keenan, T. F., Migliavacca, M., Papale, D., Baldocchi, D., Reichstein, M., Torn, M., and Wutzler, T.: Widespread inhibition of daytime ecosystem respiration, *Nat. Ecol. Evol.*, 3, 407–415, <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0809-2>, 2019.
- Landais, A., Barkan, E., Yakir, D., and Luz, B.: The triple isotopic composition of oxygen in leaf water, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 70, 4105–4115, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.06.1545>, 2006.
- Landais, A., Lathiere, J., Barkan, E., and Luz, B.: Reconsidering the change in global biosphere productivity between the Last Glacial Maximum and present day from the triple oxygen isotopic composition of air trapped in ice cores, *Global Biogeochem. Cy.*, 21, GB1025, <https://doi.org/10.1029/2006GB002739>, 2007.
- Landais, A., Dreyfus, G., Capron, E., Masson-Delmotte, V., Sanchez-Goni, M. F., Desprat, S., Hoffmann, G., Jouzel, J., Leuenberger, M., and Johnsen, S.: What drives the orbital and millennial variations of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ?, *Quaternary Sci. Rev.*, 29, 235–246, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.07.005>, 2010.

- Luz, B. and Barkan, E.: The isotopic ratios  $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  in molecular oxygen and their significance in biogeochemistry, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 69, 1099–1110, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.09.001>, 2005.
- Luz, B. and Barkan, E.: The isotopic composition of atmospheric oxygen, *Global Biogeochem. Cy.*, 25, GB3001, <https://doi.org/10.1029/2010GB003883>, 2011.
- Luz, B., Barkan, E., Bender, M. L., Thiemens, M. H., and Boering, K. A.: Triple-isotope composition of atmospheric oxygen as a tracer of biosphere productivity, *Nature*, 400, 547–550, <https://doi.org/10.1038/22987>, 1999.
- Malaizé, B., Paillard, D., Jouzel, J., and Raynaud, D.: The Dole effect over the Last two glacial-interglacial cycles, *J. Geophys. Res.*, 104, 14199–14208, <https://doi.org/10.1029/1999JD900116>, 1999.
- Mehler, A.: Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 65–77, 1951.
- Meijer, H. A. J. and Li, W. J.: The use of electrolysis for accurate  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  Isotope Measurements in Water, *Isot. Environ. Healt. S.*, 34, 349–369, <https://doi.org/10.1080/10256019808234072>, 1998.
- Milcu, A., Allan, E., Roscher, C., Jenkins, T., Meyer, S. T., Flynn, D., Bessler, H., Buscot, F., Engels, C., Gubsch, M., König, S., Lipowsky, A., Loranger, J., Renker, C., Scherber, C., Schmid, B., Thébaud, E., Wubet, T., Weisser, W. W., Scheu, S., and Eisenhauer, N.: Functionally and phylogenetically diverse plant communities key to soil biota, *Ecology*, 94, 1878–1885, <https://doi.org/10.1890/12-1936.1>, 2013.
- Pack, A., Höweling, A., Hezel, D. C., Stefanak, M. T., Beck, A.-K., Peters, S. T. M., Sengupta, S., Herwartz, D., and Folco, L.: Tracing the oxygen isotope composition of the upper Earth's atmosphere using cosmic spherules, *Nat. Commun.*, 8, 1502, <https://doi.org/10.1038/ncomms15702>, 2017.
- Reutenauer, C., Landais, A., Blunier, T., Bréant, C., Kageyama, M., Woillez, M.-N., Risi, C., Mariotti, V., and Braconnot, P.: Quantifying molecular oxygen isotope variations during a Heinrich stadial, *Clim. Past*, 11, 1527–1551, <https://doi.org/10.5194/cp-11-1527-2015>, 2015.
- Ribas-Carbo, M., Berry, J. A., Yakir, D., Giles, L., Robinson, S. A., Lennon, A. M., and Siedow, J. N.: Electron Partitioning between the Cytochrome and Alternative Pathways in Plant Mitochondria, *Plant Physiol.*, 109, 829–837, <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.829>, 1995.
- Seltzer, A. M., Severinghaus, J. P., Andraski, B. J., and Stonestrom, D. A.: Steady state fractionation of heavy noble gas isotopes in a deep unsaturated zone, *Water Resour. Res.*, 53, 2716–2732, <https://doi.org/10.1002/2016WR019655>, 2017.
- Severinghaus, J. P., Beaudette, R., Headly, M. A., Taylor, K., and Brook, E. J.: Oxygen-18 of  $\text{O}_2$  records the impact of abrupt climate change on the terrestrial biosphere, *Science*, 324, 1431–1434, <https://doi.org/10.1126/science.1169473>, 2009.
- Shackleton, N. J.: The 100,000-Year Ice-Age Cycle Identified and Found to Lag Temperature, Carbon Dioxide, and Orbital Eccentricity, *Science*, 289, 1897–1902, <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1897>, 2000.
- Sharkey, T. D., Badger, M. R., von Caemmerer, S., and Andrews, T. J.: High Temperature Inhibition of Photosynthesis Requires Rubisco Activase for Reversibility, *Trends Plant Sci.*, 2465–2468, [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3953-3\\_577](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3953-3_577), 1998.
- Sharp, Z. D. and Wostbrock, J. A. G.: Standardization for the Triple Oxygen Isotope System: Waters, Silicates, Carbonates, Air, and Sulfates, *Rev. Mineral. Geochem.*, 86, 179–196, <https://doi.org/10.2138/rmg.2021.86.05>, 2021.
- Stevens, C. L. R., Schultz, D., Van Baalen, C., and Parker, P. L.: Oxygen isotope fractionation during photosynthesis in a blue-green and a green alga, *Plant Physiol.*, 56, 126–129, <https://doi.org/10.1104/pp.56.1.126>, 1975.
- Stolper, D. A., Fischer, W. W., and Bender, M. L.: Effects of temperature and carbon source on the isotopic fractionations associated with  $\text{O}_2$  respiration for  $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  ratios in *E. coli*, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 240, 152–172, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.07.039>, 2018.
- Tcherkez, G. and Farquhar, G. D.: On the  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  isotope effect associated with photosynthetic  $\text{O}_2$  production, *Funct. Plant Biol.*, 34, 1049–1052, <https://doi.org/10.1071/FP07168>, 2007.
- Tcherkez, G., Gauthier, P., Buckley, T. N., Bush, F. A., Barbour, M. M., Bruhn, D., Heskell, M. A., Gong, X. Y., Crous, K. Y., Griffin, K., Way, D., Turnbull, M., Adams, M. A., Atkin, O. K., Farquhar, G. D., and Cornic, G.: Leaf day respiration: low  $\text{CO}_2$  flux but high significance for metabolism and carbon balance, *New Phytol.*, 216, 986–1001, <https://doi.org/10.1111/nph.14816>, 2017.
- Vinogradov, A. P., Kuturyn, V. M., and Zadorozhnyi, I. K.: Isotope fractionation of atmospheric oxygen, *Geochem. Int.*, 3, 241–253, 1959.
- Wang, Y., Cheng, H., Lawrence Edwards, R., Kong, X., Shao, X., Chen, S., Wu, J., Jiang, X., Wang, X., and An, Z.: Millennial- and orbital-scale changes in the East Asian monsoon over the past 224,000 years, *Nature*, 451, 1090–1093, <https://doi.org/10.1038/nature06692>, 2008.
- Wostbrock, A. G. J. and Sharp, Z. D.: Triple Oxygen Isotopes in Silica–Water and Carbonate–Water Systems, *Rev. Mineral. Geochem.*, 86, 367–400, <https://doi.org/10.2138/rmg.2021.86.11>, 2021.
- Yeung, L. Y., Hayles, J. A., Hu, H., Ash, J. L., and Sun, T.: Scale distortion from pressure baselines as a source of inaccuracy in triple-isotope measurements, *Rapid Commun. Mass Sp.*, 32, 1811–1821, <https://doi.org/10.1002/rcm.8247>, 2018.



*Supplement of*

**Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation–soil–atmosphere analogue of the terrestrial biosphere in closed chambers**

Clémence Paul et al.

*Correspondence to:* Clémence Paul (clemence.paul@lsce.ipsl.fr)

The copyright of individual parts of the supplement might differ from the article licence.

Table S1. Succession of dark and light periods for the different sequences of the photosynthesis and dark respiration experiment.

| Sequence | Light | Start date      | End date        |
|----------|-------|-----------------|-----------------|
| 1        | On    | 19/03/19, 08:00 | 25/03/19, 14:00 |
|          | Off   | 25/03/19, 14:00 | 28/03/19, 17:05 |
|          | On    | 28/03/19, 17:05 | 02/04/19, 08:00 |
|          | Off   | 02/04/19, 08:00 | 05/04/19, 06:50 |
|          | On    | 05/04/19, 06:50 | 16/04/19, 15:30 |
|          | Off   | 16/04/19, 15:30 | 19/04/19, 06:50 |
|          | On    | 19/04/19, 06:50 | 06/05/19, 14:00 |
|          | Off   | 06/05/19, 14:00 | 14/05/19, 14:20 |
|          | On    | 14/05/19, 14:20 | 15/05/19, 14:00 |
| 2        | On    | 20/05/19, 06:00 | 28/05/19, 13:00 |
|          | Off   | 28/05/19, 13:00 | 30/05/19, 20:35 |
|          | On    | 30/05/19, 20:35 | 10/06/19, 11:00 |
|          | Off   | 10/06/19, 11:00 | 14/06/19, 15:25 |
|          | On    | 14/06/19, 15:25 | 23/06/19, 14:30 |
|          | Off   | 23/06/19, 14:30 | 27/06/19, 05:25 |
|          | On    | 27/06/19, 05:25 | 28/06/19, 08:35 |
| 3        | On    | 29/07/19, 07:00 | 05/08/19, 14:00 |
|          | Off   | 05/08/19, 14:00 | 08/08/19, 05:20 |
|          | On    | 08/08/19, 05:20 | 19/08/19, 13:00 |
|          | Off   | 19/08/19, 13:00 | 22/08/19, 05:25 |
|          | On    | 22/08/19, 05:25 | 02/09/19, 13:00 |
|          | Off   | 02/09/19, 13:00 | 05/09/19, 05:15 |
|          | On    | 05/09/19, 05:15 | 06/09/19, 08:30 |

Table S2. Evolution of isotopic and elementary composition of O<sub>2</sub> for the empty chamber test (starting 21 October 2020).

| Date             | $\delta^{18}\text{O}$ of O <sub>2</sub> (‰) | $\Delta\text{O}_2/\text{N}_2$ (‰) |
|------------------|---|-----------------------------------|
| 21 October 2020  | -0.055                                      | -3.075                            |
| 29 October 2020  | -0.046                                      | -3.628                            |
| 06 November 2020 | -0.051                                      | -6.218                            |
| 17 November 2020 | -0.064                                      | -8.8                              |

Table S3. Oxygen isotopic ratios for leaf water (lw), irrigation water (iw) and soil water (sw) at the beginning (t0) and end of the sequence (tf) of the photosynthesis and dark respiration experiment. The  $^{17}R$  values are calculated here with a value of 12.03 ‰ (Luz and Barkan, 2011) for determination of the  $\delta^{17}O$  of atmospheric  $O_2$  vs  $\delta^{17}O$  of VSMOW.

| Sequence | $^{18}R_{lw}$ | $^{17}R_{lw}$ | $^{18}R_{iw,t0}$ | $^{17}R_{iw,t0}$ | $^{18}R_{sw,tf}$ | $^{17}R_{sw,tf}$ |
|----------|---------------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1        | 0.9802        | 0.9899        | 0.9712           | 0.9852           | 0.9723           | 0.9858           |
| 2        | 0.9776        | 0.9885        | 0.9712           | 0.9852           | 0.9722           | 0.9857           |
| 3        | 0.9763        | 0.9878        | 0.9712           | 0.9852           | 0.9726           | 0.9859           |

## Section S1: Sensitivity tests to the flux of dark leaf respiration during the day

The rate of autotrophic respiration (dark leaf respiration) is expected to be lower during light periods than during dark periods (Tcherkez et al., 2017) which was not considered in the main text. These sensitivity tests hence aim at quantifying how the value of  $\alpha_{photosynthesis}$  is affected when  $F_{dark\_respi}$  changes from a maximum value ( $F_{dark\_respi}$  during dark period) to an extreme minimum value ( $F_{soil\_respi}$  during dark period, hence no dark leaf respiration during the light period) and when  $\alpha_{dark\_respi}$  changes from the global value  $\alpha_{dark\_respi}$  including leaf and soil respiration as during dark period to the value  $\alpha_{soil\_respi}$  measured during dark period. We test as well the combined effect of modification of both  $F_{dark\_respi}$  and  $\alpha_{dark\_respi}$ . The results from these sensitivity tests (Table S4) show variations in  $\alpha_{photosynthesis}$  within a range which is smaller than the analytical uncertainty range found for our initial determination of  $\alpha_{photosynthesis}$ . In particular, we found that when we modify both  $F_{dark\_respi}$  and  $\alpha_{dark\_respi}$  to consider the extreme situation with only soil respiration, the mean value of  $^{18}\alpha_{photosynthesis}$  is unchanged.

Table S4.  $\alpha_{photosynthesis}$  values obtained from sensitivity tests with respect to different flux and fractionation factors associated with dark respiration during the day. Subscript 0: fractionation factor and flux for dark respiration during the day are the same as those determined during the night (case described in the main text). Subscript 1: flux of dark respiration during the day is taken equal to the flux of soil respiration (no flux of dark leaf respiration), fractionation factor for dark respiration during the day is the same as during the night. Subscript 2: flux of dark respiration during the day is the same as during the night, fractionation factor for dark respiration during the day is equal to  $\alpha_{soil\_respi}$ . Subscript 3: flux of dark respiration during the day is taken equal to the flux of soil respiration, fractionation factor for dark respiration during the day is equal to  $\alpha_{soil\_respi}$ .  $\mu$  is the average over all lines above of the different quantities and  $\sigma$  the associated standard deviation.

| Sequence | Period | $^{18}\alpha_{photosynthesis,0}$ | $^{18}\alpha_{photosynthesis,1}$ | $^{18}\alpha_{photosynthesis,2}$ | $^{18}\alpha_{photosynthesis,3}$ | $^{17}\alpha_{photosynthesis,0}$ | $^{17}\alpha_{photosynthesis,1}$ | $^{17}\alpha_{photosynthesis,2}$ | $^{17}\alpha_{photosynthesis,3}$ |
|----------|--------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1        | 1      | 0.9947                           | 0.9931                           | 0.9948                           | 0.9933                           | 0.9972                           | 0.9964                           | 0.9972                           | 0.9965                           |
|          | 2      | 1.0038                           | 1.0038                           | 1.0039                           | 1.0038                           | 1.0019                           | 1.0019                           | 1.0020                           | 1.0019                           |
|          | 3      | 1.0037                           | 1.0036                           | 1.0038                           | 1.0036                           | 1.0016                           | 1.0016                           | 1.0017                           | 1.0016                           |
| 2        | 1      | 1.0023                           | 1.0023                           | 1.0033                           | 1.0023                           | 1.0024                           | 1.0011                           | 1.0017                           | 1.0012                           |
|          | 2      | 1.0043                           | 1.0046                           | 1.0051                           | 1.0046                           | 1.0043                           | 1.0020                           | 1.0023                           | 1.0021                           |
| 3        | 1      | 1.0039                           | 1.0032                           | 1.0047                           | 1.0039                           | 1.0020                           | 1.0017                           | 1.0024                           | 1.0018                           |
|          | 2      | 1.0024                           | 1.0010                           | 1.0033                           | 1.0021                           | 1.0014                           | 1.0008                           | 1.0019                           | 1.0010                           |
|          | 3      | 1.0060                           | 1.0059                           | 1.0074                           | 1.0068                           | 1.0032                           | 1.0031                           | 1.0038                           | 1.0034                           |
| $\mu$    |        | 1.0026                           | 1.0022                           | 1.0033                           | 1.0026                           | 1.0018                           | 1.0011                           | 1.0016                           | 1.0012                           |
| $\sigma$ |        | 0.0034                           | 0.0039                           | 0.0037                           | 0.0040                           | 0.0021                           | 0.0020                           | 0.0019                           | 0.0020                           |



Table S5. Complete data set of the different fractionation factors ( $^{18}\alpha_{soil\_respi}$ ) and ( $^{17}\alpha_{soil\_respi}$ ) and isotopic discriminations ( $^{18}\epsilon_{soil\_respi}$  and  $^{17}\epsilon_{soil\_respi}$ ) of dioxygen and respiratory fluxes during soil respiration experiment.  $\mu$  is the average over all lines above for the different quantities and  $\sigma$  the associated standard deviation.

| Sequence | $^{18}\alpha_{soil\_respi}$ | $^{18}\epsilon_{soil\_respi}$ (‰) | $^{17}\alpha_{soil\_respi}$ | $^{17}\epsilon_{soil\_respi}$ (‰) | $\theta_{soil\_respi}$ | O <sub>2</sub> consumed (mmolO <sub>2</sub> /day) |
|----------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------|---|
| 1        | 0.9883                      | -11.7                             | 0.9940                      | -6.0                              | 0.5170                 | 2.81  |
| 2        | 0.9861                      | -13.9                             | 0.9928                      | -7.2                              | 0.5157                 | 11.78   |
| 3        | 0.9898                      | -10.2                             | 0.9947                      | -5.3                              | 0.5163                 | 8.92  |
| 4        | 0.9866                      | -13.4                             | 0.9930                      | -6.9                              | 0.5165                 | 6.59  |
| $\mu$    | 0.9877                      | -12.3                             | 0.9936                      | -6.4                              | 0.5164                 | 7.52  |
| $\sigma$ | 0.0017                      | 1.7                               | 0.0009                      | 0.9                               | 0.0005                 | 3.79  |

Table S6. Complete data set of the different fractionation factors ( $^{18}\alpha_{dark\_respi}$ ) and ( $^{17}\alpha_{dark\_respi}$ ) of dioxygen during dark periods of the photosynthesis and respiration experiment.  $\mu$  is the average over all lines above for the different quantities and  $\sigma$  the associated standard deviation. The missing data are due to a problem during measurements.

| Sequence | Period | $^{18}\alpha_{dark\_respi}$ | $^{17}\alpha_{dark\_respi}$ | $\theta_{dark\_respi}$ | O <sub>2</sub> consumed (mmolO <sub>2</sub> /day) |
|----------|--------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| 1        | 1      | 0.9846                      | 0.9921                      | 0.5105                 | 21.77   |
|          | 2      | 0.9844                      | 0.9921                      | 0.5045                 | 21.46   |
|          | 3      | 0.9848                      | 0.9922                      | 0.5084                 | 18.57   |
|          | 4      | 0.9841                      | 0.9917                      | 0.5224                 | 14.98   |
| 2        | 1      | 0.9822                      | 0.9909                      | 0.5077                 | 36.61   |
|          | 2      | 0.9794                      |                             |                        | 25.93   |
|          | 3      | 0.9825                      | 0.9909                      | 0.5183                 | 31.03   |
| 3        | 1      | 0.9821                      | 0.9911                      | 0.4977                 | 26.17   |
|          | 2      | 0.9803                      | 0.9897                      | 0.5238                 | 26.15   |
|          | 3      | 0.9853                      | 0.9924                      | 0.5141                 | 31.65   |
| $\mu$    |        | 0.9830                      | 0.9914                      | 0.5124                 | 25.43   |
| $\sigma$ |        | 0.0020                      | 0.0008                      | 0.0084                 | 6.51  |

Section S2: Sensitivity tests to the fractions and fractionation factors of the different biological dioxygen uptakes

We quantify how much the uncertainties in the fractions of the biological process (dark respiration, photorespiration and the Mehler reaction) could affect the values of dark respiratory and photosynthetic fractionation factors determined in our study (Tables S7, S8 and S9). For this, we start from the values given by Landais et al. (2007):  $f_{dark\_respi}$  (0.6),  $f_{photorespi}$  (0.3) and  $f_{Mehler}$  (0.1) and varied the fractions as indicated in Table S5 (tests 0, 1 and 2).

In addition, we did other tests for uncertainties in the values of the fractionation factor of photorespiration given by Helman et al. (2005) (test 3 in grey columns of Tables S5, S6 and S7). The initial values for photorespiration isotopic discrimination are respectively - 21.3 ‰ and - 11.07 ‰ for  $^{18}\epsilon_{photo\_respi}$  and  $^{17}\epsilon_{photo\_respi}$  as given by Helman et al. (2005). From uncertainties on these values of 0.5 ‰ and 0.3 ‰ for  $^{18}\epsilon_{photo\_respi}$  and  $^{17}\epsilon_{photo\_respi}$  (Helman et al., 2005), we used alternative values of -20.8 ‰ and -11.04 ‰ for  $^{18}\epsilon_{photo\_respi}$  and  $^{17}\epsilon_{photo\_respi}$ . For the Mehler reaction we also chose the value proposed by Helman et al. (2005):  $^{18}\epsilon_{Mehler} = - 10.8$  ‰ and  $^{17}\epsilon_{Mehler} = - 5.7$  ‰. We also tested the uncertainty in the fractionation factors of the Mehler reaction (test 4) as given by Guy et al. (1993):  $^{18}\epsilon_{Mehler} = - 15.3$  ‰ and  $^{17}\epsilon_{Mehler} = - 7.98$  ‰.

Table S7. Details of input parameters for sensitivity tests. White columns detail the tests on the fractions of oxygen consumption; grey columns detail the test on the values of isotopic discrimination.

|                                | Test 0 | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Test 4 |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $f_{dark\_respi}$              | 1      | 0.9    | 0.4    | 0.6    | 0.6    |
| $f_{photo\_respi}$             | 0      | 0      | 0.5    | 0.3    | 0.3    |
| $f_{Mehler}$                   | 0      | 0.1    | 0.1    | 0.1    | 0.1    |
| $^{18}\epsilon_{photo\_respi}$ | -21.3  | -21.3  | -21.3  | -20.8  | -20.8  |
| $^{17}\epsilon_{photo\_respi}$ | -11.07 | -11.07 | -11.07 | -11.04 | -11.04 |
| $^{18}\epsilon_{Mehler}$       | -10.8  | -10.8  | -10.8  | -10.8  | -15.3  |
| $^{17}\epsilon_{Mehler}$       | -5.7   | -5.7   | -5.7   | -5.7   | -7.9   |

Table S8.  $\alpha_{total\_respi}$  values obtained from the sensitivity tests: results of sensitivity tests on dioxygen consumption fractions (white columns) and on uncertainties in fractionation factor values (grey columns).  $\mu$  is the average over all lines above of the different quantities and  $\sigma$  the associated standard deviation. The missing data are due to a problem during measurements.

| Sequence | Period | $^{18}\alpha_{total\_res}$<br>Test 0 | $^{18}\alpha_{total\_res}$<br>Test 1 | $^{18}\alpha_{total\_res}$<br>Test 2 | $^{18}\alpha_{total\_res}$<br>Test 3 | $^{18}\alpha_{total\_res}$<br>Test 4 | $^{17}\alpha_{total\_res}$<br>Test 0 | $^{17}\alpha_{total\_res}$<br>Test 1 | $^{17}\alpha_{total\_res}$<br>Test 2 | $^{17}\alpha_{total\_res}$<br>Test 3 | $^{17}\alpha_{total\_res}$<br>Test 4 |
|----------|--------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1        | 1      | 0.9868                               | 0.9870                               | 0.9830                               | 0.9847                               | 0.9841                               | 0.9933                               | 0.9934                               | 0.9912                               | 0.9921                               | 0.9932                               |
|          | 2      | 0.9865                               | 0.9868                               | 0.9829                               | 0.9846                               | 0.9840                               | 0.9933                               | 0.9934                               | 0.9912                               | 0.9921                               | 0.9932                               |
|          | 3      | 0.9871                               | 0.9873                               | 0.9831                               | 0.9849                               | 0.9843                               | 0.9935                               | 0.9936                               | 0.9913                               | 0.9922                               | 0.9934                               |
|          | 4      | 0.9859                               | 0.9862                               | 0.9826                               | 0.9842                               | 0.9836                               | 0.9926                               | 0.9927                               | 0.9909                               | 0.9917                               | 0.9925                               |
| 2        | 1      | 0.9828                               | 0.9835                               | 0.9814                               | 0.9824                               | 0.9818                               | 0.9913                               | 0.9916                               | 0.9904                               | 0.9909                               | 0.9906                               |
|          | 2      | 0.9781                               | 0.9792                               | 0.9795                               | 0.9795                               | 0.9789                               |                                      |                                      |                                      |                                      |                                      |
|          | 3      | 0.9834                               | 0.9839                               | 0.9816                               | 0.9827                               | 0.9820                               | 0.9913                               | 0.9916                               | 0.9904                               | 0.9909                               | 0.9907                               |
| 3        | 1      | 0.9827                               | 0.9833                               | 0.9813                               | 0.9822                               | 0.9908                               | 0.9916                               | 0.9919                               | 0.9908                               | 0.9911                               | 1.0020                               |
|          | 2      | 0.9797                               | 0.9806                               | 0.9801                               | 0.9805                               | 0.9894                               | 0.9892                               | 0.9897                               | 0.9898                               | 0.9897                               | 1.0014                               |
|          | 3      | 0.9879                               | 0.9880                               | 0.9834                               | 0.9854                               | 0.9922                               | 0.9938                               | 0.9939                               | 0.9917                               | 0.9924                               | 1.0031                               |
| $\mu$    |        | 0.9838                               | 0.9843                               | 0.9818                               | 0.9829                               | 0.9861                               | 0.9922                               | 0.9924                               | 0.9909                               | 0.9914                               | 0.9918                               |
| $\sigma$ |        | 0.0031                               | 0.0028                               | 0.0013                               | 0.0019                               | 0.0061                               | 0.0014                               | 0.0013                               | 0.00055                              | 0.0008                               | 0.0014                               |

Table S9.  $\alpha_{photosynthesis}$  values obtained from the sensitivity tests: results of sensitivity tests on dioxygen consumption fractions (white columns) and on uncertainties in fractionation factor values (grey columns).  $\mu$  is the average over all lines above of the different quantities and  $\sigma$  the associated standard deviation.

| Sequence | Period | $^{18}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 0 | $^{18}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 1 | $^{18}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 2 | $^{18}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 3 | $^{18}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 4 | $^{17}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 0 | $^{17}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 1 | $^{17}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 2 | $^{17}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 3 | $^{17}\alpha_{photosynthesis}$<br>Test 4 |
|----------|--------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 1        | 1      | 0.9941                                   | 0.9944                                   | 0.9951                                   | 0.9969                                   | 0.9974                                   | 0.9969                                   | 0.9970                                   | 0.9974                                   | 0.9972                                   | 0.9974                                   |
|          | 2      | 1.0040                                   | 1.0040                                   | 1.0036                                   | 1.0038                                   | 1.0021                                   | 1.0020                                   | 1.0020                                   | 1.0018                                   | 1.0019                                   | 1.0020                                   |
|          | 3      | 1.0039                                   | 1.0039                                   | 1.0034                                   | 1.0037                                   | 1.0018                                   | 1.0017                                   | 1.0017                                   | 1.0015                                   | 1.0016                                   | 1.0018                                   |
| 2        | 1      | 1.0021                                   | 1.0023                                   | 1.0023                                   | 1.0024                                   | 1.0022                                   | 1.0013                                   | 1.0014                                   | 1.0013                                   | 1.0013                                   | 1.0022                                   |
|          | 2      | 1.0043                                   | 1.0044                                   | 1.0040                                   | 1.0043                                   | 1.0042                                   | 1.0021                                   | 1.0021                                   | 1.0019                                   | 1.0020                                   | 1.0042                                   |
| 3        | 1      | 1.0037                                   | 1.0039                                   | 1.0039                                   | 1.0040                                   | 1.0038                                   | 1.0096                                   | 1.0021                                   | 1.0021                                   | 1.0021                                   | 1.0020                                   |
|          | 2      | 1.0019                                   | 1.0022                                   | 1.0026                                   | 1.0024                                   | 1.0022                                   | 1.0013                                   | 1.0014                                   | 1.0016                                   | 1.0014                                   | 1.0014                                   |
|          | 3      | 1.0063                                   | 1.0066                                   | 1.0056                                   | 1.0062                                   | 1.0059                                   | 1.0034                                   | 1.0035                                   | 1.0030                                   | 1.0035                                   | 1.0031                                   |
| $\mu$    |        | 1.0026                                   | 1.0027                                   | 1.0026                                   | 1.0030                                   | 1.0025                                   | 1.0023                                   | 1.0014                                   | 1.0013                                   | 1.0013                                   | 1.0014                                   |
| $\sigma$ |        | 0.0039                                   | 0.0034                                   | 0.0030                                   | 0.0025                                   | 0.0034                                   | 0.0033                                   | 0.0018                                   | 0.0016                                   | 0.0017                                   | 0.0017                                   |

Table S10. Complete data set of the different average photosynthesis coefficient fractionations of oxygen during light periods during the photosynthesis and respiration experiment.  $\mu$  is the average over all lines above of the different quantities and  $\sigma$  the associated standard deviation.

| Sequence | Period | $^{18}\alpha_{photosynthesis}$ | $^{17}\alpha_{photosynthesis}$ | $\theta_{photosynthesis}$ |
|----------|--------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 1        | 1      | 0.9947                         | 0.9972                         | 0.5296                    |
|          | 2      | 1.0038                         | 1.0019                         | 0.5067                    |
|          | 3      | 1.0037                         | 1.0016                         | 0.4420                    |
| 2        | 1      | 1.0023                         | 1.0013                         | 0.5672                    |
|          | 2      | 1.0043                         | 1.0020                         | 0.4794                    |
| 3        | 1      | 1.0039                         | 1.0020                         | 0.5202                    |
|          | 2      | 1.0024                         | 1.0014                         | 0.6047                    |
|          | 3      | 1.0061                         | 1.0032                         | 0.5248                    |
| $\mu$    |        | 1.0027                         | 1.0013                         | 0.5218                    |
| $\sigma$ |        | 0.0032                         | 0.0017                         | 0.0498                    |

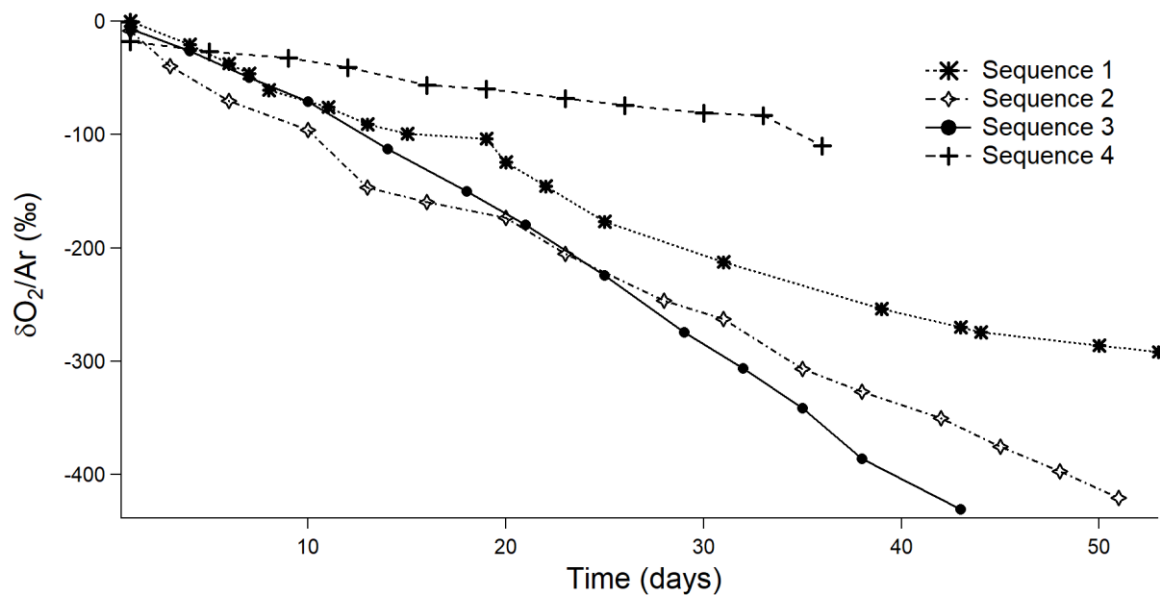
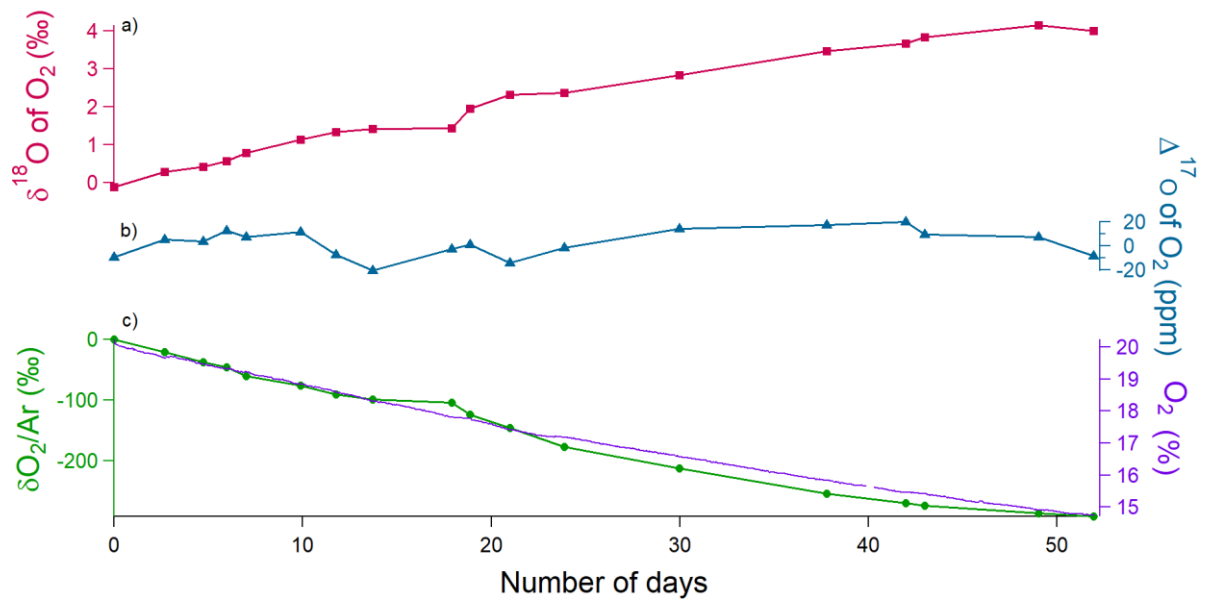
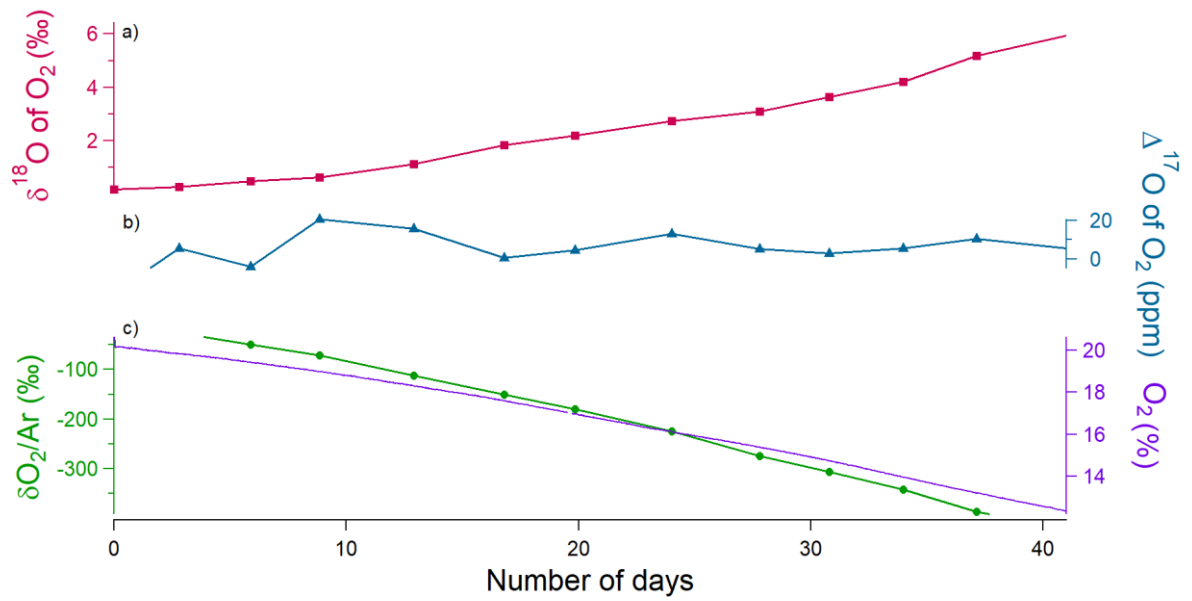


Fig.S1. Comparison of the evolution of the O<sub>2</sub> concentration of the sequence 1, 2, 3 and 4 during the soil respiration experiment.

1)



2)





3)

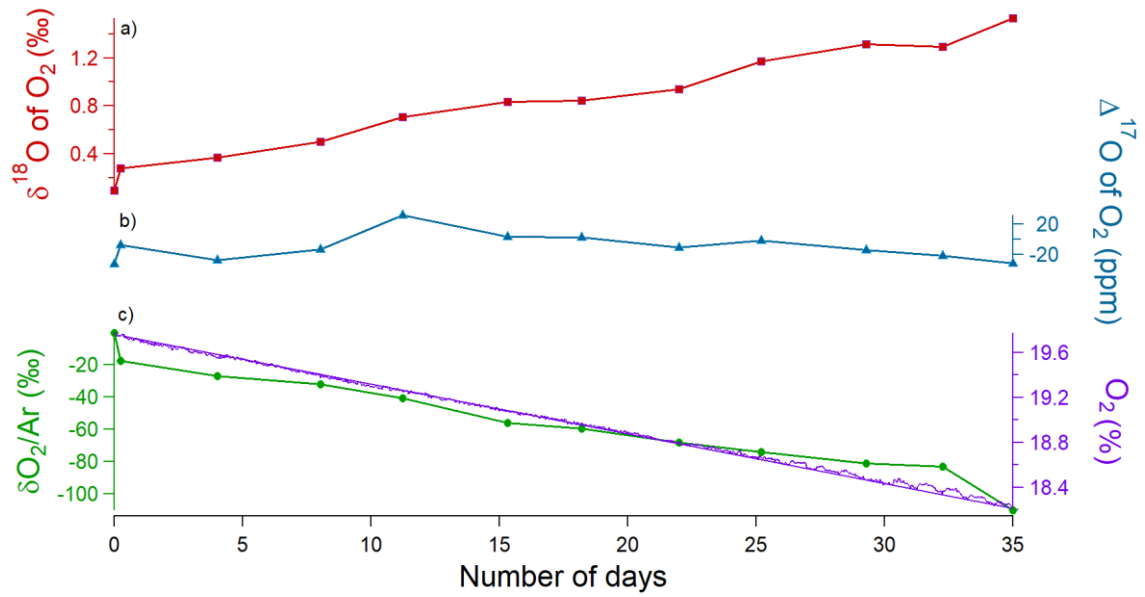
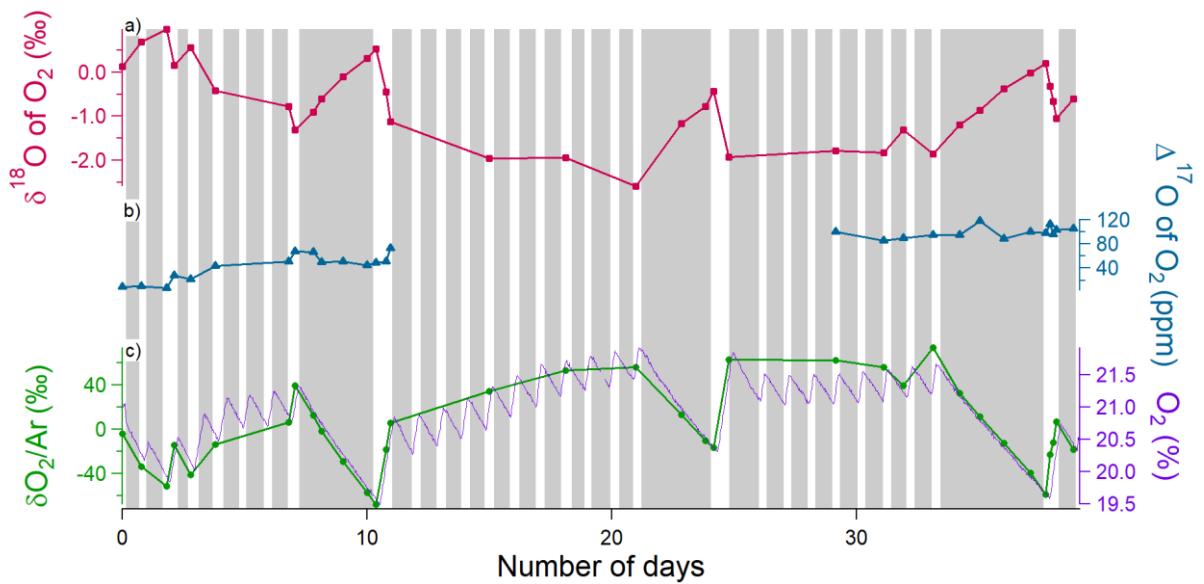


Fig.S2. Summary of the first (1), third (2) and fourth (3) sequences of the soil respiration experiment (day 0 is the beginning of the sequence). (a)  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (red) variations. (b)  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (blue) variations. (c) Dioxygen concentration (purple) from the optical sensor and  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  variations (green) measured by IRMS.

1)



2)

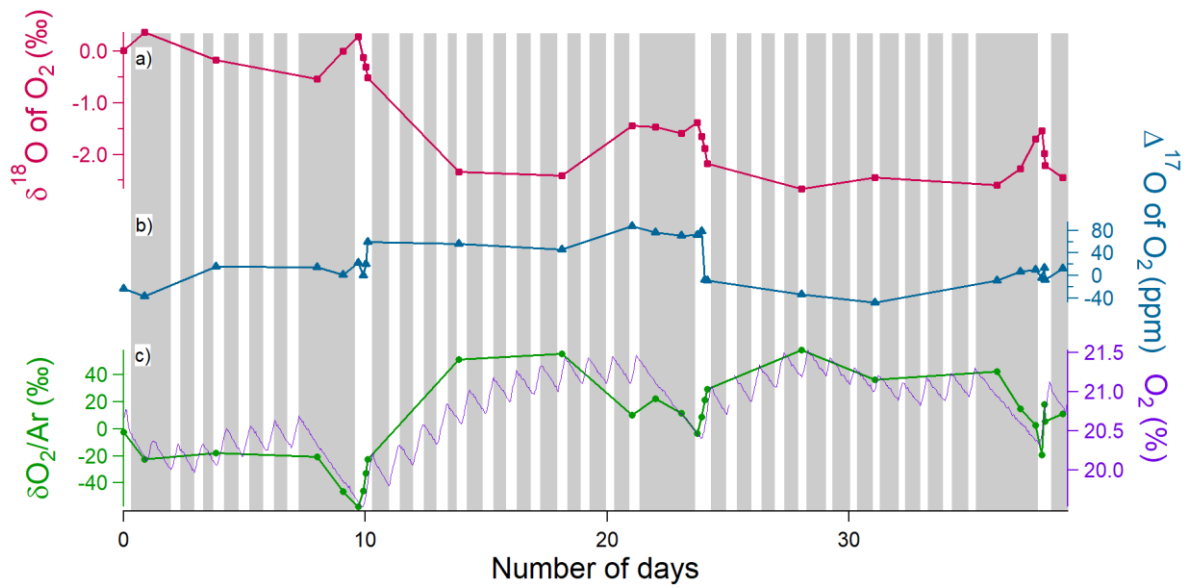


Fig.S3. Summary of the second (1) and third (2) sequences of the photosynthesis and dark respiration experiment (day 0 is the beginning of the sequence). Grey rectangles correspond to night periods and white rectangles to light periods. (a)  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (red) variations. (b)  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (blue) variations. (c) Dioxygen concentration (purple) from the optical sensor and  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  variations (green) measured by IRMS.

# *Chapitre 4 : Air oxygen fractionation associated with respiration and photosynthesis processes in C3 and C4 plants: impact on the study of the global Dole effect*

## 4.1. Introduction

Dans ce chapitre, je présente le dernier article en cours de rédaction des travaux de cette thèse. Dans ces travaux, l'étude des coefficients de fractionnement a été faite sur une diversité de plantes en utilisant les chambres biologiques en parallèle afin de quantifier la reproductibilité des expériences. Des expériences ont été faites en hydroponie, afin de pouvoir s'émanciper de l'influence de la respiration du sol lors de la quantification des coefficients de fractionnement associés à la respiration des plantes et à la photosynthèse. Un des objectifs en étudiant une large variété de plantes est de confirmer ou d'infirmer l'existence d'un fractionnement isotopique de l'oxygène lors de la photosynthétique terrestre.

Cette étude confirme l'observation d'un fractionnement isotopique de l'oxygène lors de la photosynthèse. Ce résultat est surprenant d'un point de vue du mécanisme biologique mis en jeu : des réactions parallèles de consommation de dioxygène pourraient peut-être avoir lieu lors de la photosynthèse. Cependant, le fait qu'un fractionnement systématique soit observé pour toutes les expériences menées en chambres biologiques suggère que celui-ci doit être pris en compte lors du calcul global de l'effet Dole.

Dans une deuxième partie de cette étude, je présente donc comment l'estimation des coefficients de fractionnements à la respiration et à la photosynthèse déterminés dans

cette thèse peuvent être intégrés à un nouveau calcul de l'effet Dole lors de la dernière déglaciation. Pour cela, et pour quantifier la part de la biosphère terrestre et la part de la biosphère marine dans le calcul de l'effet Dole global, nous utilisons les calculs de flux de productivité biosphérique obtenus par des sorties de modèles climatiques intégrant la description de la biosphère terrestre et marine lors de certaines périodes de la dernière déglaciation (simulations PMIP). Nos résultats sont ainsi comparés à ceux qui avaient été estimés précédemment sur différentes périodes de la déglaciation : LGM, 6 ka et Préindustriel (Bender et al., 1994 ; Hoffmann et al., 2004 ; Luz et Barkan, 2011). Nous concluons finalement que le rapport de la productivité terrestre sur la productivité marine n'explique pas le signal d'effet Dole sur la dernière déglaciation (en particulier le changement du signal d'effet Dole entre 6 ka et le préindustriel) et que l'effet Dole est sensible au premier ordre aux variations du cycle hydrologique des basses latitudes.

*4.2. Article en préparation : Air oxygen fractionation associated with respiration and photosynthesis processes in plants: impact on the study of the global Dole effect*

# Air oxygen fractionation associated with respiration and photosynthesis processes in plants: impact on the study of the global Dole effect

Clémence Paul<sup>1</sup>, Clément Piel<sup>2</sup>, Joana Sauze<sup>2</sup>, Ji-Woong Yang<sup>1</sup>, Marie Bouchet<sup>1</sup>, Olivier Jossoud<sup>1</sup>, Arnaud Dapoigny<sup>1</sup>, Daniele Romanini<sup>4</sup>, Frédéric Prié<sup>1</sup>, Sébastien Devidal<sup>2</sup>, Roxanne Jacob<sup>1</sup>, Alexandru Milcu<sup>2,3</sup> and Amaëlle Landais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, LSCE/IPSL, CEA-CNRS-UVSQ, Université Paris-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup>Ecotron Européen de Montpellier (UAR 3248), Univ Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Campus Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France

<sup>3</sup>Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Univ Montpellier, CNRS, Univ Paul Valéry, EPHE, IRD, Montpellier, France

<sup>4</sup>Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Univ Grenoble Alpes, CNRS/UGA, Saint-Martin-d'Hères, France

Correspondence: Clémence Paul (clemence.paul@lsce.ipsl.fr)

## 1. Introduction

Oxygen is the most abundant element on Earth. Photosynthesis is the biological mechanism by which oxygen is produced by terrestrial and marine organisms, while it is consumed by another process, respiration. Oxygen concentration largely varied in the past because of geological oxidation events (Liu et al., 2019) or changes in ecosystems productivity (Vilovic et al., 2023). The study of dioxygen isotopic composition makes it possible to study all the fundamental biogeochemical cycles, in particular those of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and water. The analysis of air bubbles in ice cores provides a signal of past variations in the  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub> in atmospheric air (also known as  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ). The  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  variations can be interpreted as variations in the hydrological cycle at low latitudes and/or as variations of the relative proportion of the oceanic vs terrestrial biosphere productivity (Bender et al., 1994; Luz et al., 1999; Malaizé et al., 1999; Severinghaus et al., 2009; Blunier et al., 2002; Landais et al., 2010; Luz and Barkan, 2011). Several studies have measured the enrichment of the atmospheric oxygen  $\delta^{18}\text{O}$  ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ) vs the  $\delta^{18}\text{O}$  of water of the global ocean (the Vienna Standard Mean Ocean Water, VSMOW) to 23.5 - 24 ‰ (Kroopnick and Craig, 1972; Barkan and Luz, 2005; Pack et al., 2017; Wostbrock and Sharp, 2021). This difference between  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sw}}$  (sw for sea water) varies with time and is named the Dole effect (DE). Subsequently, several studies have attempted to estimate this Dole effect in order to get as close as possible to this value of 24 ‰ (Bender et al., 1994; Hoffman et al., 2004; Luz and Barkan, 2011) and better understand the processes involved.

Interpretation of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  and Dole effect variations in the past is still an open question. Historically, Bender et al. (1994) found that  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  oscillates with precession and this enabled ice cores to be dated using this proxy (Petit et al., 1999; Dreyfus et al., 2007). It is well established that  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  is influenced by changes in the hydrological cycle at low

latitudes (Bender et al., 1994; Severinghaus et al., 2009; Landais et al., 2010; Seltzer et al., 2017). This is supported by the strong resemblance over the last 650 ka between variations in  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  and in  $\delta^{18}\text{O}_{\text{calcite}}$ , studied in East Asian speleothems (Wang et al., 2008; Cheng et al., 2016) which are driven by changes in the low-latitude water cycle (monsoons).

In addition, Bender et al. (1994), Malaizé et al. (1999) and Hoffmann et al. (2004) suggested that variations of the Dole effect are mainly influenced by the relative proportion of terrestrial vs oceanic productivity. The reason for this interpretation is that the terrestrial Dole effect (i.e. the enrichment in  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in the atmosphere vs  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sw}}$  due to the fluxes issued from the terrestrial biosphere) was estimated to be several permil higher than the oceanic Dole effect (i.e. the enrichment in  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in the atmosphere vs  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sw}}$  due to the fluxes issued from the oceanic biosphere). These estimates of the oceanic and the terrestrial Dole effect relied on some rare determinations of the fractionation coefficients associated with biological processes, during both terrestrial and oceanic respiration and photosynthesis (Guy et al., 1993; Angert and Luz, 2001; Hendricks et al., 2004; Helman et al., 2005; Eisenstadt et al., 2010; Luz and Barkan, 2011). Using these fractionation coefficients, the first estimate of the global Dole effect by Bender et al. (1994) was too low by more than 3 ‰ than the measured value (24 ‰) which questioned the validity of these approaches. In particular, no discrimination was associated with oceanic and terrestrial photosynthesis (Guy et al., 1989; Vinogradov et al., 1959; Helman et al., 2005). When Eisenstadt et al. (2010) detected an oceanic photosynthetic discrimination approximately equal to 6 ‰, it was easier to reconcile the estimated and measured Dole effect. Moreover, it permitted to increase the calculated oceanic Dole effect estimates to the level of terrestrial values and led Luz and Barkan (2011) to propose that Dole effect is only a marker of variations in the hydrological cycle at low latitudes. However, a recent study

by Paul et al. (2023) noticed that a non-zero terrestrial photosynthetic discrimination of 3.7 ‰ still challenges the proper interpretation of the Dole effect.

The terrestrial photosynthetic discrimination evidenced by Paul et al. (2023) needs to be verified since the experiment was carried out on one plant only. Moreover, this experiment was not performed at the micro-organism scale as in previous studies (Helman et al., 2005; Eisenstadt et al., 2010) but at the scale of the ecosystem, hence involving the presence of soil. While this approach may be closer to the reality, other processes than photosynthesis occur during light period which can influence the determination of the fractionation coefficient associated with photosynthesis.

The first objective of our study is to better quantify the discriminations associated with terrestrial respiration and photosynthesis on closed chambers on a larger number of terrestrial plants. As a second objective, we want to revise the interpretation of the Dole effect using new estimated fractionation coefficients.

The manuscript is organized as follows. In a first section, we present the general evolution of ideas on the calculation and the interpretation of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  and the Dole effect. The second section is devoted to materials and methods and provides the details on the plants studied and on the controlled biological chambers. Modeled gross primary production outputs from Palaeoclimate Modelling Intercomparison Project (PMIP) were also used to help interpretation of the global Dole effect. The third section presents the results of biological fractionation coefficients for the different plants. Finally, the last section is dedicated to the implication of the new calculation of fractionation coefficients for the interpretation of the Dole effect.



## 2. State of art: general concept of calculation and interpretation of $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$

### 2.1. Calculations of $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ and Dole effect

#### 2.1.1. The definition of Dole effect

The  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  is expressed with respect to present-day atmospheric air as a standard. In contrast,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sw}}$  is expressed with respect to the international standard for water: Vienna Standard Mean Ocean Water (V-SMOW). There is a difference in the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  value for present-day atmosphere and in the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{H}_2\text{O}$  for the V-SMOW standard. This difference is called the Dole effect (DE) and we can express:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}} = \delta^{18}\text{O}_{\text{sw}} + DE \quad (1)$$

The Dole effect is due to the different processes involved in the coupled cycle of dioxygen and water. In particular, the main  $\text{O}_2$  fluxes on Earth are due to biological processes with photosynthesis producing  $\text{O}_2$  from  $\text{H}_2\text{O}$  contained in the biosphere and respiration consuming atmospheric  $\text{O}_2$ , preferentially the lightest isotopic forms ( $^{16}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  vs  $^{16}\text{O}$ - $^{18}\text{O}$ ).

We can thus define the Dole effect as:

$$DE = \delta^{18}\text{O}_{\text{water,biosphere}} + {}^{18}\epsilon_{\text{respi}} + {}^{18}\epsilon_{\text{photo}} \quad (2)$$

Where  $^{18}\epsilon_{respi}$  represents the discrimination associated with the respiration of organisms and  $^{18}\epsilon_{photo}$  represents the discrimination associated with the photosynthesis of organisms.  $\delta^{18}O_{water,biosphere}$  is the  $\delta^{18}O$  of the water consumed by the biosphere during photosynthesis and is expressed with respect to V-SMOW.

In the ocean, the  $\delta^{18}O_{water,biosphere}$  is equal to the  $\delta^{18}O_{sw}$  and the oceanic Dole effect can directly be expressed as:

$$DE_{ocean} = ^{18}\epsilon_{respi,ocean} + ^{18}\epsilon_{photo,ocean} \quad (3)$$

Where  $^{18}\epsilon_{respi,ocean}$  represents the discrimination associated with the respiration of marine organisms and  $^{18}\epsilon_{photo,ocean}$  represents the discrimination associated with the photosynthesis of autotrophic marine organisms.

On Earth, leaf water is consumed by plants during photosynthesis. The  $\delta^{18}O$  of leaf water can be related to the  $\delta^{18}O$  of soil water which is then modified by evapotranspiration (Hoffmann et al., 2004; West et al., 2008) so that the terrestrial Dole effect can be defined as follows:

$$DE_{terr} = \delta^{18}O_{soil\_water} + ^{18}\epsilon_{evapotranspi} + ^{18}\epsilon_{respi,terr} + ^{18}\epsilon_{photo,terr} \quad (4)$$

Where  $^{18}\epsilon_{evapotranspi}$  represents the discrimination associated with evapotranspiration,  $^{18}\epsilon_{respi,terr}$  represents the discrimination associated with the respiration of terrestrial organisms and  $^{18}\epsilon_{photo,terr}$  represents the discrimination associated with the

photosynthesis of autotrophic terrestrial organisms. At first approximation, the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{soil\_water}}$  can be estimated as the annual mean  $\delta^{18}\text{O}$  of meteoric water or  $\delta^{18}\text{O}_{mw}$ .

From the definition of the oceanic and terrestrial Dole effects and making the steady state assumption, i.e. that the biological fluxes of dioxygen production (photosynthesis) and dioxygen consumption (mainly respiration) are equal, it is possible to express the global Dole effect as:

$$DE_{global} = \frac{GPP_{ocean} \times DE_{ocean} + GPP_{terr} \times DE_{terr}}{GPP_{totale}} \quad (5)$$

with  $GPP_{ocean}$  corresponding to the gross primary productivity of the ocean,  $GPP_{terr}$  corresponding to the gross primary productivity of the land,  $GPP_{total}$  corresponding to the gross primary productivity of the ocean and land (i.e.  $GPP_{total} = GPP_{ocean} + GPP_{terr}$ ).

By simplifying the equation with the parameter  $r = \frac{GPP_{ocean}}{GPP_{total}}$ , we can write the definition of

$DE_{global}$  as follows:

$$DE_{global} = r \times DE_{ocean} + (1 - r) \times DE_{terr} \quad (6)$$

### 2.1.2. The main drivers of Dole effect

In order to identify the main drivers of the Dole effect, it is necessary to have estimates of the different terms in the equations 3, 4 and 5.

The value of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$  (as the main driver of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{soil\_water}}$ ) varies temporally and spatially because of changes in the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sw}}$  (especially over glacial – interglacial transitions) and of the distillation occurring between the evaporation source and the precipitation site. This distillation leads to decreased values of  $\delta^{18}\text{O}$  in continental regions and toward high latitudes with the respect to evaporation regions (Aggarwal et al., 2010). At first approximation, the  $\delta^{18}\text{O}$  soil water can be approximated by the annual average of the  $\delta^{18}\text{O}$  of meteoric water (Anderson et al., 1998; Helliker and Richter 2008) equal on average to - 8 ‰ (Bender et al., 1994; Landais et al., 2006.) Then,  $\delta^{18}\text{O}$  of leaf water is enriched with respect to  $\delta^{18}\text{O}$  of soil water due to evapotranspiration, the main contribution being the evaporation of water in leaves. This enrichment shows large temporal and spatial variations due to the diversity of leaf types and anatomies as well as to fluctuations in temperature, humidity and surrounding water vapor  $\delta^{18}\text{O}$  (e.g. Flanagan et al., 1991; Cernuzak et al., 2016). Despite the strong spatial variability, measurements of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{CO}_2$  led to an estimate of the global value of 7 ‰ for the difference between  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  (lw = leaf water) and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sw}}$  for present-day (Gillon and Yakir, 2001; West et al., 2008).

The value for  $^{18}\epsilon_{\text{respi}}$  should be calculated considering the different biological processes consuming  $\text{O}_2$ . Bender et al. (1994) listed three main processes which should be considered both in the terrestrial and oceanic biosphere: dark respiration, Mehler reaction and photorespiration. For the first estimate of  $^{18}\epsilon_{\text{respi,terr}}$  (18.0 ‰), Bender et al. (1994) used the most recent values observed for dark respiration, Mehler reaction and photorespiration from biological experiments driven at the scale of the enzyme or the cell (Guy et al., 1992, 1993). For the first estimate of  $^{18}\epsilon_{\text{respi,ocean}}$  (18.9 ‰), Bender et al. (1994) used measurements of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentrations from oceanic samples or from biological experiments performed on several marine organisms (bacteria, microalgae, copepods, etc.). Over the years, these estimates were refined using studies performed at

the cell scale (Helman et al., 2005) or at a more global scale (e.g. soil samples, Angert et al., 2003; ocean samples, Hendricks et al., 2004).

As for the  $^{18}\epsilon_{respi,ocean}$ , the first studies detected no discrimination (Guy et al., 1989, studies on cyanobacteria (*Anacystis nidulans*) and diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*); Vinogradov et al., 1959; Helman et al., 2005). However, more recently, Eisenstadt et al. (2010), study a diversity of marine organisms (phytoplankton) and found a non-zero photosynthetic discrimination for eukaryotic algae: 4.5 ‰ for *Phaeodactylum tricornutum* diatoms, 3 ‰ for *Nannocloropsis sp.* diatoms, 5.5 ‰ for Coccolithophores *Emiliana huxleyi* and 7 ‰ for *Chlamydomonas reinhardtii*. A non-zero value for the photosynthetic discrimination is difficult to explain either from the physiological point of view (Tcherkez and Farquhar, 2007) or by the diffusion during the production of O<sub>2</sub> and then the diffusion in the free air (O<sup>16</sup> is diffusing more rapidly than O<sup>18</sup> so that we should have measured an apparent negative discrimination during photosynthesis). Eisenstadt et al. (2010) also ruled out the existence of large O<sub>2</sub> consumption reaction fractionating O<sub>2</sub> and hence affecting the determination of the  $^{18}\epsilon_{photo,terr}$  value because there was no O<sub>2</sub> in their experimental environment. Paul et al. (2023) performed controlled experiments with fescue for the terrestrial photosynthesis and found a first value of 3.7 ‰ for  $^{18}\epsilon_{photo,terr}$ .

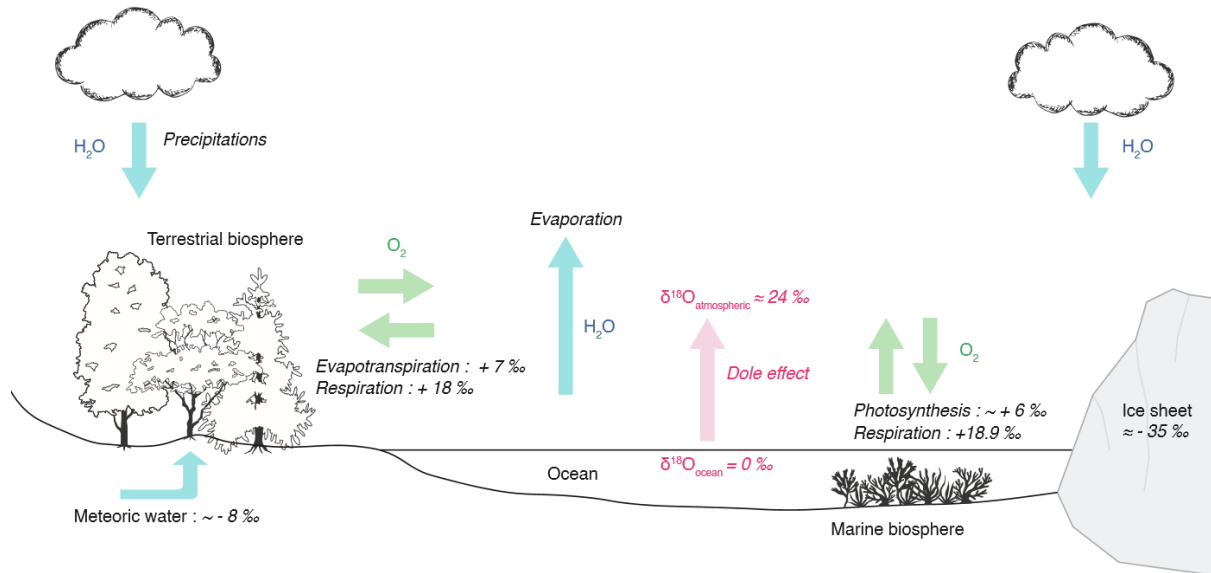


Figure 1. The water and oxygen cycle and fractionation factors involved in hydrological and biological processes. Blue arrows show hydrological fluxes, green arrows show biological fluxes and the red arrow shows the global Dole effect.

### 2.1.3. Different estimates of Dole effect

In their first estimates of the terrestrial and oceanic Dole effects, Bender et al. (1994) used the global estimates presented above and found a significantly lower value for the oceanic Dole effect compared to the continental Dole effect (Fig.2). Hoffmann et al. (2004) revisited this first calculation through a different integration of the isotopic effects: they used various models (an atmospheric general circulation model with water isotopes, a model of vegetation and an ocean model with a module for biological productivity) to calculate global  $\delta^{18}\text{O}_{\text{mw}}$  and  $^{18}\epsilon_{\text{respi}}$  as well as biological fluxes. They confirmed the results of Bender et al. (1994) that the oceanic Dole effect should be lower than the terrestrial one and even found a much larger difference between these two contributions. If the terrestrial and oceanic Dole effects are significantly different (Fig.2), it is then expected that the change in the relative proportion of the terrestrial and oceanic

productivities is one of the main drivers of the variations of the global Dole effect as measured in climatic archives.

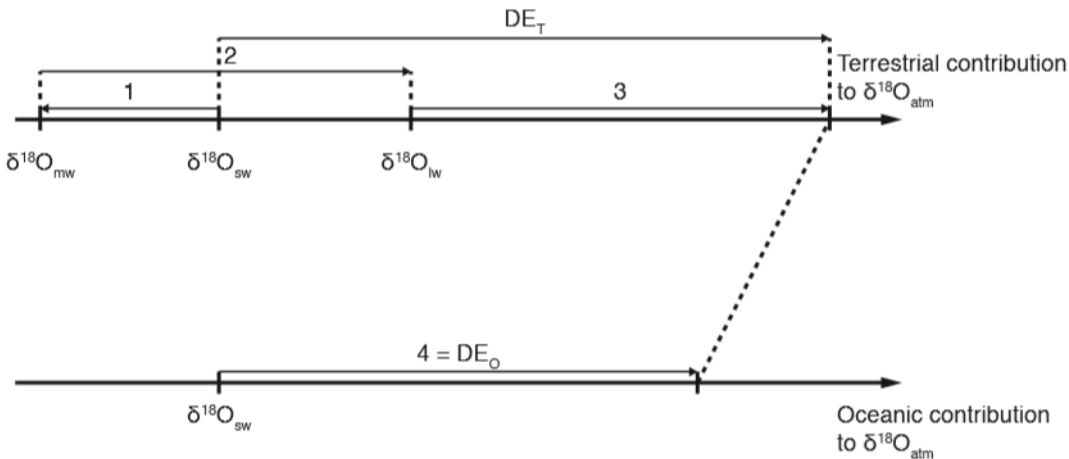


Figure 2. Diagram of the main contributions to  $\delta^{18}\text{O}_{atm}$ . (1) Fractionation of water associated with evaporation and precipitation. (2) Fractionation of water associated with evapotranspiration. (3) Fractionation of atmospheric oxygen associated with terrestrial respiration and mixing with oxygen issued from leaf photosynthesis. (4) Fractionation of atmospheric oxygen associated with oceanic respiration and mixing with oxygen issued from oceanic photosynthesis. (5) Fractionation associated with oceanic photosynthesis.  $DE_T$  = terrestrial Dole effect and  $DE_o$  = oceanic Dole effect (from Landais et al., 2007).

Using latest estimates of  $^{18}\epsilon_{respi}$  and  $^{18}\epsilon_{photo}$ , Luz and Barkan (2011) found a different result:  $DE_{terr}$  and  $DE_{ocean}$  are equal to about 24 ‰ each (Fig.3). This difference is due to the fact that their estimate of  $^{18}\epsilon_{respi,terr}$  is smaller than initially because of the diffusion in the soil and  $^{18}\epsilon_{photo,ocean}$  is estimated to 6 ‰ instead of 0 ‰ in the first calculations. In this case (Fig.3), the relative proportion of terrestrial and oceanic productivities cannot explain the variations of the global Dole effect which are expected to be simply the result of variations in monsoon cycles leading to variations in the  $\delta^{18}\text{O}_{mw}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{lw}$  (Luz and Barkan, 2011; Landais et al., 2010).

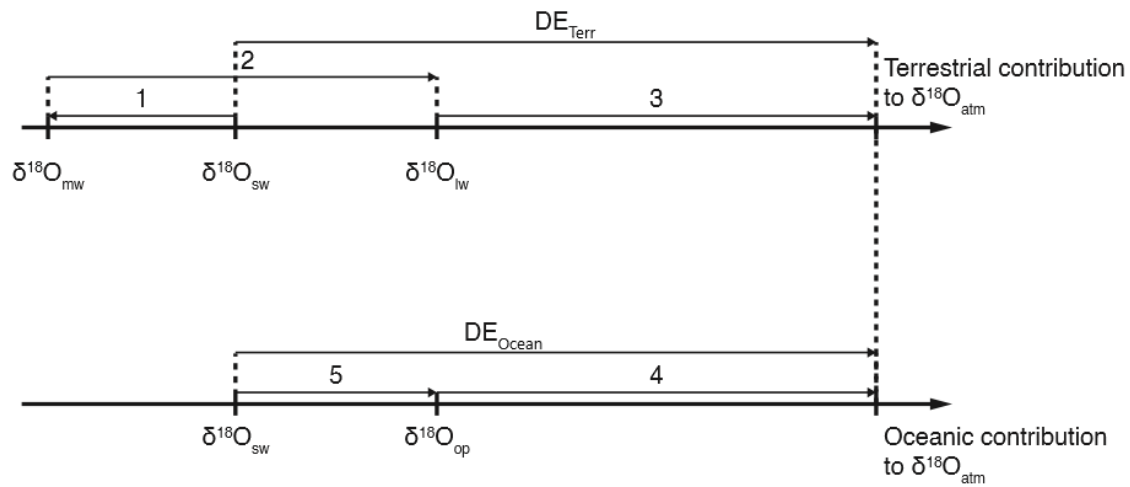


Figure 3. Diagram of the main contributions to  $\delta^{18}\text{O}_{atm}$ . (1) Fractionation of water associated with evaporation and precipitation. (2) Fractionation of water associated with evapotranspiration. (3) Fractionation of atmospheric oxygen associated with terrestrial respiration and mixing with oxygen issued from leaf photosynthesis. (4) Fractionation of atmospheric oxygen associated with oceanic respiration and mixing with oxygen issued from oceanic photosynthesis. (5) Fractionation associated with oceanic photosynthesis.  $DE_{Terra}$  = terrestrial Dole effect and  $DE_{Ocean}$  = oceanic Dole effect (modified from Landais et al., 2007).

Recently, further research was carried out by Paul et al. (2023) on the study of terrestrial biological fractionations in a closed chamber. The major result of this study is the discovery of a terrestrial photosynthetic discrimination equal to 3.7 ‰. If confirmed, this result questions the interpretations of variations in the global Dole effect, since according to equations 4 and 5, the terrestrial Dole effect would then be increased and be again higher than the oceanic one. Thus, according to equation 6, the ratio  $r$  between terrestrial and oceanic productivity would not only affect the variations of the hydrological cycle at low latitudes but also the variations of the global Dole effect (Fig.3).



In our study, we seek to confirm or infirm the results of Paul et al. (2023) by studying a broader range of plant species and to apply the results to an updated interpretation of the Dole effect over the last deglaciation.

#### 2.1.4. Available values for Dole effect

In this section, we detail all the parameters used to calculate Dole effects in the literature. (Table 1).

Table 1. (a) Parameters used to calculate oceanic, terrestrial and the current global Dole effects in literature. \*found in their own study, <sup>1</sup>Farquhar et al. (1980); <sup>2</sup>Keeling and Shertz (1992); <sup>3</sup>Kiddon et al. (1993) and others defined after; <sup>4</sup>Farquhar et al. (1993); <sup>5</sup>Guy et al. (1992), (1993); <sup>6</sup>West et al. (2008); <sup>7</sup>Landais et al. (2007); <sup>8</sup>Luz and Barkan (2011). (b) Calculation of the Dole effects (oceanic, terrestrial and global) in their own study. + the calculation of oceanic, terrestrial and global Dole effects was not explicitly done in their own study; thus, we have calculated them here using Eq.3 and 4 and for the global DE with the equation given by Luz and Barkan (2011):  $DE_{terr} * f_{terr} + DE_{oce} * f_{oce} - \epsilon_{stratosphere}$ , with  $f_{terr} = 0.63$  (the fraction of the land),  $f_{oce} = 0.37$  (the fraction of the ocean) and  $\epsilon_{stratosphere} = 0.3$  (the contribution due to exchange of O<sub>2</sub> between the troposphere and the atmosphere).

a)

|   | Bender et al.<br>(1994) | Hoffmann et al. (2004) | Luz and<br>Barkan<br>(2011) | Paul et al. (2023) |
|---|-------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------|
| GPP-O <sub>2</sub> ocean (Pmol<br>O <sub>2</sub> /yr) | 12 <sup>1</sup>         | 7.6*                   |                             |                    |
| GPP-O <sub>2</sub> land (Pmol<br>O <sub>2</sub> /yr)  | 20.4 <sup>2</sup>       | 16.79*                 |                             |                    |
| <sup>18</sup> $\epsilon_{respi,ocean}$                | 18.9 <sup>3</sup>       | 20 <sup>3</sup>        | 19.7*                       | 19.7 <sup>8</sup>  |
| <sup>18</sup> $\epsilon_{photo,ocean}$                | 0 <sup>5</sup>          | 0 <sup>5</sup>         | 4 <sup>5</sup>              | 4 <sup>5</sup>     |
| $\delta^{18}O_{lw}$                                   | 4.4 <sup>4</sup>        | 5-6*                   | 6.5 <sup>6</sup>            | 6.5 <sup>6</sup>   |
| <sup>18</sup> $\epsilon_{respi,terr}$                 | 18 <sup>5</sup>         | 20 <sup>3</sup>        | 17.7 <sup>7</sup>           | 17*                |
| <sup>18</sup> $\epsilon_{photo,terr}$                 | 0 <sup>5</sup>          | 0 <sup>5</sup>         | 0 <sup>5</sup>              | 3.7*               |

b)

|                           | Bender et al. (1994) | Hoffmann et al. (2004) | Luz and Barkan (2011) | Paul et al. (2023) | Ciais et al. (2012) |                   |
|---------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
|                           | Present              |                        |                       |                    | PI                  | LGM               |
| $DE_{ocean}$              | 18.9                 | 16.9                   | 23.5                  | 23.7               | 19.8                | 20                |
| $DE_{terr}$               | 22.4                 | 26.9                   | 23.5                  | 26.5               | 28.3                | 29.5              |
| $DE_{global\_calculated}$ | 20.8                 | 23.5                   | 23.2                  | 25.1 <sup>+</sup>  | 24.9 <sup>+</sup>   | 25.7 <sup>+</sup> |

The calculation of oceanic respiration discrimination by Bender et al. (1994) and Hoffmann et al. (2004) depends on the average value given by Kiddon et al. (1993) of 20 ‰ for the euphotic zone and on the average value of 12 ‰ by Bender (1990) for the deep-water zone. We note different  $DE_{ocean}$  values for Bender et al. (1994) and Hoffmann et al. (2004) due to the fact that they did not take the same fractions of marine respiration attributed to O<sub>2</sub> uptake at oceanic depths below the euphotic zone (20 % for Hoffmann et al., 2004 and 5 % for Bender et al., 1994). The high terrestrial Dole effect of Hoffmann et al. (2004) and Ciais et al. (2012) is the result of a higher  $\delta^{18}O_{lw} = 6$  ‰ (calculated in their study) instead of the 4.4 ‰ used by Bender et al. (1994) based on the work of Farquhar et al. (1993). The discovery by Eisenstadt et al. (2010) of oceanic photosynthetic discrimination thus increases the value of the oceanic Dole effect for Luz and Barkan (2011). For Paul et al. (2023), the largest value of the terrestrial Dole effect compared to Luz et Barkan (2011) is linked to the finding of a fractionation during terrestrial photosynthesis.

## 2.2. The evolution of the Dole effect over the last deglaciation

Figure 4 shows the evolution of the Dole effect calculated using different datasets and age models for the oceanic  $\delta^{18}O$  from the Last Glacial Maximum (LGM) at 20 ka BP, to the

Pre-Industrial period (PI), at 0 ka BP. For the atmospheric  $\delta^{18}\text{O}$  we used the high resolution (100 years on average) record from the WAIS Divide ice core (Seltzer et al., 2017). For the oceanic  $\delta^{18}\text{O}$ , the three following series were used: (i) the benthic  $\delta^{18}\text{O}$  stack of Lisiecki and Raymo (2005) whose age model is tuned to the EPICA Dome C ice core timescales (Parrenin et al., 2007; Veres et al., 2013; Bouchet et al., 2023), (ii) the benthic  $\delta^{18}\text{O}$  volume-weighted stack of Lisiecki and Stern (2016) on its original radiocarbon age scale and (iii) the ice-sheet contribution of the oceanic  $\delta^{18}\text{O}$  modeled by Bintanja et al. (2005). We calculate the three resulting scenarios for the Dole effect fluctuations. Huang et al. (2020) argue that it may be more appropriate to use a stack for sea surface term  $\delta^{18}\text{O}_{\text{surf}}$  rather than the mean oceanic water  $\delta^{18}\text{O}$  to calculate the Dole effect. The reason for this choice is that when using the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{ocean}}$  in the calculation of the Dole effect, a 100 ka frequency, that is not present in the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  record, appears. Because  $\delta^{18}\text{O}_{\text{surf}}$  is mainly driven by precession, as  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ , the calculation of Dole effect (DE) with these two terms does not display any 100 ka periodicity. Therefore, the alternative Dole effect (DE\*) suggested by Huang et al. (2020) is also shown in Fig.4 (pink line).

Although all DE scenarios are approximately equal to zero at LGM and PI, they undergo significant fluctuations ( $\pm 0.4 - 0.6 \text{ ‰}$ ) over the last deglaciation from 10 to 3 ka BP. The variations observed during the deglaciation, from 20 to 11 ka BP, are inconsistent and diverge from one scenario to another by up to 0.5 ‰, except the DE\* evaluated by Huang et al. (2020) which remains close to zero. Hence, we believe that the important deviations affecting the other DE scenarios might result from the omission of the substantial influence of the hydrological cycle on the oceanic  $\delta^{18}\text{O}$ . By contrast, all DE and DE\* scenarios well agree over the 10-3 ka BP time interval and indicate an excursion of 0.4 ‰ towards negative values. This deviation seems to be driven by the evolution of the ice core atmospheric  $\delta^{18}\text{O}$  signal (panel c). The potential origins of this cavity-shaped feature detected in all DE scenarios at the mid-Holocene period ( $\sim 6$  ka BP) will be discussed in the following sections.

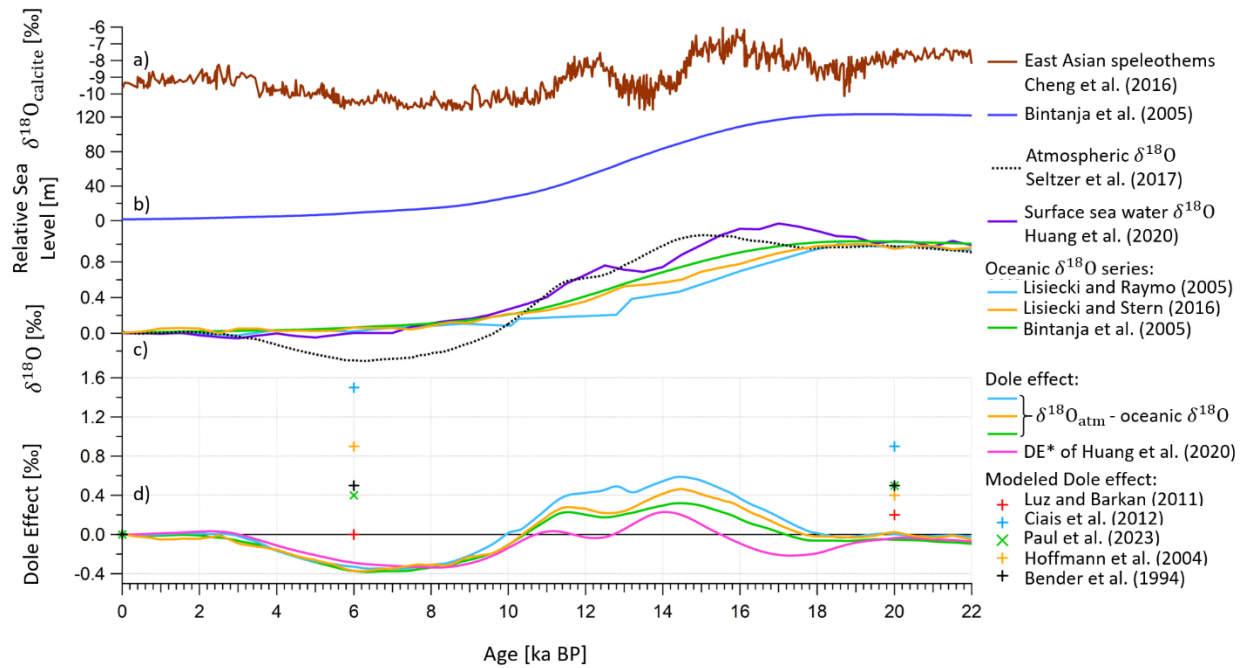


Figure 4. Different Dole effect scenarios calculated using marine and ice core  $\delta^{18}\text{O}$  data between 25 and 0 ka BP. a) Uranium-Thorium-dated  $\delta^{18}\text{O}_{\text{calcite}}$  from speleothems of Hulu and Sambaos caves (Cheng et al., 2016). b) Sea level relative to PI (Bintanja et al., 2005). c)  $\delta^{18}\text{O}$  series:  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  from WAIS Divide ice core on WD2014 age model (black dotted line) (Seltzer et al., 2017; Sigl et al. 2016) and surface sea water  $\delta^{18}\text{O}$  global stack on its radiocarbon age model (purple line) (Huang et al., 2020). The five oceanic  $\delta^{18}\text{O}$  series: (i) the benthic  $\delta^{18}\text{O}$  from the LR04 global stack (Lisiecki and Raymo, 2005) synchronized to the ice core age scale (blue line, Antarctic Ice Core Chronology 2023) (Parrenin et al., 2007; Bouchet et al., 2023), (ii) the benthic  $\delta^{18}\text{O}$  from the LS16 global stack on its radiocarbon age model (orange line) (Lisiecki and Stern, 2016) and (iii) the modeled ice-sheet contribution to oceanic  $\delta^{18}\text{O}$  (green line) (Bintanja et al., 2005). The benthic  $\delta^{18}\text{O}$  data have been scaled between 0 (PI) and 1 ‰ (LGM) values (Schrag et al., 1996). d) The five scenarios of Dole effect calculated as per  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  - oceanic  $\delta^{18}\text{O}$  for the five oceanic  $\delta^{18}\text{O}$  series (same colors) and the  $\text{DE}^*$  of Huang et al. (2020) (pink line). The crosses indicate the difference with respect to the pre-industrial period of the Dole effect at 6 ka and LGM as estimated by the different previous studies as summarized in Table 8 (here, we chose to display only the calculation of the Dole effect performed with the MIROC-ES2L model).

### 3. Material and Methods

#### 3.1. Study of oxygen isotope fluxes in multiplexed closed chambers on a variety of C3 and C4 plants

##### 3.1.1. Plant varieties

Different plants were chosen: *Musa acuminata*, *Nerium oleander*, *Cupressus sp.*, *Festuca arundinacea* and *Zea mays*. A first selection criterion was to have model plants (fescue and maize) no taller than 50 cm to fit into the biological chamber with the soil. In addition, we chose plants adapted to different climates (temperate and tropical) and plants with different anatomical characteristics. We also wanted to compare C3 and C4 plants, since C4 plants do not photorespire. The plants to be analyzed are presented in Table 2.

Table 2. Characteristics of the five plants studied in the biological experiments.

| Scientific name of the plant | Common name of the plant | Climate          | Characteristic                           | Photosynthesis strategy |
|------------------------------|--------------------------|------------------|--|-------------------------|
| <i>Festuca arundinacea</i>   | Fescue                   | Temperate        | Herbaceous plant                         | C3                      |
| <i>Nerium oleander</i>       | Laurel                   | Temperate - warm | Broadleaved evergreen shrub              | C3                      |
| <i>Musa acuminata</i>        | Banana tree              | Tropical         | Broadleaved evergreen herbaceous plant   | C3                      |
| <i>Cupressus sp.</i>         | Cypress                  | Temperate-cold   | Needleleaved evergreen tree              | C3                      |
| <i>Zea mays</i>              | Maize                    | Tropical         | Broadleaved summergreen herbaceous plant | C4                      |

### *3.1.2. Set-up of the study of the oxygen isotope fluxes on terrestrial plants in closed chambers*

#### *3.1.2.1. Set-up of the multiplexed chambers*

The general set-up of the experiments is equivalent to that referred to in Paul et al. (in prep). For each plant study (fescue, laurel, banana, maize, cypress and soil only), we used three biological chambers simultaneously.

The set of three airtight transparent welded polycarbonate chambers (120 L volume) were adapted from the chamber described in Paul et al. (2023) and Milcu et al. (2013). The main controlled environmental parameters inside the closed chambers were temperature, light intensity, CO<sub>2</sub> concentration, relative humidity and differential pressure. Each chamber was used as a closed gas exchange system, and placed in a separate controlled environment growth chamber, in the Microcosms experimental platform of the Montpellier European Ecotron. A multiplexing system has been built to be able to handle the three chambers in parallel (Paul et al., in prep). With this set-up, we continuously measured the isotopic composition of O<sub>2</sub> using an online optical spectroscopy instrument based on the Optical Feedback Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy (OF-CEAS) (Piel et al., in prep).

As in Paul et al. (in prep), we have also obtained IRMS measurements using a flanged air recovery system. In the studies of plants with soil, i.e. fescue 1, laurel, banana tree, maize 1 and cypress, we could not use the optical spectrometry analyzer system, as the instrument was under repair.

In the different studies performed with the optical spectrometer, we did two-point calibrations using two reference gases once every day. Because the measured difference in isotopic and elemental composition between the two reference gases was very stable over days, we used only one reference gas calibration (dry atmospheric air) during the

day. The measurement sequence was the following: - 6 min of measurement of atmospheric air - 6 min of measurement of air in chamber 1. This sequence was then applied to each of the three chambers and a full sequence lasted 36 min for the three chambers.

### 3.1.2.2. General strategy for experiments

We present here the general strategies of experiments carried out on maize, fescue, laurel, banana tree and cypress grown on a typical compost soil (*Terreau universel*, Botanic, France. Composition: black and blond peat, wood fiber, green compost and vermicompost, organic and organo-mineral fertilizers and micronutrient fertilizers) in three parallel closed chambers. These soil + plant experiments lasted between three and six days, alternating between dark and light periods (except for the cypress, only a dark period) as follows in Table 3. In addition to soil experiments, we chose to grow two plants in hydroponics: maize and fescue (called maize 2 and fescue 2 in Table 3). We studied fescue and maize under hydroponic conditions so as to dispense with the soil factor in discriminations calculations, to try to better understand the 3 ‰ discrimination found by Paul et al. (2023). Hydroponics makes it possible to study the biological fractions associated solely with the plant, and thus dispenses with the respiratory fractions of the soil. From a biological point of view, this discrimination raises the question of whether there is indeed a discrimination associated with photosynthesis, or whether it's just an effect of the soil respiration that counterbalances the effect of photosynthesis. All experiments are summarized in the Table 3.

Table 3. Experimental strategies for the five plants studied: experiment times for fescue and maize (1 for experiment 1 with soil and 2 for experiment 2 to compare hydroponic with soil experiment) and laurel, banana tree, cypress with soil and soil only. \* = the lack of data for fescue in hydroponic is the result of a leakage problem encountered at the end of the experiment for the last day period.

| Plant               | Duration of all experiment (day) | Day 1 duration (hour) | Night 1 duration (hour) | Day 2 duration (hour) | Night 2 duration (hour) | Day 3 duration (hour) | Analysis strategy |
|---------------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| Fescue 1 + soil     | 6                                | 7                     | 65                      | 7                     | 65                      | 7                     | IRMS              |
| Laurel + soil       | 4                                | 7                     | 19                      | 11                    | 21                      | 11                    | IRMS              |
| Banana tree + soil  | 6                                | 7                     | 66                      | 7                     | 65                      | 8                     | IRMS              |
| Maize 1 + soil      | 3                                | 9                     | 19                      | 11                    | 24                      | 12                    | IRMS              |
| Cypress + soil      | 5                                | X                     | 98                      | X                     | X                       | X                     | IRMS              |
| Soil                | 4                                | X                     | 97                      | X                     | X                       | X                     | IRMS              |
| Fescue 2 + soil     | 5                                | 10                    | 27                      | 11                    | 27                      | 13                    | IRMS + OF-CEAS    |
| Fescue 2 hydroponic | 4                                | 23                    | 31                      | 24                    | 22                      | *                     | OF-CEAS           |
| Maize 2 with soil   | 6                                | 5                     | 38                      | 6                     | 57                      | 10                    | IRMS + OF-CEAS    |
| Maize 2 hydroponic  | 5                                | 10                    | 54                      | 9                     | 57                      | 7                     | IRMS + OF-CEAS    |



### 3.1.2.3. Hydroponic experiment strategy

The principle of hydroponic cultivation is described below:

For maize, 15 seeds per petri dish were placed on crushed clay beads (which have been previously washed with bleach to avoid contamination by bacteria/fungi/algae). The petri dishes were placed in the dark. After two days, the seeds had germinated and their roots were sufficiently developed for hydroponic cultivation. The seeds were transplanted into Eppendorfs tubes (1 cm in diameter) with the bottom cut off. The Eppendorfs were then inserted through a polystyrene plate ( $L \times P \times H = 340 \times 240 \times 7$  mm) previously drilled with 12 holes divided into four rows of three holes along its length. This polystyrene plate rested on the surface of a 12 L plastic tray filled with 10 L of nutrient solution. The roots were in permanent contact with the nutrient solution, and the maize plants have grown above the polystyrene support to reach a height of around 30 cm after a cultivation period of one month. Germination and growth times were similar to those for growing maize plants in soil. The nutrient solution was changed twice a week.

For fescue, seeds were spread over the surface of plastic garden pots ( $L \times D \times H = 70 \times 70 \times 80$  mm). The pots were filled with sand previously rinsed with diluted bleach. Pots were grouped by 12 and placed in plastic basins ( $L \times D \times H = 290 \times 440 \times 70$  mm) containing nutrient solution. The pots were irrigated by capillary action through the sand, and the nutrient solution was renewed twice a week to prevent bacterial contamination and algae growth. The seeds germinated and the fescue plants grew on the sand for about one month. Once the fescue plants were sufficiently robust (strands of around 10 cm), the intertwined roots formed a clod of fescue that was easier to handle than a single strand. The clods were removed from their pots and the roots plunged into a tub of osmosis water before being rinsed to remove all the sand. The root balls were then transplanted into the hydroponics tank through a polystyrene plate ( $L \times D \times H = 360 \times 260 \times 7$  mm).

This polystyrene plate, pierced with 12 square holes (15 × 15 mm), could accommodate 12 fescue clods. This plate rested on the surface of a 9 L plastic tray (W × D × H = 400 × 300 × 100 mm) containing nutrient solution. The nutrient solution was changed twice a week, and the growing time in the nutrient solution (roots in contact with it) lasted about two weeks to one month.

As the plants grew in the nutrient solution, an aquarium pump (Brand: Nicrew/model YDQB4105) was connected to a bubbler which was placed in the solution to oxygenate the aqueous medium.

The nutrient solution was produced using 11 powders (Sigma/Aldrich) and osmosed water. A first one-liter stock solution was produced by mixing powders 2 to 11 (Table 4) in 1 L of aqueous solution (osmosis water) in a volumetric flask. The concentrations of each chemical element are given in Table 4 for this first solution produced. The maizestock solution was four times more concentrated for all elements. Next, a dilution was made: 12.5 mL of Fescue stock solution was mixed in a 5 L Erlenmeyer flask filled with osmosis water, and 5 mL of maizestock solution in a 5 L Erlenmeyer flask. Concentration stock solution values are given in Table 4. Calcium nitrate powder no.1 (7.08 g for the maizestock solution and 1.77 g for the fescue stock solution) was mixed into the solution at this point, as otherwise this powder would not dissolved in the first stock solution. These working solutions were then placed in the trays where the plants were deposited. For fescue, 7.5 L of daughter solution in the 9 L tub, and for maize, 10 L of daughter solution in the 12 L tub.

Table 4. Composition of the 11 powders and concentrations stock solution for fescue and maize.

| No. Powder | Chemical formula                                       | Name  | Concentration stock solution fescue (mM) | Concentration stock solution maize (mM) |
|------------|--|---|--|---|
| 1          | Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O | Calcium nitrate tetrahydrate                                      | 1.5                                      | 6                                       |
| 2          | KNO <sub>3</sub>                                       | Potassium nitrate   | 1.25                                     | 5                                       |
| 3          | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | Potassium phosphate monobasic                                     | 0.5                                      | 2                                       |
| 4          | MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O                 | Magnesium sulfate heptahydrate                                    | 0.75                                     | 3                                       |
| 5          | Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 5 H <sub>2</sub> O  | Sodium metasilicate pentahydrate                                  | 0.1                                      | 0.4                                     |
| 6          | Na-Fe-EDTA   | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> NaFeO <sub>8</sub> | 0.05                                     | 0.2                                     |
| 7          | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | Boric acid  | 0.05                                     | 0.2                                     |
| 8          | MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O                   | Manganese sulfate monohydrate                                     | 0.012                                    | 0.048                                   |
| 9          | ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O                 | Zinc sulfate heptahydrate   | 0.001                                    | 0.004                                   |
| 10         | CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O                  | Copper sulfate pentahydrate                                       | 0.0007                                   | 0.0028                                  |
| 11         | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O  | Sodium molybdate dihydrate  | 0.00024                                  | 0.00096                                 |

Hydroponics experiments lasted between four and six days, with alternating dark and light periods as follows in Table 3.

### 3.2. Quantification of fractionation factors associated with respiration and photosynthesis processes

In order to calculate the fractionation factors associated with dark respiration and photosynthesis of soil and plants, we use the following equations 6 and 8 (for details, refer to Paul et al., 2023).

The isotopic discrimination for dark respiration,  $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$ , is given by:

$$^{18}\epsilon_{dark\_respi} = ^{18}\alpha_{dark\_respi} - 1 = \frac{\ln\left(\frac{\delta^{18}O_t + 1}{\delta^{18}O_{t0} + 1}\right)}{\ln\left(\frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}}\right)} \quad (6)$$

Where  $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$  is the dark respiration fractionation factor,  $t_0$  is the starting time of each dark period and  $t$  is the time of the experiment.

$\frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}}$  is linked to  $\delta\left(\frac{O_2}{N_2}\right)$  as:

$$\frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}} = \frac{\frac{\delta\left(\frac{O_2}{N_2}\right)_t + 1}{1000}}{\frac{\delta\left(\frac{O_2}{N_2}\right)_{t0} + 1}{1000}} \quad (7)$$

Photosynthesis fractionation factor,  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$ , is calculated as:

$$^{18}\alpha_{photosynthesis} = \frac{n(O_2)_t / n(O_2)_{t0} \times a^{18}R + ^{18}R_t \times (F_{photosynthesis} - F_{total\_respi} + ^{18}\alpha_{total\_respi} \times F_{total\_respi})}{^{18}R_{lw} \times F_{photosynthesis}} \quad (8)$$

Where,  $^{18}R$  is the ratio of the concentration  $^{18}R = \frac{n(^{18}O)}{n(^{16}O)}$  with  $n$  the number of moles of  $O_2$  containing  $^{18}O$  or  $^{16}O$ ,  $a^{18}R = \frac{d^{18}R}{dt}$ , during the light period,  $F_{photosynthesis}$  and  $F_{total\_respi}$  are, respectively, photosynthesis and consumption processes fluxes of oxygen and  $lw$  stands for leaf water.

$^{18}\alpha_{photosynthesis}$  depends on the values of  $^{18}\alpha_{total\_respi}$  and of  $F_{total\_respi}$ , themselves depend on the values of  $^{18}\alpha_{Mehler}$  (fractionation factor associated with Mehler reaction),  $F_{Mehler}$  (flux of oxygen related to Mehler reaction),  $^{18}\alpha_{dark\_respi}$ ,  $F_{dark\_respi}$ ,  $^{18}\alpha_{photorespi}$  (fractionation factor associated with photorespiration) and  $F_{photorespi}$  (photorespiration flux of oxygen).

We have:

$$^{18}\alpha_{total\_respi} = ^{18}\alpha_{photorespi} \times f_{photorespi} + ^{18}\alpha_{Mehler} \times f_{Mehler} + ^{18}\alpha_{dark\_respi} \times f_{dark\_respi} \quad (9)$$

With,

$$f_{dark\_respi} + f_{photorespi} + f_{Mehler} = 1 \quad (10)$$

And,

$$\frac{F_{dark\_respi}}{F_{total\_respi}} = f_{dark\_respi} \quad (11)$$

$f$  indicates the fraction of the total oxygen uptake flux corresponding to each process (dark respiration, photorespiration and Mehler reaction).

Because maize is a C4 plant, we consider that photorespiration and Mehler reaction were not involved in the O<sub>2</sub> consumption by the plant (Laisk and Edwards, 1997) which makes calculations of  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$  easier.

For C3 plants, we need to consider photorespiration and Mehler reactions. In the absence of further constraints, we used here, as first approximation, the global values from Landais et al. (2007) for  $f_{dark\_respi}$  (0.6),  $f_{photorespi}$  (0.3) and  $f_{Mehler}$  (0.1). Values for  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$  and  $^{18}\epsilon_{Mehler}$  were based on the most recent estimates of Helman et al. (2005). The initial value for photorespiration isotopic discrimination is - 21.3 ‰ for  $^{18}\epsilon_{photo\_respi}$  as given by Helman et al. (2005). For the Mehler reaction we also chose the value proposed by Helman et al. (2005):  $^{18}\epsilon_{Mehler} = - 10.8$  ‰. For more details, see Paul et al. (2023).

We also calculate the fractionation factors associated with only photosynthesis of plant during light period assuming zero respiratory flux because the flux of oxygen uptake is difficult to estimate during the day. We note this fractionation: the net photosynthesis fractionation. Then, we only focus on the light period during which the plant produces oxygen by photosynthesis.

$$dn(O_2) \times \alpha_{photo_{net}} \times {}^{18}R_{lw} + n(O_2)_t \times {}^{18}R_t = n(O_2)_{t+1} \times {}^{18}R_{t+1} \quad (12)$$

$$(\alpha_{photo_{net}} \times {}^{18}R_{lw} - {}^{18}R_t) \times dn(O_2) = n(O_2)_t \times d^{18}R_{t+1} \quad (13)$$

After integration,

$$\frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}} = \frac{\alpha_{photo_{net}} \times {}^{18}R_{lw} - {}^{18}R_{t0}}{\alpha_{photo_{net}} \times {}^{18}R_{lw} - {}^{18}R_t} \quad (14)$$

$$\alpha_{photo\_net} = \frac{{}^{18}R_{t0} - \frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}} \times {}^{18}R_t}{{}^{18}R_{lw} \times \left(1 - \frac{n(O_2)_t}{n(O_2)_{t0}}\right)} \quad (15)$$

### 3.3. Presentation of PMIP model used and GPP-O<sub>2</sub> calculations on plants selected for experiments using model outputs

For estimate of Dole effect variations with time, we calculate the global GPP-O<sub>2</sub> in terrestrial- and ocean biosphere using the outputs of Paleoclimate Modelling Intercomparison Project (PMIP) simulations. We use the IPSL-CM5A (PMIP3), MIROC-ESM (PMIP3), and MIROC-ES2L (PMIP4) models since these provide both land and ocean biogeochemistry results for pre-industrial (PI), mid-Holocene (MH) 6ka, and Last Glacial Maximum (LGM) experiments and available for download on the Earth System Grid Federation (ESGF) database.

The global mean GPP-O<sub>2</sub> is calculated from PMIP data following the methodologies described by Blunier et al. (2002) with some modification. In terrestrial biosphere, the models calculate the gross carbon productivity (GPP-C) of each plant functional type (PFT). The modelled global GPP-C is partitioned between GPP-C by C3 plants and GPP-C by C4 plants. The Earth System Models usually have one or two PFT of C4 grass. We therefore partition GPP-C by C3 and GPP-C by C4 plants by assuming that all PFTs other than C4 grass are C3 plants. A portion of photosynthetic production of O<sub>2</sub> in the C3 plants is consumed via photorespiration. Here we assume no photorespiration in C4 plants. To estimate the GPP-C of C3 plants without consumption by photorespiration, the ratio of total (i.e., dark respiration and photorespiration) to dark respiration is multiplied by the

GPP-C of C3 plants. Following von Caemmerer and Farquhar (1981), this ratio is calculated as following:

$$\frac{\text{Dark respiration} + \text{Photorespiration}}{\text{Dark respiration}} = \frac{4.5}{4} \times \frac{C_i + (7/3) \times \Gamma_*}{C_i - \Gamma_*} \quad (16)$$

where  $C_i$  is the partial pressure of  $\text{CO}_2$  inside the leaf and  $\Gamma_*$  is the  $\text{CO}_2$  compensation point. To calculate  $C_i$ , we assume a constant ratio (0.65) of  $C_i$  following Blunier et al. (2002). The  $\text{CO}_2$  compensation point is calculated according to the following equation by Prentice et al. (2017) to account for temperature changes:

$$\Gamma_* = 42.75 \times \exp \left[ \frac{37830 \text{ J mol}^{-1}}{8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}} \times \left( \frac{1}{298} - \frac{1}{T_K} \right) \right] \quad (17)$$

here  $T_K$  is temperature in Kelvin, and is taken from the simulated 2-meter air temperature by the models. The resulting ratio of dark respiration and photorespiration to dark respiration is ranging between 1.9 and 2.4 depending on the model used and the boundary conditions. The GPP-C is converted to GPP- $\text{O}_2$  by multiplying the photosynthetic quotient of 1.07 (Keeling, 1988). To take into account the Mehler reaction, the GPP- $\text{O}_2$  is then divided by 0.9 assuming a constant fraction (10 %) of Mehler reaction in the consumption of  $\text{O}_2$ . as



The marine biogeochemistry components of the PMIP models do not calculate marine GPP-O<sub>2</sub>. Instead, we calculate the marine GPP-O<sub>2</sub> from the simulated net primary productivity in terms of carbon (NPP-C) by multiplying by 2.7, the ratio of <sup>18</sup>O-based GPP-O<sub>2</sub> (measured by incubation with <sup>18</sup>O-labelled water) to <sup>14</sup>C-based primary production rate (measured by incubation with <sup>14</sup>C-labelled bicarbonate) found in the compilation of the JGOFS (Joint Global Ocean Flux Study) measurements (Marra, 2002).

## 4. Results

### 4.1. Study of oxygen isotopes fractionation factors in multiplexed closed chambers on a variety of C3 and C4 plants

#### *4.1.1. Oxygen isotopes fractionation factors on a variety of C3 and C4 plants with soil by IRMS analysis*

We present here the discrimination associated with dark respiration, photosynthesis and net photosynthesis of experiments carried out on fescue, banana tree, laurel and cypress with soil (Table 5).

Table 5. Average and standard deviation of the isotopic discriminations of fescue, banana tree, laurel and cypress over three chambers and the number of measurement (isotopic and elemental composition of oxygen) for each experiment. Isotopic compositions were analyzed by IRMS. X = no light period, thus no  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  value for cypress experiment. \* Photosynthetic flux is low during the day and barely compensates for respiratory flux, so the net photosynthetic flux was considered to be almost zero and the associated isotopic discrimination could not be calculated.

|             | $^{18}\epsilon_{\text{dark\_respi}}$ | $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$ | $^{18}\epsilon_{\text{photo\_net}}$ | Number of data |
|-------------|--------------------------------------|---|-------------------------------------|----------------|
| Fescue      | -16.9 ± 2.6                          | 5.0 ± 2.4                               | 4.0 ± 2.9                           | 22             |
| Banana tree | -19.2 ± 2.2                          | 10.4 ± 5.6                              | 8.0 ± 6.8                           | 22             |
| Laurel      | -21.4 ± 5.8                          | 13.3 ± 3.3                              | *                                   | 18             |
| Cypress     | -17.6 ± 0.6                          | X                                       | X                                   | 9              |

The overall  $^{18}\epsilon_{\text{dark\_respi}}$  values range from around - 16 to - 21 ‰. It can be seen that the values of  $^{18}\epsilon_{\text{dark\_respi}}$  for banana and laurel are stronger than for fescue and cypress (the same observation can be done for  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$ ). We note that  $^{18}\epsilon_{\text{photo\_net}}$  has lower values than  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  (lower by at least 1 ‰). We can see that for each plant, a positive discrimination exists for photosynthesis, which is between 5 and 13 ‰. Some high values are also the result of high uncertainties in our measurements.

#### 4.1.2. Comparison of oxygen isotopes fractionation factors on hydroponics and with soil experiments for a C3 (fescue) and C4 (maize) plants by OF-CEAS and IRMS analysis

We present here the discrimination associated with dark respiration, photosynthesis and net photosynthesis of experiments carried out on fescue and maize with soil and without soil under hydroponic conditions (Table 6).

Table 6. Average and standard deviation of the isotopic discriminations of fescue and maize over three chambers and the number of measurement (isotopic and elemental composition of oxygen) for each hydroponic and with soil experiment. X = the lack of data for fescue in hydroponics is the result of a leakage problem (at the level of the sampling of the flask system) encountered at the end of the experiment for the last day period.

| Plants            | $^{18}\epsilon$                  | Average (‰) and standard deviation over 3 chambers |             | Number of data |         |
|-------------------|----------------------------------|--|-------------|----------------|---------|
|                   |                                  | IRMS   | OF-CEAS     | IRMS           | OF-CEAS |
| Maize with soil   | $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$    | -17.8 ± 0.9  | -16.1 ± 1.1 | 18             | 249     |
|                   | $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$ | 3.2 ± 2.6  | 9.6 ± 5.4   | 21             | 78      |
|                   | $^{18}\epsilon_{photo\_net}$     | 2.8 ± 2.7  | 9.9 ± 6.1   |                |         |
| Maize hydroponic  | $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$    | -16.7 ± 1.5  | -18.9 ± 4.7 | 12             | 264     |
|                   | $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$ | 7.7 ± 3.3  | 6.1 ± 3.8   | 16             | 93      |
|                   | $^{18}\epsilon_{photo\_net}$     | 7.8 ± 3.4  | 6.0 ± 4.2   |                |         |
| Fescue with soil  | $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$    | -18.9 ± 0.6  | -19.0 ± 1.9 | 10             | 180     |
|                   | $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$ | 4.3 ± 1.2  | 4.7 ± 2.8   | 10             | 108     |
|                   | $^{18}\epsilon_{photo\_net}$     | 1.9 ± 3.7  | 3.9 ± 3.0   |                |         |
| Fescue hydroponic | $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$    | X  | -22.1 ± 7.4 | X              | 183     |
|                   | $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$ | X  | 8.4 ± 3.1   | X              | 164     |
|                   | $^{18}\epsilon_{photo\_net}$     | X  | 9.4 ± 4.1   |                |         |
| Soil only         | $^{18}\epsilon_{soil\_respi}$    | -15.4 ± 1.1  | -17.8 ± 0.8 | 12             | 339     |

The overall  $^{18}\epsilon_{dark\_respi}$  values (Table 6) range from around - 16 to - 19 ‰ for plant + soil experiment. For hydroponic experiments we can notice that the isotopic discriminations associated with respiration is stronger when plants are without soil (except for the maize experiment with IRMS). We cannot here notice a difference on respiration discrimination between C3 and C4 plants (fescue and maize) on OF-CEAS or IRMS analyses. For  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$ , we note that  $^{18}\epsilon_{photo\_net}$  is lower than  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$  by at least 1 ‰. We can see that for each plant, a positive discrimination exists for photosynthesis, which is between 5 and 13 ‰. Some high values may also result from high uncertainties in our

measurements (especially OF-CEAS). It should also be noted that measurement uncertainty is higher when measurements have been made using the OF-CEAS technique rather than the IRMS, but this does not prevent us from being able to interpret the data (Table 6).

## 4.2. Estimate of GPP-O<sub>2</sub> quantification of model outputs

We present here the GPP-O<sub>2</sub> of ocean and land calculated by three models: MIROC-ES2L, IPSL-CM5A-LR and MIROC-ESM for the preindustrial period (PI), 6 ka BP period and LGM period (Table 7).

*Table 7. Output results from the MIROC-ES2L, IPSL-CM5A-LR and MIROC-ESM terrestrial and oceanic GPP-O<sub>2</sub> (Pmol O<sub>2</sub>/yr) models during the pre-industrial period (PI), at 6 ka BP and during the LGM (last glacial maximum).*

|                 | Model            | Domain | PI GPP-O <sub>2</sub><br>(Pmol O <sub>2</sub> /yr) | 6 ka GPP-O <sub>2</sub><br>(Pmol O <sub>2</sub> /yr) | LGM GPP-O <sub>2</sub><br>(Pmol O <sub>2</sub> /yr) |
|-----------------|------------------|--------|--|--|---|
| PMIP4-<br>CMIP6 | MIROC-ES2L       | Ocean  | 0.67   | 0.67   | 0.68  |
|                 |                  | Land   | 2.42   | 2.31   | 1.66  |
| PMIP3-<br>CMIP5 | IPSL-CM5A-<br>LR | Ocean  | 0.79   | 0.81   | 0.70  |
|                 |                  | Land   | 2.68   | 2.70   | 1.36  |
|                 | MIROC-ESM        | Ocean  | 0.66   | 0.69   | 0.66  |
|                 |                  | Land   | 3.30   | 3.50   | 2.35  |

We can see for all model outputs that the terrestrial GPP-O<sub>2</sub> is always at least three times greater than the oceanic GPP-O<sub>2</sub> for each time period. We also note that oceanic GPP-O<sub>2</sub> does not vary over time. However, terrestrial GPP-O<sub>2</sub> is twice as high at preindustrial

period and 6 ka BP than at LGM (2.4 and 1.7 Pmol O<sub>2</sub>/yr respectively for MIROC-ES2L model).

## 5. Discussion

### 5.1. Interpretation of the respiratory and photosynthesis discriminations observed on the diversity of plants and experiments

#### 5.1.1. Comparison between different types of plants

The results given in Table 5, for fescue, banana tree, laurel and cypress, all grown on soil, show terrestrial respiratory <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O discrimination (greater than - 17 ‰) in agreement with the literature: - 17 ‰ in Paul et al. (2023) for fescue grown on soil and - 18 ‰ in Guy et al. (1993) on a diversity of terrestrial plants (- 17 to - 19 ‰ for COX respiration). The same conclusion can be drawn from the data for maize and fescue with soil in Table 6.

All plants studied here show terrestrial photosynthetic discrimination as in Paul et al. (2023). This is opposite to the classical use of a <sup>18</sup>ε<sub>photosynthesis</sub> of 0 ‰ for terrestrial plants (Guy et al. (1993), Helman et al. (2005).

However, we can note that for banana tree and laurel, the terrestrial respiratory discrimination is slightly higher than 17 ‰, i.e. more than 20 ‰. One hypothesis is that these organisms have thicker leaf tissue (sclerenchyma), in which diffusion is stronger, thus increasing the discrimination value. Particular attention should be paid to the fact that the uncertainty of these measurements is quite high.

C3 and C4 plants cannot be distinguished in terms of respiratory discrimination. Therefore, it is impossible to draw conclusions about the typical value of respiratory discrimination for either type of plant from the experiments conducted (Table 6).

### *5.1.2. Comparison between plants/soil and hydroponics experiments*

Hydroponics experiments enable study of only plant respiration (i.e. without soil respiration). The isotopic discrimination associated with respiration is stronger for plants alone than when respiration is also taking place (for example maize with soil measured with OF-CEAS: -16.1 ‰ and hydroponic: -18.9 ‰, except for maize measured with IRMS). We can conclude from this observation that plant dark respiration fractionates more than soil respiration (Angert et al., 2001). This result is supported by our determination of  $^{18}\epsilon_{respi\_soil}$  which is lower (- 15.4 ‰) than the  $^{18}\epsilon_{respi\_plant}$  values with plants involved ( $^{18}\epsilon_{respiration}$  between - 16 ‰ and - 19 ‰). Our results agree with previous studies who found a lower  $^{18}\epsilon_{respi\_soil}$  because of diffusion (Angert et al., 2001, - 15.4 ‰) than for  $^{18}\epsilon_{respi\_plant}$  (Paul et al., 2023, - 19.1 ‰ for fescue).

## **5.2. The existence of the terrestrial photosynthesis fractionation**

Previous experiments performed on mesophyll cells (Guy et al., 1993) and on cyanobacteria in the absence of O<sub>2</sub> (Helman et al., 2005) in lab conditions concluded that photosynthesis was not fractionating. However, Eisenstadt et al. (2010) performed lab experiments similar to those of Helman et al. (2005) and found a positive discrimination for aquatic organisms. Paul et al. (2023) also identified a positive discrimination (+ 3.7 ‰) with terrarium experiments similar to the set-up used here. Because these estimates are

crucial for accurately interpreting and understanding the implications of the Dole effect, it is imperative to confirm or refute these outcomes.

When we calculated the value for  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  in Tables 5 and 6, we found a positive discrimination value for each species studied. Because the calculation of  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  depends on the oxygen uptake, we also calculated a net photosynthetic discrimination ( $^{18}\epsilon_{\text{photo\_net}}$ ) making the extreme hypothesis that no oxygen uptake occurs in parallel to the photosynthesis. Since oxygen uptake has the effect of increasing  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in the biological chamber while photosynthesis has the opposite effect on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ ,  $^{18}\epsilon_{\text{photo\_net}}$  is the minimum possible value for  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  in these conditions. We could only estimate the  $^{18}\epsilon_{\text{photo\_net}}$  for two species (fescues and banana) and the lowest value is 4 ‰. A second source of uncertainty which could affect our result is the value of the discrimination associated with oxygen uptake. For the fescue experiment, i.e. the one with the smallest  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  a discrimination for terrestrial respiration of - 40 ‰ should be imposed so that the calculated  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  is equal to zero. This value is unrealistic with respect to the values for  $^{18}\epsilon_{\text{respiration}}$  determined in the previous section or in any previous studies. The last source of uncertainty in our calculation is the value of the leaf water isotopic composition. During experiments, it was observed that the  $\delta^{18}\text{O}$  of irrigation water increased (Paul et al., 2023), so a high value was measured. To achieve zero photosynthetic fractionation for fescue, the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  should be increased from 5 ‰ to 9 ‰. Our determination of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  is certainly overestimated since  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  is measured at the end of the experiments (we have observed that  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  was increasing by up to 2 ‰ during the course of an experiment). This observation however suggests that the estimated value of 5 ‰ for  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  is a maximum value so that we cannot explain a wrong estimate of  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  by this possible overestimate of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$ .

We thus conclude that in terrarium experiments which is the closest analog for real conditions in this type of experiment,  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  is positive.

The photosystem II process of O<sub>2</sub> generation through water oxidation by the oxygen evolving complex cannot easily be associated with oxygen fractionation (Tcherkez and Farquhar, 2007). Involving preferential diffusion of the lightest isotopologues in the stomates (either preferential diffusion of H<sub>2</sub><sup>16</sup>O vs H<sub>2</sub><sup>18</sup>O in the leaf water before photosynthesis or preferential diffusion of <sup>16</sup>O<sup>16</sup>O vs <sup>16</sup>O<sup>18</sup>O of produced O<sub>2</sub> after photosynthesis) would also go into the wrong direction. These diffusion effects would indeed lead to a lower difference between  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub> in the atmosphere of the biological chamber than the true difference and hence to an underestimated value of  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$ . The last possible hypothesis would be that an additional oxygen consuming process occurs during photosynthesis (Eisenstadt et al., 2010). This process should be associated to a strong negative discrimination to compensate for the calculated  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$ . Summarizing, we cannot yet explain why  $^{18}\epsilon_{\text{photosynthesis}}$  is associated with a positive isotopic discrimination. However, coherent observations for several terrarium experiments and several plants suggest that this discrimination is true and should be considered when calculating a global budget for the Dole effect.

### 5.3. Implications of these fractionation factors for interpreting the global Dole effect

We use here the latest estimates of the different fractionation factors and global estimates of terrestrial and oceanic productivities during the last deglaciation to reevaluate the main drivers of the Dole effect. In particular, we aim to decipher the role of the low latitude



hydrological cycle (i.e.  $\delta^{18}\text{O}$  of soil and leaf water) and the role of the ratio of terrestrial to oceanic productivity as the main drivers of the Dole effect variations in the past.

The new experiments carried out in this study confirm the existence of a positive discrimination associated with terrestrial photosynthesis as presented in the work of Paul et al. (2023). Also, the discrimination values observed during respiration agree with those suggested by Paul et al. (2023). Thus, using the new results given in Paul et al. (2023) (Fig.5), we can calculate a Dole effect of 25.1 ‰, as shown in Table 1.

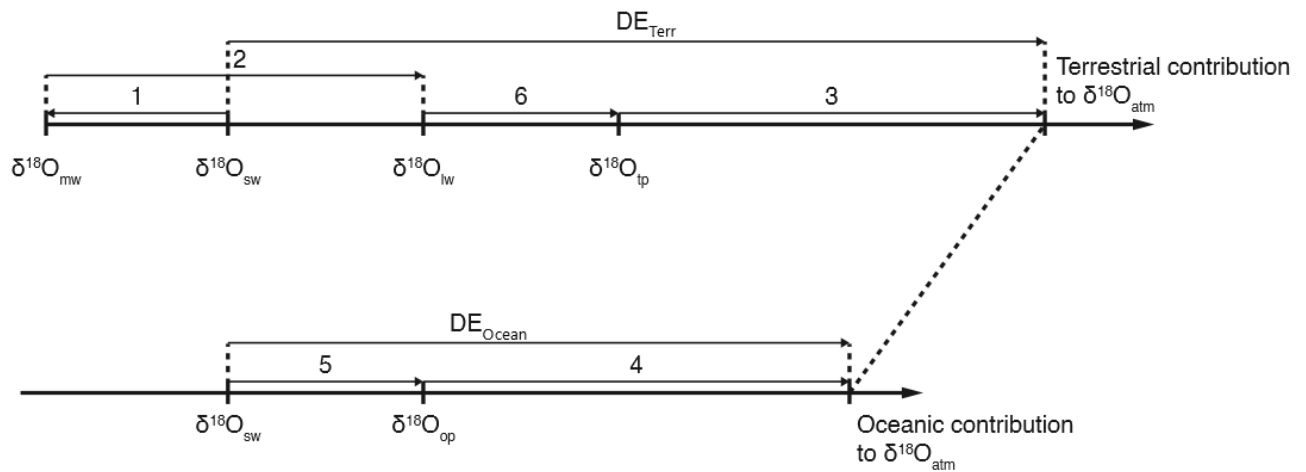


Figure 5. Diagram of the main contributions to  $\delta^{18}\text{O}_{atm}$ . (1) Fractionation of water associated with evaporation and precipitation. (2) Fractionation of water associated with evapotranspiration. (3) Fractionation of atmospheric oxygen associated with terrestrial respiration and mixing with oxygen issued from leaf photosynthesis. (4) Fractionation of atmospheric oxygen associated with oceanic respiration and mixing with oxygen issued from oceanic photosynthesis. (5) Fractionation associated with oceanic photosynthesis. (6) Fractionation associated with terrestrial photosynthesis.  $DE_{Terr}$  = terrestrial Dole effect and  $DE_{Oceanic}$  = oceanic Dole effect (modified from Landais et al., 2007).

For this calculation, we rely as much as possible on the latest available estimates for isotopic discrimination (Paul et al., 2023) including the finding that  $^{18}\epsilon_{photosynthesis}$  is positive and estimated to 3.7 ‰. The value of  $^{18}\epsilon_{dark_respi}$  has been slightly revised by

Paul et al. (2023) to 17 ‰ from that given by Luz and Barkan (2011) of 17.7 ‰. With these new estimates, we end up with a respectively terrestrial and oceanic Dole effect of 22.9 and 26.5 ‰ in the study of Paul et al. (2023) compared to 23.5 and 23.5 ‰ in the latest study of Luz and Barkan (2011). Oldest Dole effect estimates are displayed in Table 1.

Because we are interested in the change of the Dole effect over the last deglaciation, we also need to estimate Dole effect for the last glacial maximum as it was done by Ciais et al. (2012). In line with previous studies, we assume that the isotopic discrimination for the different biological processes does not vary with time. However,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  value varies during this period (Ciais et al., 2012) as well as  $^{18}\epsilon_{\text{soil\_respi}}$  and the ratio between C3 and C4 plants which affects the value for global  $^{18}\epsilon_{\text{respiration}}$  due to its influence on photorespiration proportion (Landais et al., 2007). The change in the proportion of C3 and C4 plants is calculated by the models presented in Section 3.3. and results in a variation of less than 0.1 ‰ on the global  $^{18}\epsilon_{\text{respiration}}$ . The change in  $^{18}\epsilon_{\text{soil\_respi}}$  was calculated by Landais et al. (2007); it is 0.5 ‰ stronger during the LGM than today, resulting in a variation of less than 0.3 ‰ for the global  $^{18}\epsilon_{\text{respiration}}$ . Finally,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  is higher during the LGM by 1 ‰ compared to the pre-industrial period. Because the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{ocean}}$  value is also higher by 1 ‰ during the LGM, we estimate that the terrestrial DE is higher by 0.3 ‰ during the LGM compared to today. The oceanic Dole effect for LGM is assumed similar to the present one.

Table 8 display the results for the global DE with our most recent estimates.

Table 8. Global Dole effects based on GPP-O<sub>2</sub> variations of three model outputs (MIROC-ES2L, IPSL-CM5A-LR and MIROC-ESM) for three different periods (pre-industrial period (PI), 6 ka BP and LGM) (a) and adding the photosynthetic fractionation value of Paul et al. (2023) (b). These calculations were made using equation 6.

a)

|               |              | Bender et al. (1994) | Hoffmann et al. (2004) | Luz and Barkan (2011) | Ciais et al. (2012) | Paul et al. (2023) |
|---------------|--------------|----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| Preindustrial | IPSL-CM5A-LR | 21.3                 | 24.3                   | 23.2                  | 26.4                | 25.5               |
|               | MIROC-ES2L   | 21.3                 | 24.4                   | 23.2                  | 26.5                | 25.5               |
|               | MIROC-ESM    | 21.5                 | 24.9                   | 23.2                  | 26.9                | 25.7               |
| 6 ka BP       | IPSL-CM5A-LR | 21.3                 | 24.3                   | 23.2                  | 26.3                | 25.3               |
|               | MIROC-ES2L   | 21.3                 | 24.4                   | 23.2                  | 26.4                | 25.5               |
|               | MIROC-ESM    | 21.5                 | 24.9                   | 23.2                  | 26.9                | 25.7               |
| LGM           | IPSL-CM5A-LR | 21.1                 | 23.4                   | 23.2                  | 25.4                | 25.4               |
|               | MIROC-ES2L   | 21.3                 | 23.9                   | 23.2                  | 25.8                | 25.6               |
|               | MIROC-ESM    | 21.6                 | 24.6                   | 23.2                  | 26.4                | 25.8               |

b)

|               |                  | Bender et al.<br>(1994) | Hoffmann et<br>al. (2004) | Luz and<br>Barkan<br>(2011) | Ciais et al.<br>(2012) |
|---------------|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Preindustrial | IPSL-<br>CM5A-LR | 24.2                    | 27.2                      | 26.1                        | 25.3                   |
|               | MIROC-<br>ES2L   | 24.2                    | 27.3                      | 26.1                        | 25.4                   |
|               | MIROC-<br>ESM    | 24.6                    | 28.0                      | 26.3                        | 26.9                   |
| 6 ka BP       | IPSL-<br>CM5A-LR | 24.1                    | 27.1                      | 26.0                        | 25.3                   |
|               | MIROC-<br>ES2L   | 24.2                    | 27.2                      | 26.1                        | 25.4                   |
|               | MIROC-<br>ESM    | 24.6                    | 28.1                      | 26.3                        | 26.9                   |
| LGM           | IPSL-<br>CM5A-LR | 23.5                    | 25.8                      | 25.8                        | 24.9                   |
|               | MIROC-<br>ES2L   | 23.7                    | 26.3                      | 25.8                        | 25.1                   |
|               | MIROC-<br>ESM    | 24.2                    | 27.3                      | 26.1                        | 25.3                   |

In general, our determinations for the pre-industrial DE are slightly higher than the measured values. When looking at the LGM values, we find very similar values for the Dole effect compared to the values for the pre-industrial Dole effect. This result does not depend on the model used to calculate the GPP-O<sub>2</sub> and agrees with the measurements showing similar Dole effect for the pre-industrial period and for the LGM. For the 6 ka Dole effect, if we keep the same values for terrestrial and oceanic Dole effect than at the pre-industrial period, we do not predict any change in the calculated Dole effect while

there is huge change in the measured Dole effect. With very similar values for terrestrial and oceanic Dole effects, it is impossible to explain the change in the Dole effect by a change in the ratio of terrestrial vs oceanic gross primary productivity. We thus conclude that oceanic or terrestrial Dole effects vary with time and that the DE variations observed in ice cores cannot be explained by fluctuations in the relative proportions of oceanic and terrestrial gross primary productivity as suggested by Bender et al. (1994) and by Ciais et al. (2012). In their case, the oceanic and terrestrial Dole effects have very different values. We thus confirm previous studies suggesting that variations in the Dole effect are mainly resulting from low latitude changes in hydrological cycle leading to changes in  $\delta^{18}\text{O}$  of the meteoric water transmitted to  $\delta^{18}\text{O}$  of soil water, to  $\delta^{18}\text{O}_{\text{lw}}$  and to  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  through photosynthesis (Landais et al., 2007; Severinghaus et al., 2009; Seltzer et al., 2017; Huang et al., 2020). This would well explain the 6 ka minimum in DE which is also captured in the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{calcite}}$  of low latitude speleothem, also sensitive to variations in  $\delta^{18}\text{O}$  of meteoric water (Hu et al., 2019).

## 6. Conclusion

In this article, we studied a variety of plants (fescue, laurel, banana, maize, cypress and soil only) using multiplexing system (Paul et al., in prep) in order to quantify more precisely the fractionations associated with biological processes such as respiration and terrestrial photosynthesis. Our study is already in agreement with the literature regarding estimate of terrestrial respiratory discrimination (plant + soil), and we confirm the existence of a positive terrestrial photosynthetic fractionation on different plants studied at the scale of a terrarium. This finding motivates a new study of the main drivers of the variations of the global Dole effect which we provided here focusing on the last deglaciation and using productivity inferred from three global Earth models. In our estimate of the Dole effect,

we used the latest fractionation factors evaluated by these models and found no significant change of the Dole effect over the last deglaciation. This is in agreement with the data when comparing to the measured change of Dole effect between the LGM and the pre-industrial period. However, the calculations do not show any change for the Dole effect at 6 ka while the data show a clear decrease by 0.5 ‰ at that period. We thus conclude that the Dole effect variations are in phase with those of the hydrological cycle at low latitudes but cannot be used as a tracer of the ratio between terrestrial and oceanic productivity.

Our study relies on strong assumptions, such as the influence of climatic parameters on the fractionation factors, which could be further investigated using the experimental set-up that we have used in this study.

## References

Aggarwal, P. K., Alduchov, O. A., Froehlich, K. O., Araguas-Araguas, L. J., Sturchio, N. C., and Kurita, N.: Stable isotopes in global precipitation: A unified interpretation based on atmospheric moisture residence time, *Geophysical Research Letters*, 39, 2012GL051937, <https://doi.org/10.1029/2012GL051937>, 2012.

Anderson, W. T., Bernasconi, S. M., McKenzie, J. A., Saurer, M., and Schweingruber, F.: Model evaluation for reconstructing the oxygen isotopic composition in precipitation from tree ring cellulose over the last century, *Chemical Geology*, 182, 121–137, [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(01\)00285-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(01)00285-6), 2002.

Angert, A. and Luz, B.: Fractionation of oxygen isotopes by root respiration: Implications for the isotopic composition of atmospheric O<sub>2</sub>, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 1695–1701, [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00567-1](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00567-1), 2001.

Angert, A., Luz, B., and Yakir, D.: Fractionation of oxygen isotopes by respiration and diffusion in soils and its implications for the isotopic composition of atmospheric O<sub>2</sub>, *Global Biogeochemical Cycles*, 15, 871–880, <https://doi.org/10.1029/2000GB001371>, 2001.

Barkan, E. and Luz, B.: High precision measurements of <sup>17</sup>O/ <sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/ <sup>16</sup>O ratios in H<sub>2</sub>O, *Rapid Comm Mass Spectrometry*, 19, 3737–3742, <https://doi.org/10.1002/rcm.2250>, 2005.

Bender, M., Sowers, T., Dickson, M.-L., Orchardo, J., Grootes, P., Mayewski, P. A., and Meese, D. A.: Climate correlations between Greenland and Antarctica during the past 100,000 years, *Nature*, 372, 663–666, <https://doi.org/10.1038/372663a0>, 1994.

Bender, M. L.: The δ <sup>18</sup>O of dissolved O<sub>2</sub> in seawater: A unique tracer of circulation and respiration in the deep sea, *J. Geophys. Res.*, 95, 22243–22252, <https://doi.org/10.1029/JC095iC12p22243>, 1990.

Blunier, T., Barnett, B., Bender, M. L., and Hendricks, M. B.: Biological oxygen productivity during the last 60,000 years from triple oxygen isotope measurements, *Global Biogeochemical Cycles*, 16, <https://doi.org/10.1029/2001GB001460>, 2002.

Bouchet, M., Landais, A., Grisart, A., Parrenin, F., Prié, F., Jacob, R., Fourré, E., Capron, E., Raynaud, D., Lipenkov, V. Y., Loutre, M.-F., Extier, T., Svensson, A., Legrain, E., Martinerie, P., Leuenberger, M., Jiang, W., Ritterbusch, F., Lu, Z.-T., and Yang, G.-M.: The AICC2023 chronological framework and associated timescale for the EPICA Dome C ice core, *Ice Dynamics/Ice Cores/Milankovitch*, <https://doi.org/10.5194/egusphere-2023-1081>, 2023.

Cernusak, L. A., Barbour, M. M., Arndt, S. K., Cheesman, A. W., English, N. B., Feild, T. S., Helliker, B. R., Holloway-Phillips, M. M., Holtum, J. A. M., Kahmen, A., McInerney, F. A., Munksgaard, N. C., Simonin, K. A., Song, X., Stuart-Williams, H., West, J. B., and Farquhar,

G. D.: Stable isotopes in leaf water of terrestrial plants, *Plant Cell & Environment*, 39, 1087–1102, <https://doi.org/10.1111/pce.12703>, 2016.

Cheng, H., Edwards, R. L., Sinha, A., Spötl, C., Yi, L., Chen, S., Kelly, M., Kathayat, G., Wang, X., Li, X., Kong, X., Wang, Y., Ning, Y., and Zhang, H.: The Asian monsoon over the past 640,000 years and ice age terminations, *Nature*, 534, 640–646, <https://doi.org/10.1038/nature18591>, 2016.

Ciais, P., Tagliabue, A., Cuntz, M., Bopp, L., Scholze, M., Hoffmann, G., Lourantou, A., Harrison, S. P., Prentice, I. C., Kelley, D. I., Koven, C., and Piao, S. L.: Large inert carbon pool in the terrestrial biosphere during the Last Glacial Maximum, *Nature Geosci*, 5, 74–79, <https://doi.org/10.1038/ngeo1324>, 2012.

Dreyfus, G. B., Parrenin, F., Lemieux-Dudon, B., Durand, G., Masson-Delmotte, V., Jouzel, J., Barnola, J.-M., Panno, L., Spahni, R., Tisserand, A., Siegenthaler, U., and Leuenberger, M.: Anomalous flow below 2700 m in the EPICA Dome C ice core detected using  $\delta^{18}\text{O}$  of atmospheric oxygen measurements, *Clim. Past*, 3, 341–353, <https://doi.org/10.5194/cp-3-341-2007>, 2007.

Eisenstadt, D., Barkan, E., Luz, B., and Kaplan, A.: Enrichment of oxygen heavy isotopes during photosynthesis in phytoplankton, *Photosynth Res*, 103, 97–103, <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9518-z>, 2010.

Farquhar, G. D., Lloyd, J., Taylor, J. A., Flanagan, L. B., Syvertsen, J. P., Hubick, K. T., Wong, S. C., and Ehleringer, J. R.: Vegetation effects on the isotope composition of oxygen in atmospheric CO<sub>2</sub>, *Nature*, 363, 439–443, <https://doi.org/10.1038/363439a0>, 1993.

Flanagan, L. B., Bain, J. F., and Ehleringer, J. R.: Stable oxygen and hydrogen isotope composition of leaf water in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species under field conditions, *Oecologia*, 88, 394–400, <https://doi.org/10.1007/BF00317584>, 1991.



Gillon, J. and Yakir, D.: Influence of Carbonic Anhydrase Activity in Terrestrial Vegetation on the  $\delta^{18}\text{O}$  Content of Atmospheric  $\text{CO}_2$ , *Science*, 291, 2584–2587, <https://doi.org/10.1126/science.1056374>, 2001.

Guy, R. D., Berry, J. A., Fogel, M. L., and Hoering, T. C.: Differential fractionation of oxygen isotopes by cyanide-resistant and cyanide-sensitive respiration in plants, *Planta*, 177, 483–491, <https://doi.org/10.1007/BF00392616>, 1989.

Guy, R. D., Berry, J. A., Fogel, M. L., Turpin, D. H., and Weger, H. G.: Fractionation of the stable isotopes of oxygen during respiration by plants: The basis of a new technique to estimate partitioning to the alternative path, *Plant Respiration, Molecular, Biochemical and Physiological Aspects*, SPB Academic Publishing, The Hague, the Netherlands, 443–453, 1992.

Guy, R. D., Fogel, M. L., and Berry, J. A.: Photosynthetic Fractionation of the Stable Isotopes of Oxygen and Carbon, *Plant Physiol.*, 101, 37–47, <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.37>, 1993.

Helliker, B. R. and Richter, S. L.: Subtropical to boreal convergence of tree-leaf temperatures, *Nature*, 454, 511–514, <https://doi.org/10.1038/nature07031>, 2008.

Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B., and Kaplan, A.: Fractionation of the Three Stable Oxygen Isotopes by Oxygen-Producing and Oxygen-Consuming Reactions in Photosynthetic Organisms, *Plant Physiology*, 138, 2292–2298, <https://doi.org/10.1104/pp.105.063768>, 2005.

Hendricks, M. B., Bender, M. L., and Barnett, B. A.: Net and gross  $\text{O}_2$  production in the southern ocean from measurements of biological  $\text{O}_2$  saturation and its triple isotope composition, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51, 1541–1561, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2004.06.006>, 2004.

Hoffmann, G., Cuntz, M., Weber, C., Ciais, P., Friedlingstein, P., Heimann, M., Jouzel, J., Kaduk, J., Maier-Reimer, E., Seibt, U., and Six, K.: A model of the Earth's Dole effect, *Global Biogeochemical Cycles*, 18, 2003GB002059, <https://doi.org/10.1029/2003GB002059>, 2004.

Hu, Y. B., Xiao, W., Qian, Y. F., Liu, Q., Xie, C. Y., Zhang, X. F., Zhang, W. Q., Liu, S. D., and Lee, X. H.: [Effects of Water Vapor Source and Local Evaporation on the Stable Hydrogen and Oxygen Isotopic Compositions of Precipitation]., *Huanjing kexue*, 40, 573–581, <https://doi.org/10.13227/j.hjkx.201805227>, 2019.

Huang, E., Wang, P., Wang, Y., Yan, M., Tian, J., Li, S., and Ma, W.: Dole effect as a measurement of the low-latitude hydrological cycle over the past 800 ka, *Sci. Adv.*, 6, eaba4823, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba4823>, 2020.

Keeling, R. F.: Development of an interferometric oxygen analyzer for precise measurement of the atmospheric O<sub>2</sub> mole fraction, Harvard Univ., Cambridge, Mass., 1988.

Keeling, R. F. and Shertz, S. R.: Seasonal and interannual variations in atmospheric oxygen and implications for the global carbon cycle, *Nature*, 358, 723–727, <https://doi.org/10.1038/358723a0>, 1992.

Kiddon, J., Bender, M. L., Orchardo, J., Caron, D. A., Goldman, J. C., and Dennett, M.: Isotopic fractionation of oxygen by respiring marine organisms, *Global Biogeochemical Cycles*, 7, 679–694, <https://doi.org/10.1029/93GB01444>, 1993.

Kroopnick, P. and Craig, H.: Atmospheric Oxygen: Isotopic Composition and Solubility Fractionation, *Science*, 175, 54–55, <https://doi.org/10.1126/science.175.4017.54>, 1972.

Laisk, A. and Edwards, G. E.: Oxygen and electron flow in C<sub>4</sub> photosynthesis: Mehler reaction, photorespiration and CO<sub>2</sub> concentration in the bundle sheath, *Planta*, 205, 632–645, <https://doi.org/10.1007/s004250050366>, 1998.

Landais, A., Barkan, E., Yakir, D., and Luz, B.: The triple isotopic composition of oxygen in leaf water, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 4105–4115, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.06.1545>, 2006.

Landais, A., Lathiere, J., Barkan, E., and Luz, B.: Reconsidering the change in global biosphere productivity between the Last Glacial Maximum and present day from the triple oxygen isotopic composition of air trapped in ice cores, *Global Biogeochemical Cycles*, 21, 2006GB002739, <https://doi.org/10.1029/2006GB002739>, 2007.

Landais, A., Dreyfus, G., Capron, E., Masson-Delmotte, V., Sanchez-Goñi, M. F., Desprat, S., Hoffmann, G., Jouzel, J., Leuenberger, M., and Johnsen, S.: What drives the millennial and orbital variations of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ?, *Quaternary Science Reviews*, 29, 235–246, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.07.005>, 2010.

Lisiecki, L. E. and Raymo, M. E.: A Pliocene–Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}\text{O}$  records, *Paleoceanography*, 20, 2004PA001071, <https://doi.org/10.1029/2004PA001071>, 2005.

Lisiecki, L. E. and Stern, J. V.: Regional and global benthic  $\delta^{18}\text{O}$  stacks for the last glacial cycle: Last Glacial Cycle Benthic  $\delta^{18}\text{O}$ , *Paleoceanography*, 31, 1368–1394, <https://doi.org/10.1002/2016PA003002>, 2016.

Liu, H., Zartman, R. E., Ireland, T. R., and Sun, W.: Global atmospheric oxygen variations recorded by Th/U systematics of igneous rocks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 116, 18854–18859, <https://doi.org/10.1073/pnas.1902833116>, 2019.

Luz, B. and Barkan, E.: The isotopic composition of atmospheric oxygen: ISOTOPIC COMPOSITION OF AIR OXYGEN, *Global Biogeochem. Cycles*, 25, n/a–n/a, <https://doi.org/10.1029/2010GB003883>, 2011.

Luz, B., Barkan, E., Bender, M. L., Thieme, M. H., and Boering, K. A.: Triple-isotope composition of atmospheric oxygen as a tracer of biosphere productivity, *Nature*, 400, 547–550, <https://doi.org/10.1038/22987>, 1999.

Malaizé, B., Paillard, D., Jouzel, J., and Raynaud, D.: The Dole effect over the last two glacial-interglacial cycles, *J. Geophys. Res.*, 104, 14199–14208, <https://doi.org/10.1029/1999JD900116>, 1999.

Marra, J.: Approaches to the Measurement of Plankton Production, in: *Phytoplankton Productivity*, edited by: Williams, P. J. L. B., Thomas, D. N., and Reynolds, C. S., Wiley, 78–108, <https://doi.org/10.1002/9780470995204.ch4>, 2002.

Milcu, A., Allan, E., Roscher, C., Jenkins, T., Meyer, S. T., Flynn, D., Bessler, H., Buscot, F., Engels, C., Gubsch, M., König, S., Lipowsky, A., Loranger, J., Renker, C., Scherber, C., Schmid, B., Thébault, E., Wubet, T., Weisser, W. W., Scheu, S., and Eisenhauer, N.: Functionally and phylogenetically diverse plant communities key to soil biota, *Ecology*, 94, 1878–1885, <https://doi.org/10.1890/12-1936.1>, 2013.

Pack, A., Höweling, A., Hezel, D. C., Stefanak, M. T., Beck, A.-K., Peters, S. T. M., Sengupta, S., Herwartz, D., and Folco, L.: Tracing the oxygen isotope composition of the upper Earth's atmosphere using cosmic spherules, *Nat Commun*, 8, 15702, <https://doi.org/10.1038/ncomms15702>, 2017.

Parrenin, F., Barnola, J.-M., Beer, J., Blunier, T., Castellano, E., Chappellaz, J., Dreyfus, G., Fischer, H., Fujita, S., Jouzel, J., Kawamura, K., Lemieux-Dudon, B., Loulergue, L., Masson-Delmotte, V., Narcisi, B., Petit, J.-R., Raisbeck, G., Raynaud, D., Ruth, U., Schwander, J., Severi, M., Spahni, R., Steffensen, J. P., Svensson, A., Udisti, R., Waelbroeck, C., and Wolff, E.: The EDC3 chronology for the EPICA Dome C ice core, *Clim. Past*, 3, 485–497, <https://doi.org/10.5194/cp-3-485-2007>, 2007.

Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J.-M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V. M., Legrand, M., Lipenkov, V. Y., Lorius, C., PÉpin, L., Ritz, C., Saltzman, E., and Stievenard, M.: Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica, *Nature*, 399, 429–436, <https://doi.org/10.1038/20859>, 1999.

Prentice, I. C., Cleator, S. F., Huang, Y. H., Harrison, S. P., and Roulstone, I.: Reconstructing ice-age palaeoclimates: Quantifying low-CO<sub>2</sub> effects on plants, *Global and Planetary Change*, 149, 166–176, <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.12.012>, 2017.

Schrag, D. P., Adkins, J. F., McIntyre, K., Alexander, J. L., Hodell, D. A., Charles, C. D., and McManus, J. F.: The oxygen isotopic composition of seawater during the Last Glacial Maximum, *Quaternary Science Reviews*, 21, 331–342, [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(01\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(01)00110-X), 2002.

Seltzer, A. M., Severinghaus, J. P., Andraski, B. J., and Stonestrom, D. A.: Steady state fractionation of heavy noble gas isotopes in a deep unsaturated zone, *Water Resources Research*, 53, 2716–2732, <https://doi.org/10.1002/2016WR019655>, 2017.

Severinghaus, J. P., Beaudette, R., Headly, M. A., Taylor, K., and Brook, E. J.: Oxygen-18 of O<sub>2</sub> Records the Impact of Abrupt Climate Change on the Terrestrial Biosphere, *Science*, 324, 1431–1434, <https://doi.org/10.1126/science.1169473>, 2009.

Sigl, M., Fudge, T. J., Winstrup, M., Cole-Dai, J., Ferris, D., McConnell, J. R., Taylor, K. C., Welten, K. C., Woodruff, T. E., Adolphi, F., Bisiaux, M., Brook, E. J., Buizert, C., Caffee, M. W., Dunbar, N. W., Edwards, R., Geng, L., Iverson, N., Koffman, B., Layman, L., Maselli, O. J., McGwire, K., Muscheler, R., Nishiizumi, K., Pasteris, D. R., Rhodes, R. H., and Sowers, T. A.: The WAIS Divide deep ice core WD2014 chronology – Part 2: Annual-layer counting (0–31 ka BP), *Clim. Past*, 12, 769–786, <https://doi.org/10.5194/cp-12-769-2016>, 2016.

Tcherkez, G. and Farquhar, G. D.: On the  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  isotope effect associated with photosynthetic  $\text{O}_2$  production, *Functional Plant Biol.*, 34, 1049, <https://doi.org/10.1071/FP07168>, 2007.

Veres, D., Bazin, L., Landais, A., Toyé Mahamadou Kele, H., Lemieux-Dudon, B., Parrenin, F., Martinerie, P., Blayo, E., Blunier, T., Capron, E., Chappellaz, J., Rasmussen, S. O., Severi, M., Svensson, A., Vinther, B., and Wolff, E. W.: The Antarctic ice core chronology (AICC2012): an optimized multi-parameter and multi-site dating approach for the last 120 thousand years, *Clim. Past*, 9, 1733–1748, <https://doi.org/10.5194/cp-9-1733-2013>, 2013.

Vilović, I., Schulze-Makuch, D., and Heller, R.: Variations in climate habitability parameters and their effect on Earth's biosphere during the Phanerozoic Eon, *Sci Rep*, 13, 12663, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39716-z>, 2023.

Vinogradov, A. P., Kutuyurin, V. M., and Zadorozhnyi, I. K.: Isotope fractionation of atmospheric oxygen, *Geochem. Int.*, 3, 241–253, 1959.

Von Caemmerer, S. and Farquhar, G. D.: Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, *Planta*, 153, 376–387, <https://doi.org/10.1007/BF00384257>, 1981.

Wang, Y., Cheng, H., Edwards, R. L., Kong, X., Shao, X., Chen, S., Wu, J., Jiang, X., Wang, X., and An, Z.: Millennial- and orbital-scale changes in the East Asian monsoon over the past 224,000 years, *Nature*, 451, 1090–1093, <https://doi.org/10.1038/nature06692>, 2008.

West, J. B., Sobek, A., and Ehleringer, J. R.: A Simplified GIS Approach to Modeling Global Leaf Water Isoscapes, *PLoS ONE*, 3, e2447, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002447>, 2008.

Wostbrock\*, J. A. G. and Sharp, Z. D.: Triple Oxygen Isotopes in Silica–Water and Carbonate–Water Systems, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 86, 367–400, <https://doi.org/10.2138/rmg.2021.86.11>, 2021.

### Author contributions

AL and CPi designed the project. CPi, JS, SD and CPa carried out experiments at ECOTRON of Montpellier and CPa, FP, RJ, AD and OJ at LSCE. CPa, CPi and AL analyzed the data from the optical spectrometer and CPa and AL analysed the data from IRMS. JW has output the data and calculated the GPP-O<sub>2</sub> of the models. CPa, CPi and AL prepared the manuscript with contributions from JW, MB and AM.

## Conclusion

L'étude des isotopes de l'oxygène de l'air piégé dans les bulles d'air dans les carottes de glace en Antarctique permet de dater les carottes de glace et de renseigner le cycle de l'oxygène, qui est fortement lié au cycle du carbone via les processus biologiques et au cycle de l'eau qui est consommé par les organismes végétaux lors de la photosynthèse. Des études précédentes ont attribué les variations de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et de l'effet Dole à des variations du cycle hydrologique aux basses latitudes et/ou des variations du rapport de productivité entre l'océan et le terrestre (Bender et al., 1994 ; Luz et al., 1999 ; Malaizé et al., 1999 ; Severinghaus et al., 2009 ; Blunier et al., 2002 ; Landais et al., 2010 ; Luz et Barkan, 2011). Comme de nombreux processus fractionnent l'oxygène, l'interprétation du  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  et de l'effet Dole dépend fortement des coefficients de fractionnements associés. Ici, je me suis concentrée sur l'amélioration de la quantification des coefficients de fractionnement lors de la respiration et de la photosynthèse terrestre.

Cette thèse a permis de développer des expériences innovantes à l'échelle de l'ensemble « plante + sol » dans des chambres biologiques fermées, dont tous les paramètres climatiques sont contrôlés et stabilisés. Ces chambres étaient placées sur le plateau microcosme de l'ECOTRON de Montpellier. Une première étude a été faite sur de la fétuque avec du sol sur une chambre biologique avec un prélèvement régulier d'air dans la chambre biologique pour mesurer la composition isotopique par IRMS au LSCE. A partir de ce premier prototype, nous avons développé un système multiplexé afin de pouvoir mener plusieurs expériences identiques en parallèle. Ce développement fait l'objet d'un article technique qui sera soumis très prochainement. De plus, nous avons aussi développé, en collaboration avec Daniele Romanini du LIPHY et l'entreprise AP2E, un nouvel instrument permettant de mesurer en continu la



composition isotopique et élémentaire du dioxygène pendant les expériences. Cet instrument, dénommé SARA-O<sub>2</sub>, est basé sur la technique de spectrométrie optique OF-CEAS et un article bientôt soumis sur le sujet est présenté en annexe de cette thèse. Les performances actuelles de cet instrument sont un peu moins bonnes que celles d'un IRMS. Elles suffisent néanmoins pour la détermination des coefficients de fractionnement et il est maintenant possible d'avoir un suivi continu de la composition isotopique de l'O<sub>2</sub> pour diverses applications biologiques.

L'étude de la fétuque dans la chambre biologique a fait l'objet d'un premier article scientifique. Le fractionnement associé à la respiration obtenu est en accord avec la littérature, ce qui a permis de valider cette installation. Cependant, nous avons mis en évidence l'existence d'un fractionnement associé à la photosynthèse terrestre de 3.7 ‰. Toutes les études précédentes menées à l'échelle cellulaire et souvent dans des conditions de laboratoire peu réalistes (pas de dioxygène dans le milieu) suggéraient qu'il n'y avait pas de fractionnement lors de la photosynthèse terrestre même si un fractionnement lors de la photosynthèse marine avait été identifié par Eisenstadt et al. (2010). Afin de confirmer nos résultats, nous avons utilisé le système de chambres biologiques multiplexées, qui a été développé dans cette thèse afin d'étudier l'évolution de la composition isotopique lors des processus biologiques sur une diversité de plantes (C3 vs C4) et dans des conditions différentes (plantes cultivées sur du sol ou en hydroponie). Le résultat principal obtenu est un fractionnement photosynthétique terrestre positif quelque soit la plante étudiée. Cependant, en incluant ce fractionnement photosynthétique positif dans le calcul de l'effet Dole, nous arrivons à une valeur légèrement supérieure à la valeur mesurée. Il est donc possible que d'autres coefficients de fractionnement intervenant dans ce calcul n'aient pas été assez bien estimés dans les études précédentes et soient à reprendre dans le futur.

Nous avons finalement discuté l'implication de nos nouvelles estimations de coefficients de fractionnement isotopique pour l'interprétation de l'effet Dole,

notamment sur la dernière déglaciation. Les données montrent un effet Dole identique pour l'actuel et pour le LGM (24 ‰) et une valeur de - 0.4 ‰ à 6ka BP.

A partir des coefficients de fractionnement déterminés dans cette thèse et de ceux donnés dans la littérature, nous avons estimé les effets Dole terrestre et océanique. Ensuite, pour calculer l'effet Dole global à partir de ces valeurs, nous avons utilisé la GPP-O<sub>2</sub> issue de trois modèles de système Terre qui ont participé à l'exercice PMIP pour ces trois périodes d'étude. En effectuant ce calcul, nous ne trouvons aucune variation d'effet Dole entre ces trois périodes. Ainsi, nous confirmons la conclusion de Luz et Barkan (2011) que les variations de l'effet Dole global observées à 6 ka avant aujourd'hui sont le résultat des variations du cycle hydrologique aux basses latitudes, c'est-à-dire des variations du  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau de pluie qui sont transmises par le sol puis à travers la photosynthèse de l'eau des feuilles à l'atmosphère.

## Perspectives

Pendant cette thèse, il a été développé un système complet permettant de mesurer de façon assez réaliste (plus proche des conditions réelles) les coefficients de fractionnement de l'oxygène lors des processus biologiques. Cependant, nous n'avons pas pu appliquer ce système à suffisamment de conditions et plantes différentes afin de contraindre au mieux ces coefficients de fractionnement. Notamment, il faudrait utiliser le même système pour étudier la dépendance aux conditions climatiques et à la concentration de CO<sub>2</sub> de ces coefficients de fractionnement. De même, il serait intéressant d'explorer le comportement d'autres plantes.

Notre étude n'a pas considéré la biosphère marine alors qu'elle représente une part importante de la biosphère globale. Pour cela, des chambres biologiques pour les milieux aquatiques ont été développées dans le cadre d'un nouveau projet AQUA-OXY qui constitue le cœur de la thèse de Nicolas Bienville démarrée en Octobre 2023.

Une perspective à plus long terme serait aussi de coupler la mesure du  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  (dépôt ANR CARBOXY) et le  $\Delta^{17}\text{O}$  de l' $\text{O}_2$  lors de ces expériences en chambres biologiques pour pouvoir combiner l'interprétation des signaux  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  et de la composition isotopique du dioxygène enregistrés dans les carottes de glace et ainsi mieux comprendre les variations de flux de  $\text{CO}_2$  liées aux variations de productivité de la biosphère au cours des changements climatiques passés.

Tout ce travail permettrait d'étudier l'effet Dole global sur d'autres périodes temporelles, comme sur les derniers cycles climatiques et essayer d'interpréter le plus quantitativement possible ses variations dans le passé.

## Références

Abe, O.: Isotope fractionation of molecular oxygen during adsorption/desorption by molecular sieve zeolite, *Rapid Comm Mass Spectrometry*, 22, 2510–2514, <https://doi.org/10.1002/rcm.3634>, 2008.

Aggarwal, P. K., Alduchov, O. A., Froehlich, K. O., Araguas-Araguas, L. J., Sturchio, N. C., and Kurita, N.: Stable isotopes in global precipitation: A unified interpretation based on atmospheric moisture residence time, *Geophysical Research Letters*, 39, 2012GL051937, <https://doi.org/10.1029/2012GL051937>, 2012.

Alexandre, A., Landais, A., Vallet-Coulomb, C., Piel, C., Devidal, S., Pauchet, S., Sonzogni, C., Couapel, M., Pasturel, M., Cornuault, P., Xin, J., Mazur, J.-C., Prié, F., Bentaleb, I., Webb, E., Chalié, F., and Roy, J.: The triple oxygen isotope composition of phytoliths as a proxy of continental atmospheric humidity: insights from climate chamber and climate transect calibrations, *Biogeosciences*, 15, 3223–3241, <https://doi.org/10.5194/bg-15-3223-2018>, 2018.

Anderson, W. T., Bernasconi, S. M., McKenzie, J. A., Saurer, M., and Schweingruber, F.: Model evaluation for reconstructing the oxygen isotopic composition in precipitation from tree ring cellulose over the last century, *Chemical Geology*, 182, 121–137, [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(01\)00285-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(01)00285-6), 2002.

Angert, A. and Luz, B.: Fractionation of oxygen isotopes by root respiration: Implications for the isotopic composition of atmospheric O<sub>2</sub>, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 1695–1701, [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00567-1](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00567-1), 2001.

Angert, A., Luz, B., and Yakir, D.: Fractionation of oxygen isotopes by respiration and diffusion in soils and its implications for the isotopic composition of atmospheric O<sub>2</sub>, *Global Biogeochemical Cycles*, 15, 871–880, <https://doi.org/10.1029/2000GB001371>, 2001.

Angert, A., Barkan, E., Barnett, B., Brugnoli, E., Davidson, E. A., Fessenden, J., Maneepong, S., Panapitukkul, N., Randerson, J. T., Savage, K., Yakir, D., and Luz, B.: Contribution of soil respiration in tropical, temperate, and boreal forests to the <sup>18</sup>O enrichment of atmospheric O<sub>2</sub>, *Global Biogeochemical Cycles*, 17, 2003GB002056, <https://doi.org/10.1029/2003GB002056>, 2003.

Barkan, E. and Luz, B.: High-precision measurements of <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O of O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>/Ar ratio in air, *Rapid Comm Mass Spectrometry*, 17, 2809–2814, <https://doi.org/10.1002/rcm.1267>, 2003.

Barkan, E. and Luz, B.: High precision measurements of <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O ratios in H<sub>2</sub>O, *Rapid Comm Mass Spectrometry*, 19, 3737–3742, <https://doi.org/10.1002/rcm.2250>, 2005.

Bauwe, H., Hagemann, M., and Fernie, A. R.: Photorespiration: players, partners and origin, *Trends in Plant Science*, 15, 330–336, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.006>, 2010.

Bazin, L., Landais, A., Capron, E., Masson-Delmotte, V., Ritz, C., Picard, G., Jouzel, J., Dumont, M., Leuenberger, M., and Prié, F.: Phase relationships between orbital forcing and the composition of air trapped in Antarctic ice cores, *Clim. Past*, 12, 729–748, <https://doi.org/10.5194/cp-12-729-2016>, 2016.

Bendall, D. S. and Bonner, W. D.: Cyanide-insensitive Respiration in Plant Mitochondria, *Plant Physiol.*, 47, 236–245, <https://doi.org/10.1104/pp.47.2.236>, 1971.

Bender, M., Sowers, T., Dickson, M.-L., Orchardo, J., Grootes, P., Mayewski, P. A., and Meese, D. A.: Climate correlations between Greenland and Antarctica during the past 100,000 years, *Nature*, 372, 663–666, <https://doi.org/10.1038/372663a0>, 1994.

Bender, M. L.: The  $\delta^{18}\text{O}$  of dissolved  $\text{O}_2$  in seawater: A unique tracer of circulation and respiration in the deep sea, *J. Geophys. Res.*, 95, 22243–22252, <https://doi.org/10.1029/JC095iC12p22243>, 1990.

Bender, M. L.: Orbital tuning chronology for the Vostok climate record supported by trapped gas composition, *Earth and Planetary Science Letters*, 204, 275–289, [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(02\)00980-9](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(02)00980-9), 2002.

Bereiter, B., Shackleton, S., Baggenstos, D., Kawamura, K., and Severinghaus, J.: Mean global ocean temperatures during the last glacial transition, *Nature*, 553, 39–44, <https://doi.org/10.1038/nature25152>, 2018.

Blunier, T., Barnett, B., Bender, M. L., and Hendricks, M. B.: Biological oxygen productivity during the last 60,000 years from triple oxygen isotope measurements, *Global Biogeochemical Cycles*, 16, <https://doi.org/10.1029/2001GB001460>, 2002.

Blunier, T., Bender, M. L., Barnett, B., and Von Fischer, J. C.: Planetary fertility during the past 400 ka based on the triple isotope composition of  $\text{O}_2$  in trapped gases from the Vostok ice core, *Clim. Past*, 8, 1509–1526, <https://doi.org/10.5194/cp-8-1509-2012>, 2012.

Bouchet, M., Landais, A., and Parrenin, F.: Dive into the timescales of deep ice cores, *PAGES Mag*, 31, 104–105, <https://doi.org/10.22498/pages.31.2.104>, 2023a.

Bouchet, M., Landais, A., Grisart, A., Parrenin, F., Prié, F., Jacob, R., Fourré, E., Capron, E., Raynaud, D., Lipenkov, V. Y., Loutre, M.-F., Extier, T., Svensson, A., Legrain, E., Martinerie, P., Leuenberger, M., Jiang, W., Ritterbusch, F., Lu, Z.-T., and Yang, G.-M.: The AICC2023 chronological framework and associated timescale for the EPICA Dome C ice core, *Ice Dynamics/Ice Cores/Milankovitch*, <https://doi.org/10.5194/egusphere-2023-1081>, 2023.

Brandon, M., Landais, A., Duchamp-Alphonse, S., Favre, V., Schmitz, L., Abrial, H., Prié, F., Extier, T., and Blunier, T.: Exceptionally high biosphere productivity at the beginning of Marine Isotopic Stage 11, *Nat Commun*, 11, 2112, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15739-2>, 2020.

Capron, E., Landais, A., Lemieux-Dudon, B., Schilt, A., Masson-Delmotte, V., Buiron, D., Chappellaz, J., Dahl-Jensen, D., Johnsen, S., Leuenberger, M., Loulergue, L., and Oerter, H.: Synchronising EDML and NorthGRIP ice cores using  $\delta^{18}\text{O}$  of atmospheric oxygen ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ) and  $\text{CH}_4$  measurements over MIS5 (80–123 kyr), *Quaternary Science Reviews*, 29, 222–234, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.07.014>, 2010.

Casado, M.: Water stable isotopic composition on the East Antarctic Plateau: measurements at low temperature of the vapour composition, utilisation as an atmospheric tracer and implication for paleoclimate studies, Ph.D. thesis, Université Paris-Saclay, 2017.

Castin, L.: Modulation des cycles glaciaires-interglaciaires par l'excentricité de l'orbite de la Terre, Ph.D. thesis, Université catholique de Louvain, 2022.

Cernusak, L. A., Barbour, M. M., Arndt, S. K., Cheesman, A. W., English, N. B., Feild, T. S., Helliker, B. R., Holloway-Phillips, M. M., Holtum, J. A. M., Kahmen, A., McInerney, F. A., Munksgaard, N. C., Simonin, K. A., Song, X., Stuart-Williams, H., West, J. B., and

- Farquhar, G. D.: Stable isotopes in leaf water of terrestrial plants, *Plant Cell & Environment*, 39, 1087–1102, <https://doi.org/10.1111/pce.12703>, 2016.
- Cheng, H., Edwards, R. L., Sinha, A., Spötl, C., Yi, L., Chen, S., Kelly, M., Kathayat, G., Wang, X., Li, X., Kong, X., Wang, Y., Ning, Y., and Zhang, H.: The Asian monsoon over the past 640,000 years and ice age terminations, *Nature*, 534, 640–646, <https://doi.org/10.1038/nature18591>, 2016.
- Ciais, P., Tagliabue, A., Cuntz, M., Bopp, L., Scholze, M., Hoffmann, G., Lourdou, A., Harrison, S. P., Prentice, I. C., Kelley, D. I., Koven, C., and Piao, S. L.: Large inert carbon pool in the terrestrial biosphere during the Last Glacial Maximum, *Nature Geosci*, 5, 74–79, <https://doi.org/10.1038/ngeo1324>, 2012.
- Craig, H. and Gordon, L. I.: Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere, Consiglio nazionale delle ricerche, Laboratorio de geologia nucleare, Pisa, 122 pp., 1965.
- Daniault, N., Mercier, H., Lherminier, P., Sarafanov, A., Falina, A., Zunino, P., Pérez, F. F., Ríos, A. F., Ferron, B., Huck, T., Thierry, V., and Gladyshev, S.: The northern North Atlantic Ocean mean circulation in the early 21st century, *Progress in Oceanography*, 146, 142–158, <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2016.06.007>, 2016.
- Dansgaard, W.: Stable isotopes in precipitation, *Tellus*, 16, 436–468, 1974.
- Dansgaard, W.: Greenland ice core studies, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 50, 185–187, [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(85\)90067-7](https://doi.org/10.1016/0031-0182(85)90067-7), 1985.
- Dixon, W. J.: Simplified Estimation from Censored Normal Samples, *Ann. Math. Statist.*, 31, 385–391, <https://doi.org/10.1214/aoms/1177705900>, 1960.
- Dole, M.: The Relative Atomic Weight of Oxygen in Water and in Air A Discussion of the Atmospheric Distribution of the Oxygen Isotopes and of the Chemical Standard of Atomic Weights, *The Journal of Chemical Physics*, 4, 268–275, <https://doi.org/10.1063/1.1749834>, 1936.

Dole, M. and Kenks, G.: Isotopic Composition of Photosynthetic Oxygen, *Science*, 100, 409–409, <https://doi.org/10.1126/science.100.2601.409>, 1944.

Dongmann, G., Nürnberg, H. W., Förstel, H., and Wagener, K.: On the enrichment of H<sub>2</sub> 18O in the leaves of transpiring plants, *Radiat Environ Biophys*, 11, 41–52, <https://doi.org/10.1007/BF01323099>, 1974.

Dreyfus, G. B., Parrenin, F., Lemieux-Dudon, B., Durand, G., Masson-Delmotte, V., Jouzel, J., Barnola, J.-M., Panno, L., Spahni, R., Tisserand, A., Siegenthaler, U., and Leuenberger, M.: Anomalous flow below 2700 m in the EPICA Dome C ice core detected using  $\delta^{18}\text{O}$  of atmospheric oxygen measurements, *Clim. Past*, 3, 341–353, <https://doi.org/10.5194/cp-3-341-2007>, 2007.

Duchamp-Alphonse, S., Siani, G., Michel, E., Beaufort, L., Gally, Y., and Jaccard, S. L.: Enhanced ocean-atmosphere carbon partitioning via the carbonate counter pump during the last deglacial, *Nat Commun*, 9, 2396, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04625-7>, 2018.

Eisenstadt, D., Barkan, E., Luz, B., and Kaplan, A.: Enrichment of oxygen heavy isotopes during photosynthesis in phytoplankton, *Photosynth Res*, 103, 97–103, <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9518-z>, 2010.

Emiliani, C.: Pleistocene Temperatures, *The Journal of Geology*, 63, 538–578, <https://doi.org/10.1086/626295>, 1955.

Extier, T., Landais, A., Bréant, C., Prié, F., Bazin, L., Dreyfus, G., Roche, D. M., and Leuenberger, M.: On the use of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  for ice core dating, *Quaternary Science Reviews*, 185, 244–257, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.02.008>, 2018.

Farquhar, G. D., Lloyd, J., Taylor, J. A., Flanagan, L. B., Syvertsen, J. P., Hubick, K. T., Wong, S. C., and Ehleringer, J. R.: Vegetation effects on the isotope composition of oxygen in atmospheric CO<sub>2</sub>, *Nature*, 363, 439–443, <https://doi.org/10.1038/363439a0>, 1993.



Field, C. B., Ball, J. T., and Berry, J. A.: Photosynthesis: principles and field techniques, in: *Plant Physiological Ecology*, edited by: Pearcy, R. W., Ehleringer, J. R., Mooney, H. A., and Rundel, P. W., Springer Netherlands, Dordrecht, 209–253, [https://doi.org/10.1007/978-94-010-9013-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-010-9013-1_11), 2000.

Flanagan, L. B., Bain, J. F., and Ehleringer, J. R.: Stable oxygen and hydrogen isotope composition of leaf water in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species under field conditions, *Oecologia*, 88, 394–400, <https://doi.org/10.1007/BF00317584>, 1991.

Gillon, J. and Yakir, D.: Influence of Carbonic Anhydrase Activity in Terrestrial Vegetation on the <sup>18</sup>O Content of Atmospheric CO<sub>2</sub>, *Science*, 291, 2584–2587, <https://doi.org/10.1126/science.1056374>, 2001.

Grisart, A.: Étude à haute résolution des cycles hydrologiques et climatiques à partir d'une carotte de glace d'Antarctique avec un focus sur les déglaciations, Ph.D. thesis, Université Paris-Saclay, 2023.

Guy, R. D., Berry, J. A., Fogel, M. L., and Hoering, T. C.: Differential fractionation of oxygen isotopes by cyanide-resistant and cyanide-sensitive respiration in plants, *Planta*, 177, 483–491, <https://doi.org/10.1007/BF00392616>, 1989.

Guy, R. D., Berry, J. A., Fogel, M. L., Turpin, D. H., and Weger, H. G.: Fractionation of the stable isotopes of oxygen during respiration by plants: The basis of a new technique to estimate partitioning to the alternative path, *Plant Respiration., Molecular, Biochemical and Physiological Aspects*, SPB Academic Publishing, The Hague, the Netherlands, 443–453, 1992.

Guy, R. D., Fogel, M. L., and Berry, J. A.: Photosynthetic Fractionation of the Stable Isotopes of Oxygen and Carbon, *Plant Physiol.*, 101, 37–47, <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.37>, 1993.

Hays, J. D., Imbrie, J., and Shackleton, N. J.: Variations in the Earth's Orbit: Pacemaker of the Ice Ages: For 500,000 years, major climatic changes have followed variations in

obliquity and precession., *Science*, 194, 1121–1132,  
<https://doi.org/10.1126/science.194.4270.1121>, 1976.

Heinrich, H.: Origin and Consequences of Cyclic Ice Rafting in the Northeast Atlantic Ocean During the Past 130,000 Years, *Quat. res.*, 29, 142–152,  
[https://doi.org/10.1016/0033-5894\(88\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0033-5894(88)90057-9), 1988.

Helliker, B. R. and Richter, S. L.: Subtropical to boreal convergence of tree-leaf temperatures, *Nature*, 454, 511–514, <https://doi.org/10.1038/nature07031>, 2008.

Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B., and Kaplan, A.: Fractionation of the Three Stable Oxygen Isotopes by Oxygen-Producing and Oxygen-Consuming Reactions in Photosynthetic Organisms, *Plant Physiology*, 138, 2292–2298,  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.063768>, 2005.

Hendricks, M. B., Bender, M. L., and Barnett, B. A.: Net and gross O<sub>2</sub> production in the southern ocean from measurements of biological O<sub>2</sub> saturation and its triple isotope composition, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51, 1541–1561, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2004.06.006>, 2004.

Hes, G., Sánchez Goñi, M. F., and Bouttes, N.: Impact of terrestrial biosphere on the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration across Termination V, *Vegetation Dynamics/Marine Archives/Pleistocene*, <https://doi.org/10.5194/cp-2021-143>, 2021.

Hillaire-Marcel, C., Kim, S.-T., Landais, A., Ghosh, P., Assonov, S., Lécuyer, C., Blanchard, M., Meijer, H. A. J., and Steen-Larsen, H. C.: A stable isotope toolbox for water and inorganic carbon cycle studies, *Nat Rev Earth Environ*, 2, 699–719,  
<https://doi.org/10.1038/s43017-021-00209-0>, 2021.

Hoffmann, G., Cuntz, M., Weber, C., Ciais, P., Friedlingstein, P., Heimann, M., Jouzel, J., Kaduk, J., Maier-Reimer, E., Seibt, U., and Six, K.: A model of the Earth's Dole effect, *Global Biogeochemical Cycles*, 18, 2003GB002059,  
<https://doi.org/10.1029/2003GB002059>, 2004.

Hu, Y. B., Xiao, W., Qian, Y. F., Liu, Q., Xie, C. Y., Zhang, X. F., Zhang, W. Q., Liu, S. D., and Lee, X. H.: [Effects of Water Vapor Source and Local Evaporation on the Stable Hydrogen and Oxygen Isotopic Compositions of Precipitation]., *Huanjing kexue*, 40, 573–581, <https://doi.org/10.13227/j.hjkx.201805227>, 2019.

Huang, E., Wang, P., Wang, Y., Yan, M., Tian, J., Li, S., and Ma, W.: Dole effect as a measurement of the low-latitude hydrological cycle over the past 800 ka, *Sci. Adv.*, 6, eaba4823, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba4823>, 2020.

Imbrie, J. and Imbrie, J. Z.: Modeling the Climatic Response to Orbital Variations, *Science*, 207, 943–953, <https://doi.org/10.1126/science.207.4434.943>, 1980.

Jenkins, W. J. and Goldman, J. C.: Seasonal oxygen cycling and primary production in the Sargasso Sea, *J Mar Res*, 43, 465–491, <https://doi.org/10.1357/002224085788438702>, 1985.

Jouzel, J., Hoffmann, G., Parrenin, F., and Waelbroeck, C.: Atmospheric oxygen 18 and sea-level changes, *Quaternary Science Reviews*, 21, 307–314, [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(01\)00106-8](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(01)00106-8), 2002.

Kassi, S. and Romanini, D.: Spectromètre laser à Amplification Résonante d’Absorption. Applications à la mesure de trace de gaz, *Techniques d’analyse*, <https://doi.org/10.51257/a-v1-re100>, 2008.

Keeling, R. F.: Development of an interferometric oxygen analyzer for precise measurement of the atmospheric O<sub>2</sub> mole fraction, Harvard Univ., Cambridge, Mass., 1988.

Keeling, R. F. and Shertz, S. R.: Seasonal and interannual variations in atmospheric oxygen and implications for the global carbon cycle, *Nature*, 358, 723–727, <https://doi.org/10.1038/358723a0>, 1992.

Keenan, T. F., Migliavacca, M., Papale, D., Baldocchi, D., Reichstein, M., Torn, M., and Wutzler, T.: Widespread inhibition of daytime ecosystem respiration, *Nat Ecol Evol*, 3, 407–415, <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0809-2>, 2019.

Kiddon, J., Bender, M. L., Orchardo, J., Caron, D. A., Goldman, J. C., and Dennett, M.: Isotopic fractionation of oxygen by respiring marine organisms, *Global Biogeochemical Cycles*, 7, 679–694, <https://doi.org/10.1029/93GB01444>, 1993.

Kroopnick, P. and Craig, H.: Atmospheric Oxygen: Isotopic Composition and Solubility Fractionation, *Science*, 175, 54–55, <https://doi.org/10.1126/science.175.4017.54>, 1972.

Laisk, A. and Edwards, G. E.: Oxygen and electron flow in C 4 photosynthesis: Mehler reaction, photorespiration and CO 2 concentration in the bundle sheath, *Planta*, 205, 632–645, <https://doi.org/10.1007/s004250050366>, 1998.

Landais, A., Barkan, E., Yakir, D., and Luz, B.: The triple isotopic composition of oxygen in leaf water, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 4105–4115, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.06.1545>, 2006.

Landais, A., Lathiere, J., Barkan, E., and Luz, B.: Reconsidering the change in global biosphere productivity between the Last Glacial Maximum and present day from the triple oxygen isotopic composition of air trapped in ice cores, *Global Biogeochemical Cycles*, 21, 2006GB002739, <https://doi.org/10.1029/2006GB002739>, 2007.

Landais, A., Dreyfus, G., Capron, E., Masson-Delmotte, V., Sanchez-Goñi, M. F., Desprat, S., Hoffmann, G., Jouzel, J., Leuenberger, M., and Johnsen, S.: What drives the millennial and orbital variations of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ?, *Quaternary Science Reviews*, 29, 235–246, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.07.005>, 2010.

Lane, G. A. and Dole, M.: Fractionation of Oxygen Isotopes during Respiration, *Science*, 123, 574–576, <https://doi.org/10.1126/science.123.3197.574>, 1956.

Laskar, J., Robutel, P., Joutel, F., Gastineau, M., Correia, A. C. M., and Levrard, B.: A long-term numerical solution for the insolation quantities of the Earth, *A&A*, 428, 261–285, <https://doi.org/10.1051/0004-6361:20041335>, 2004.

Laws, E. A., Landry, M. R., Barber, R. T., Campbell, L., Dickson, M.-L., and Marra, J.: Carbon cycling in primary production bottle incubations: inferences from grazing experiments and photosynthetic studies using and in the Arabian Sea, *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 47, 1339–1352, [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(99\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(99)00146-0), 2000.

Les cycles de Milankovitch et le passé climatique terrestre : <https://louernos-nature.fr/cycles-milankovitch-glaciations-climat/> (dernier accès : 6 novembre 2023), 2020.

Les océans se mélangent beaucoup moins que prévu sous l'effet du changement climatique : <https://www.cnrs.fr/fr/presse/les-océans-se-melangent-beaucoup-moins-que-prevu-sous-leffet-du-changement-climatique> (dernier accès : 6 novembre 2023), 2021.

Levine, N. M., Bender, M. L., and Doney, S. C.: The  $\delta^{18}\text{O}$  of dissolved  $\text{O}_2$  as a tracer of mixing and respiration in the mesopelagic ocean, *Global Biogeochemical Cycles*, 23, 2007GB003162, <https://doi.org/10.1029/2007GB003162>, 2009.

Lisiecki, L. E. and Raymo, M. E.: A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}\text{O}$  records, *Paleoceanography*, 20, 2004PA001071, <https://doi.org/10.1029/2004PA001071>, 2005.

Lisiecki, L. E. and Stern, J. V.: Regional and global benthic  $\delta^{18}\text{O}$  stacks for the last glacial cycle: Last Glacial Cycle Benthic  $\delta^{18}\text{O}$ , *Paleoceanography*, 31, 1368–1394, <https://doi.org/10.1002/2016PA003002>, 2016.

Liu, H., Zartman, R. E., Ireland, T. R., and Sun, W.: Global atmospheric oxygen variations recorded by Th/U systematics of igneous rocks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 116, 18854–18859, <https://doi.org/10.1073/pnas.1902833116>, 2019.

Loulergue, L., Schilt, A., Spahni, R., Masson-Delmotte, V., Blunier, T., Lemieux, B., Barnola, J.-M., Raynaud, D., Stocker, T. F., and Chappellaz, J.: Orbital and millennial-scale features of atmospheric CH<sub>4</sub> over the past 800,000 years, *Nature*, 453, 383–386, <https://doi.org/10.1038/nature06950>, 2008.

Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J.-M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., and Stocker, T. F.: High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present, *Nature*, 453, 379–382, <https://doi.org/10.1038/nature06949>, 2008.

Luz, B. and Barkan, E.: Assessment of Oceanic Productivity with the Triple-Isotope Composition of Dissolved Oxygen, *Science*, 288, 2028–2031, <https://doi.org/10.1126/science.288.5473.2028>, 2000.

Luz, B. and Barkan, E.: The isotopic ratios <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O in molecular oxygen and their significance in biogeochemistry, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, 1099–1110, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.09.001>, 2005.

Luz, B. and Barkan, E.: The isotopic composition of atmospheric oxygen: ISOTOPIC COMPOSITION OF AIR OXYGEN, *Global Biogeochem. Cycles*, 25, n/a-n/a, <https://doi.org/10.1029/2010GB003883>, 2011.

Luz, B., Barkan, E., Bender, M. L., Thieme, M. H., and Boering, K. A.: Triple-isotope composition of atmospheric oxygen as a tracer of biosphere productivity, *Nature*, 400, 547–550, <https://doi.org/10.1038/22987>, 1999.

Luz, B., Barkan, E., Sagi, Y., and Yacobi, Y. Z.: Evaluation of community respiratory mechanisms with oxygen isotopes: A case study in Lake Kinneret, *Limnol. Oceanogr.*, 47, 33–42, <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.1.0033>, 2002.

L'intérêt des débris rocheux : [http://aces.ens-lyon.fr/aces/thematiques/paleo/systemclim/gulfstream/pages\\_gulfstream/dosstech/techpaleoclim/ird](http://aces.ens-lyon.fr/aces/thematiques/paleo/systemclim/gulfstream/pages_gulfstream/dosstech/techpaleoclim/ird) (dernier accès : 6 novembre 2023), 2015.

- Malaizé, B., Paillard, D., Jouzel, J., and Raynaud, D.: The Dole effect over the last two glacial-interglacial cycles, *J. Geophys. Res.*, 104, 14199–14208, <https://doi.org/10.1029/1999JD900116>, 1999.
- Marra, J.: Approaches to the Measurement of Plankton Production, in: *Phytoplankton Productivity*, edited by: Williams, P. J. L. B., Thomas, D. N., and Reynolds, C. S., Wiley, 78–108, <https://doi.org/10.1002/9780470995204.ch4>, 2002.
- Mehler, A.: Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 65–77, 1951.
- Meijer, H. A. J. and Li, W. J.: The Use of Electrolysis for Accurate  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  Isotope Measurements in Water, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 34, 349–369, <https://doi.org/10.1080/10256019808234072>, 1998.
- Merlivat, L. and Jouzel, J.: Global climatic interpretation of the deuterium-oxygen 18 relationship for precipitation, *J. Geophys. Res.*, 84, 5029–5033, <https://doi.org/10.1029/JC084iC08p05029>, 1979.
- Milcu, A., Allan, E., Roscher, C., Jenkins, T., Meyer, S. T., Flynn, D., Bessler, H., Buscot, F., Engels, C., Gubsch, M., König, S., Lipowsky, A., Loranger, J., Renker, C., Scherber, C., Schmid, B., Thébault, E., Wubet, T., Weisser, W. W., Scheu, S., and Eisenhauer, N.: Functionally and phylogenetically diverse plant communities key to soil biota, *Ecology*, 94, 1878–1885, <https://doi.org/10.1890/12-1936.1>, 2013.
- Modéliser le cycle global de l'eau : <http://eduterre.ens-lyon.fr/thematiques/hydro/cycleau/modeliser> (dernier accès : 6 novembre 2023), 2008.
- North Greenland Ice Core Project members: High-resolution record of Northern Hemisphere climate extending into the last interglacial period, *Nature*, 431, 147–151, <https://doi.org/10.1038/nature02805>, 2004.

Oxygen Isotopes : <https://www.quora.com/How-many-protons-does-oxygen-17-have>  
(dernier accès : 6 novembre, 2023), 2021

Pack, A., Höweling, A., Hezel, D. C., Stefanak, M. T., Beck, A.-K., Peters, S. T. M., Sengupta, S., Herwartz, D., and Folco, L.: Tracing the oxygen isotope composition of the upper Earth's atmosphere using cosmic spherules, *Nat Commun*, 8, 15702, <https://doi.org/10.1038/ncomms15702>, 2017.

Parrenin, F., Barnola, J.-M., Beer, J., Blunier, T., Castellano, E., Chappellaz, J., Dreyfus, G., Fischer, H., Fujita, S., Jouzel, J., Kawamura, K., Lemieux-Dudon, B., Loulergue, L., Masson-Delmotte, V., Narcisi, B., Petit, J.-R., Raisbeck, G., Raynaud, D., Ruth, U., Schwander, J., Severi, M., Spahni, R., Steffensen, J. P., Svensson, A., Udisti, R., Waelbroeck, C., and Wolff, E.: The EDC3 chronology for the EPICA Dome C ice core, *Clim. Past*, 3, 485–497, <https://doi.org/10.5194/cp-3-485-2007>, 2007.

Paul, C., Piel, C., Sauze, J., Pasquier, N., Prié, F., Devidal, S., Jacob, R., Dapoigny, A., Jossoud, O., Milcu, A., and Landais, A.: Determination of respiration and photosynthesis fractionation factors for atmospheric dioxygen inferred from a vegetation–soil–atmosphere analogue of the terrestrial biosphere in closed chambers, *Biogeosciences*, 20, 1047–1062, <https://doi.org/10.5194/bg-20-1047-2023>, 2023.

Pépin, L., Raynaud, D., Barnola, J. -M., and Loutre, M. F.: Hemispheric roles of climate forcings during glacial-interglacial transitions as deduced from the Vostok record and LLN-2D model experiments, *J. Geophys. Res.*, 106, 31885–31892, <https://doi.org/10.1029/2001JD900117>, 2001.

Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J.-M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V. M., Legrand, M., Lipenkov, V. Y., Lorius, C., PÉpin, L., Ritz, C., Saltzman, E., and Stievenard, M.: Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica, *Nature*, 399, 429–436, <https://doi.org/10.1038/20859>, 1999.



Piel, C., Romanini, D., Farradèche, M., Chaillot, J., Paul, C., Bienville, N., Lauwers, T., Sauze, J., Jaulin, K., Prié, F., and Landais, A.: High precision  $\delta^{18}\text{O}$  measurements of atmospheric dioxygen using optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy (OF-CEAS), *Atmos. Meas. Tech. Discuss.* [preprint], <https://doi.org/10.5194/amt-2024-14>, in review, 2024.

Prentice, I. C., Harrison, S. P., and Bartlein, P. J.: Global vegetation and terrestrial carbon cycle changes after the last ice age, *New Phytologist*, 189, 988–998, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03620.x>, 2011.

Prentice, I. C., Cleator, S. F., Huang, Y. H., Harrison, S. P., and Roulstone, I.: Reconstructing ice-age palaeoclimates: Quantifying low- $\text{CO}_2$  effects on plants, *Global and Planetary Change*, 149, 166–176, <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.12.012>, 2017.

Quay, P. D., Wilbur, D. ., Richey, J. E., Devol, A. H., Benner, R., and Forsberg, B. R.: The  $^{18}\text{O}:^{16}\text{O}$  of dissolved oxygen in rivers and lakes in the Amazon Basin: Determining the ratio of respiration to photosynthesis rates in freshwaters, *Limnol. Oceanogr.*, 40, 718–729, <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.4.0718>, 1995.

Raich, J. W. and Schlesinger, W. H.: The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate, *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, 44, 81, <https://doi.org/10.3402/tellusb.v44i2.15428>, 1992.

Renato, W.: Triple-oxygen isotopic composition of meteoric waters:  $^{17}\text{O}$ -excess a new tracer of the hydrological cycle, Ph.D. thesis, Versailles-St Quentin en Yvelines, 2012.

Répartition des gaz dans l'atmosphère :

<https://www.alloprof.qc.ca/fr/eleves/bv/sciences/l-atmosphere-s1347> (dernier accès : 6 novembre 2023), n.d.

Reutenauer, C., Landais, A., Blunier, T., Bréant, C., Kageyama, M., Woillez, M.-N., Risi, C., Mariotti, V., and Braconnot, P.: Quantifying molecular oxygen isotope variations

during a Heinrich stadial, *Clim. Past*, 11, 1527–1551, <https://doi.org/10.5194/cp-11-1527-2015>, 2015.

Ribas-Carbo, M., Berry, J. A., Yakir, D., Giles, L., Robinson, S. A., Lennon, A. M., and Siedow, J. N.: Electron Partitioning between the Cytochrome and Alternative Pathways in Plant Mitochondria, *Plant Physiol.*, 109, 829–837, <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.829>, 1995.

Robinson, C. and Williams, P. J. L. B.: Respiration and its measurement in surface marine waters, in: *Respiration in Aquatic Ecosystems*, edited by: Del Giorgio, P. and Williams, P., Oxford University Press, 147–180, <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198527084.003.0009>, 2005.

Romanini, D., Ventrillard, I., Méjean, G., Morville, J., and Kerstel, E.: Introduction to Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy, in: *Cavity-Enhanced Spectroscopy and Sensing*, vol. 179, edited by: Gagliardi, G. and Loock, H.-P., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1–60, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-40003-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-40003-2_1), 2014.

Schrag, D. P., Adkins, J. F., McIntyre, K., Alexander, J. L., Hodell, D. A., Charles, C. D., and McManus, J. F.: The oxygen isotopic composition of seawater during the Last Glacial Maximum, *Quaternary Science Reviews*, 21, 331–342, [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(01\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(01)00110-X), 2002.

Seltzer, A. M., Severinghaus, J. P., Andraski, B. J., and Stonestrom, D. A.: Steady state fractionation of heavy noble gas isotopes in a deep unsaturated zone, *Water Resources Research*, 53, 2716–2732, <https://doi.org/10.1002/2016WR019655>, 2017.

Severinghaus, J. P., Beaudette, R., Headly, M. A., Taylor, K., and Brook, E. J.: Oxygen-18 of O<sub>2</sub> Records the Impact of Abrupt Climate Change on the Terrestrial Biosphere, *Science*, 324, 1431–1434, <https://doi.org/10.1126/science.1169473>, 2009.

Shackleton, N. J.: The 100,000-Year Ice-Age Cycle Identified and Found to Lag Temperature, Carbon Dioxide, and Orbital Eccentricity, *Science*, 289, 1897–1902, <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1897>, 2000.

Sharkey, T. D., Badger, M. R., Von Caemmerer, S., and Andrews, T. J.: High Temperature Inhibition of Photosynthesis Requires Rubisco Activase for Reversibility, in: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, edited by: Garab, G., Springer Netherlands, Dordrecht, 2465–2468, [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3953-3\\_577](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3953-3_577), 1998.

Sharp, Z. D. and Wostbrock, J. A. G.: Standardization for the Triple Oxygen Isotope System: Waters, Silicates, Carbonates, Air, and Sulfates, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 86, 179–196, <https://doi.org/10.2138/rmg.2021.86.05>, 2021.

Siegenthaler, U., Stocker, T. F., Monnin, E., Lüthi, D., Schwander, J., Stauffer, B., Raynaud, D., Barnola, J.-M., Fischer, H., Masson-Delmotte, V., and Jouzel, J.: Stable Carbon Cycle/Climate Relationship During the Late Pleistocene, *Science*, 310, 1313–1317, <https://doi.org/10.1126/science.1120130>, 2005.

Sigl, M., Fudge, T. J., Winstrup, M., Cole-Dai, J., Ferris, D., McConnell, J. R., Taylor, K. C., Welten, K. C., Woodruff, T. E., Adolphi, F., Bisiaux, M., Brook, E. J., Buizert, C., Caffee, M. W., Dunbar, N. W., Edwards, R., Geng, L., Iverson, N., Koffman, B., Layman, L., Maselli, O. J., McGwire, K., Muscheler, R., Nishiizumi, K., Pasteris, D. R., Rhodes, R. H., and Sowers, T. A.: The WAIS Divide deep ice core WD2014 chronology – Part 2: Annual-layer counting (0–31 ka BP), *Clim. Past*, 12, 769–786, <https://doi.org/10.5194/cp-12-769-2016>, 2016.

Spahni, R., Chappellaz, J., Stocker, T. F., Loulergue, L., Hausammann, G., Kawamura, K., Flückiger, J., Schwander, J., Raynaud, D., Masson-Delmotte, V., and Jouzel, J.: Atmospheric Methane and Nitrous Oxide of the Late Pleistocene from Antarctic Ice Cores, *Science*, 310, 1317–1321, <https://doi.org/10.1126/science.1120132>, 2005.

Stevens, C. L. R., Schultz, D., Van Baalen, C., and Parker, P. L.: Oxygen Isotope Fractionation during Photosynthesis in a Blue-Green and a Green Alga, *Plant Physiol.*, 56, 126–129, <https://doi.org/10.1104/pp.56.1.126>, 1975.

Stolper, D. A., Bender, M. L., Dreyfus, G. B., Yan, Y., and Higgins, J. A.: A Pleistocene ice core record of atmospheric O<sub>2</sub> concentrations, *Science*, 353, 1427–1430, <https://doi.org/10.1126/science.aaf5445>, 2016.

Stolper, D. A., Fischer, W. W., and Bender, M. L.: Effects of temperature and carbon source on the isotopic fractionations associated with O<sub>2</sub> respiration for <sup>17</sup>O/<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O ratios in *E. coli*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 240, 152–172, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.07.039>, 2018.

Strizh, I.: The Mehler Reaction as an Essential Link Between Environmental Stress and Chloroplast Redox Signaling, in: *Photosynthesis. Energy from the Sun*, edited by: Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., and Osmond, B., Springer Netherlands, Dordrecht, 1343–1346, [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9\\_289](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9_289), 2008.

Tcherkez, G. and Farquhar, G. D.: On the <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O isotope effect associated with photosynthetic O<sub>2</sub> production, *Functional Plant Biol.*, 34, 1049, <https://doi.org/10.1071/FP07168>, 2007.

Tcherkez, G., Gauthier, P., Buckley, T. N., Busch, F. A., Barbour, M. M., Bruhn, D., Heskell, M. A., Gong, X. Y., Crous, K. Y., Griffin, K., Way, D., Turnbull, M., Adams, M. A., Atkin, O. K., Farquhar, G. D., and Cornic, G.: Leaf day respiration: low CO<sub>2</sub> flux but high significance for metabolism and carbon balance, *New Phytologist*, 216, 986–1001, <https://doi.org/10.1111/nph.14816>, 2017.

Transport d'électrons et de protons le long de la chaîne photosynthétique : <https://www.maxicours.com/se/cours/les-etapes-de-la-photosynthese/> (dernier accès : 6 novembre 2023), n.d.

Veres, D., Bazin, L., Landais, A., Toyé Mahamadou Kele, H., Lemieux-Dudon, B., Parrenin, F., Martinerie, P., Blayo, E., Blunier, T., Capron, E., Chappellaz, J., Rasmussen, S. O., Severi, M., Svensson, A., Vinther, B., and Wolff, E. W.: The Antarctic ice core chronology (AICC2012): an optimized multi-parameter and multi-site dating

approach for the last 120 thousand years, *Clim. Past*, 9, 1733–1748,  
<https://doi.org/10.5194/cp-9-1733-2013>, 2013.

Villeudieu, C.: Rôle de la SIRT3 et de la déacétylation des protéines mitochondriales dans la cardioprotection: effet du vieillissement, Ph.D. thesis, Claude Bernard University Lyon 1, 2018.

Vilović, I., Schulze-Makuch, D., and Heller, R.: Variations in climate habitability parameters and their effect on Earth's biosphere during the Phanerozoic Eon, *Sci Rep*, 13, 12663, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39716-z>, 2023.

Vinogradov, A. P., Kutyurin, V. M., and Zadorozhnyi, I. K.: Isotope fractionation of atmospheric oxygen, *Geochem. Int.*, 3, 241–253, 1959.

Von Caemmerer, S. and Farquhar, G. D.: Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, *Planta*, 153, 376–387,  
<https://doi.org/10.1007/BF00384257>, 1981.

Wang, Y., Cheng, H., Edwards, R. L., Kong, X., Shao, X., Chen, S., Wu, J., Jiang, X., Wang, X., and An, Z.: Millennial- and orbital-scale changes in the East Asian monsoon over the past 224,000 years, *Nature*, 451, 1090–1093, <https://doi.org/10.1038/nature06692>, 2008.

Werle, P.: Accuracy and precision of laser spectrometers for trace gas sensing in the presence of optical fringes and atmospheric turbulence, *Appl. Phys. B*, 102, 313–329,  
<https://doi.org/10.1007/s00340-010-4165-9>, 2011.

West, J. B., Sobek, A., and Ehleringer, J. R.: A Simplified GIS Approach to Modeling Global Leaf Water Isoscapes, *PLoS ONE*, 3, e2447,  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002447>, 2008.

Wostbrock\*, J. A. G. and Sharp, Z. D.: Triple Oxygen Isotopes in Silica–Water and Carbonate–Water Systems, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 86, 367–400,  
<https://doi.org/10.2138/rmg.2021.86.11>, 2021.

Wostbrock, J. A. G., Cano, E. J., and Sharp, Z. D.: An internally consistent triple oxygen isotope calibration of standards for silicates, carbonates and air relative to VSMOW2 and SLAP2, *Chemical Geology*, 533, 119432, <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.119432>, 2020.

Yang, J.-W., Brandon, M., Landais, A., Duchamp-Alphonse, S., Blunier, T., Prié, F., and Extier, T.: Global biosphere primary productivity changes during the past eight glacial cycles, *Science*, 375, 1145–1151, <https://doi.org/10.1126/science.abj8826>, 2022.

Yeung, L. Y., Hayles, J. A., Hu, H., Ash, J. L., and Sun, T.: Scale distortion from pressure baselines as a source of inaccuracy in triple-isotope measurements, *Rapid Comm Mass Spectrometry*, 32, 1811–1821, <https://doi.org/10.1002/rcm.8247>, 2018.

## Annexes

Article soumis : *High precision  $\delta^{18}\text{O}$  measurements of atmospheric dioxygen using optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy (OF-CEAS)*

Cet article, soumis, dont je suis co-auteure, présente un nouvel instrument (SARA-O<sub>2</sub>) permettant de mesurer en continu la composition isotopique et élémentaire du dioxygène utilisé pour la première fois pour les expériences de cette thèse. Cet instrument est basé sur la technique de spectrométrie optique OF-CEAS et a été développé en collaboration avec Daniele Romanini du LIPHY et l'entreprise AP2E. L'ensemble des caractéristiques et le fonctionnement de cet instrument est détaillé dans cet article Piel et al. (*preprint*).

# High precision $\delta^{18}\text{O}$ measurements of atmospheric dioxygen using optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy (OF-CEAS)

Clément Piel<sup>1</sup>, Daniele Romanini<sup>2</sup>, Morgane Farradèche<sup>3</sup>, Justin Chaillot<sup>3</sup>, Clémence Paul<sup>3</sup>, Nicolas Bienville<sup>3</sup>, Thomas Lauwers<sup>3</sup>, Joana Sauze<sup>1</sup>, Kevin Jaulin<sup>4</sup>, Frédéric Prié<sup>3</sup>, Amaëlle Landais<sup>3</sup>

5 <sup>1</sup> Ecotron Européen de Montpellier (UAR 3248), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Montpellier, Campus Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France

<sup>2</sup> Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Univ Grenoble Alpes, CNRS/UGA, Saint-Martin-d'Hères, France

<sup>3</sup> Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, LSCE - IPSL, CEA-CNRS-UVSQ, Université Paris-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

10 <sup>4</sup> AP2E, 240, rue Louis de Broglie, Les Méridiens Bâtiment A, CS90537, F-13593 Aix-en-Provence, FRANCE

Correspondence: Clément Piel (clement.piel@cnrs.fr)

## **Short summary**

This paper introduces a new optical gas analyzer based on the Optical-Feedback Cavity-Enhanced Absorption Spectroscopy technique (OF-CEAS) enabling high temporal resolution and high precision  
15 measurement of  $\delta^{18}\text{O}$  and concentration of atmospheric  $\text{O}_2$ . The results underscore the good agreement with dual inlet IRMS measurements and the ability of the instrument to monitor biological processes.

## **Abstract**

Atmospheric dioxygen concentration and isotopic composition are closely linked to the carbon cycle  
20 through anthropic  $\text{CO}_2$  emissions and biological processes such as photosynthesis and respiration. Measurement of isotopic ratio of atmospheric dioxygen, trapped in ice core bubbles, bring information about past variation in the hydrological cycle at low latitudes, as well as past productivity. Currently, the interpretation of those variations could be drastically improved with a better (*i.e.* quantitative) knowledge of the oxygen fractionation that occur during photosynthesis and respiration  
25 processes. This could be achieved, for example, during experiment using closed- biological chambers.



In order to estimate the fractionation coefficient with a good precision, one of the principal limitations is the need of high frequency on-line measurements of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration. To address this issue, we developed a new instrument, based on the OF-CEAS (Optical-Feedback Cavity-Enhanced Absorption Spectroscopy) technique, enabling high temporal resolution and continuous  
30 measurements of dioxygen concentration as well as  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ , both simultaneously. The characterization of this instrument showed that analytical precision reached 0.002 % for  $\text{O}_2$  concentration and 0.06 ‰ for  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  for an integration time of 10 minutes. While humidity did not affect much the measured values, measurements but  $\text{O}_2$  concentration had an influence on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ , which should hence be quantified. To ensure good quality of  $\text{O}_2$  concentration and  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$   
35 measurements we eventually proposed to measure calibration standard every 20 minutes.

## **1.Introduction**

Dioxygen is the second most important constituent of the atmosphere and the evolution of its atmospheric concentration is closely related to the evolution of the carbon cycle through fossil fuel combustion and biosphere processes (respiration and photosynthesis). The atmospheric dioxygen  
40 concentration has been shown to decrease by 0.7 % over the last 800 ka probably because of changes of organic carbon burial and oxidation rates with a stabilizing effect of silicate weathering (Stolper et al., 2016). On shorter timescales, the dioxygen concentration is showing clear seasonal variations anticorrelated with atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration, the combination of both  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  concentrations enabling to document the variability of the marine and terrestrial biosphere  
45 productivity through calculation of the atmospheric potential oxygen (*e.g.* Keeling and Shertz, 1992; Stephens et al., 1998; Keeling and Manning, 2014; Goto et al., 2017).

The isotopic composition of atmospheric dioxygen, expressed as  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  or  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ , exhibits variations at the orbital (10,000 years) and millennial scale (Severinghaus et al., 2009; Landais et al., 2010) but no appreciable variation at the seasonal scale has been evidenced. Past  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  variability  
50 has been linked to variations in low latitude water cycle and possibly to the variability of the relative proportions of terrestrial and marine productivity (Bender et al., 1994; Luz and Barkan, 2011; Extier et al., 2018). Still, evaluating the relative importance of these two contributions remains difficult since it relies on fractionation factors associated with the biological processes consuming and producing oxygen. These fractionation factors have only been determined for a small number of species and  
55 often at the micro-organism scale.

Combining measurements of  $\delta^{17}\text{O}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  permits to have access to gross primary production and is largely used for this purpose in the ocean in combination with the  $\text{O}_2/\text{Ar}$  ratio (Luz and Barkan, 2000; Stanley et al, 2010; Jurikova et al, 2022). In addition, when measuring  $\Delta^{17}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  in old air trapped in ice cores, we have access to the past variability of the global biosphere productivity  
60 although with large uncertainties (Luz et al., 1999; Blunier et al., 2002; Brandon et al., 2020; Yang et al., 2022). Part of this limitation is again linked to our poor knowledge of the isotopic fractionation factors during the biological processes.

In order to progress on the quantitative determination of the oxygen fractionation factors in the biosphere, a good approach is to work on closed biological chambers where plants grow in controlled  
65 conditions. This approach was already applied in previous studies, mostly at the micro-organism scale with regular sampling of air from the biological set-up (Guy et al., 1993; Helman et al., 2005; Stolper et al., 2018). At a larger scale such as for a macroscopic study on a terrarium the duration of the experiment needs to be larger to have a quantified signal (Luz et al., 1999).

One of the main limitations when working on the experimental determination of the fractionation  
70 factors is that we need numerous measurements of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration to make a precise determination (Paul et al., 2023). However, sampling air from the chamber at high resolution is not convenient since it implies to reduce the quantity of atmospheric air in the biological chamber.

Development of continuous measurements of dioxygen concentration has permitted to improve the monitoring of atmospheric dioxygen concentration in parallel with greenhouse gases. These methods  
75 use different techniques such as fuel cell analyzer (Goto et al., 2013) or gas chromatography coupled with a thermal conductivity detector (Tohjima, 2000). More recently, Berhanu et al. (2019) developed an analyzer based on the CRDS (Cavity-Ring-Down Spectroscopy) technique which is able to measure the concentration of atmospheric dioxygen with high precision (standard error of 1 ppm over 1 minute measurement) on one mode as well as the isotopic composition of dioxygen with a 10 ppm standard  
80 error) on a second mode. However,  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentrations are not measured on the same mode and so not at the same time.

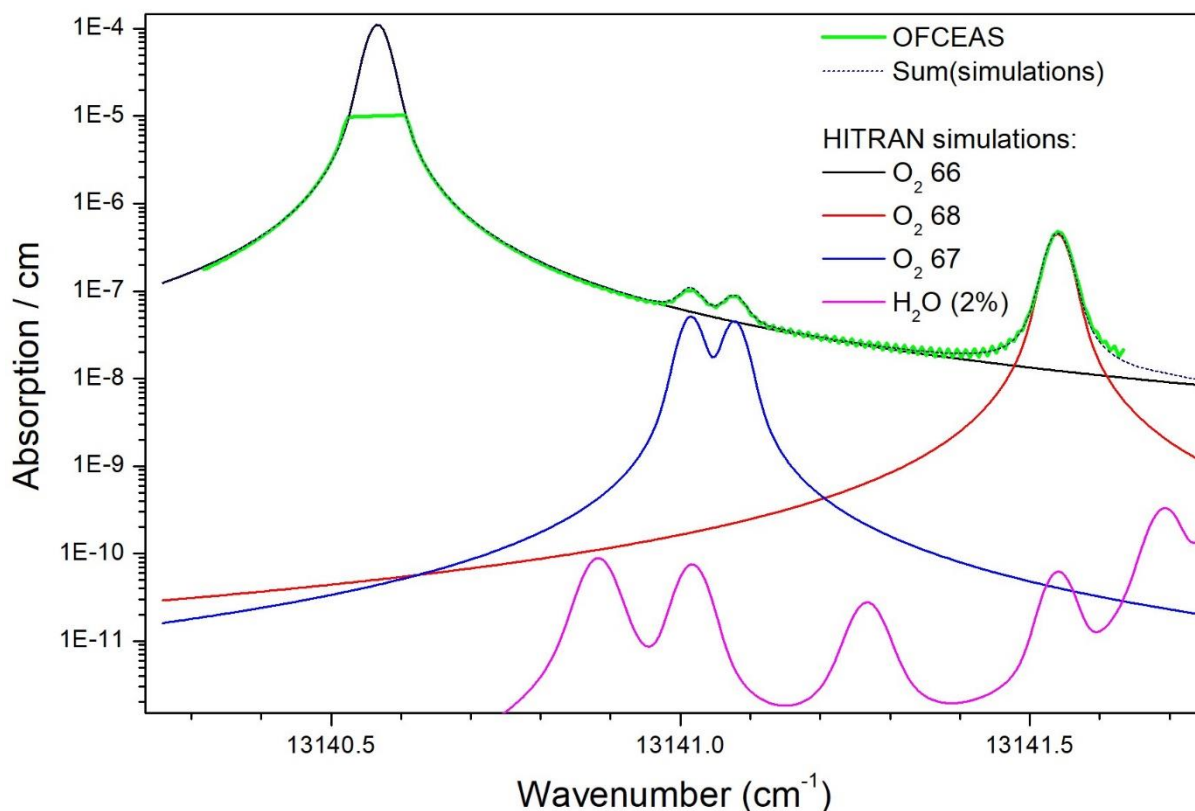
We present here a new instrument based on the OF-CEAS (Optical-Feedback Cavity-Enhanced Absorption Spectroscopy) technique, able to measure the atmospheric  $\text{O}_2$  concentration and  $\delta^{18}\text{O}$  of  
85  $\text{O}_2$  in parallel. After a presentation of the instrumental design, we discuss the performances of the instrument as well as the influences of humidity on the determination of  $\text{O}_2$  concentration and isotopic composition and  $\text{O}_2$  concentration on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ . Based on our tests, we propose a sequence for

calibration of the instrument during series of measurements. This sequence is then used to compare the performance of this instrument to a classical IRMS for measurements of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration.

## 90 **2. Material and methods**

### 2.1 Instrument description

We present here a new analyzer for  $\text{O}_2$  based on the high sensitivity absorption spectroscopy technique OF-CEAS. This technique is based on a high finesse optical cavity and is analogous to the well-known Cavity-Ring-Down Spectroscopy. It was first described in (Morville et al., 2005) (see also  
95 (Morville et al., 2014) and since then successfully exploited in different laboratories and field applications . In addition, the simple and compact optical layout of OF-CEAS led to the development of robust commercial devices [[www.AP2E.com](http://www.AP2E.com)]. The instrument used in this study is based on an AP2E analyzer customized to satisfy some specific demands. First of all, the operating wavelength of the DFB (Distributed Feed-Back) diode laser optical source targets a specific region of the dioxygen  
100 absorption band around 760 nm. This so-called “A” band is the strongest absorption band of this molecule in the visible and infrared spectral range, even though it is still a relatively weak “forbidden” magnetic-dipole transition. In this spectral region, several weak lines of the  $^{18}\text{O}\text{-}^{16}\text{O}$  and  $^{17}\text{O}\text{-}^{16}\text{O}$  isotopologues are present near-by strong lines of the main  $^{16}\text{O}\text{-}^{16}\text{O}$  isotopologue. The specific spectral window chosen for our analyzer, which can be covered by a single current-driven laser frequency scan,  
105 is displayed in Figure 1.



110 Figure 1: Air absorption spectrum from the instrument (green) superposed with HITRAN simulation (black dotted) which results as the sum of absorption from the main O<sub>2</sub> isotopologues and the <sup>18</sup>O and <sup>17</sup>O varieties (respectively in red and blue). Simulated water vapor absorption for a 2 % molar fraction is plotted to show that it can be neglected in the spectral analysis. Vertical scale is logarithmic in order to allow clearer display of weaker absorption features.

115 This analyzer is a prototype of a new series of AP2E devices featuring enhanced thermal insulation and stabilization (in particular, sample cell temperature is 37 °C with mK fluctuations), which allows more stable measurements on longer time scales. This is important for averaging isotopic ratios and detect precisely their small variations when switching among samples, *e.g.* for calibration of a measured isotopic ratio relative to a reference sample. Like previous OF-CEAS instruments, the sample cell has a small volume (less than 20 cc) which, combined with a low sample pressure (150 mBar), results in a transit time of about 10 s with a sample flow of only about 15 sccm. Another improvement is a more accurate, stable and fast control of the sample pressure inside the measurement cell, which is also important for stable long-term measurements. In particular, the fast response allows minimization of the transition dead time (~10 s) when switching between samples, which produces perturbations to flow and pressure affecting the measurements.

125 As previously described (Kerstel and Gianfrani, 2008) isotopic ratios may be measured by optical  
 absorption spectroscopy by obtaining spectra containing at the same time the absorption line profiles  
 of an isotopologue and its main variety. In our case we are considering the dioxygen isotopologues  
 mentioned above, in particular the  $^{18}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  variety. A simulated absorption spectrum showing close-  
 by absorption lines for the working spectral region of the instrument is plotted in Figure 1 (based on  
 130 the well-known HITRAN spectral database) together with a real spectrum obtained from the  
 instrument. As visible in the figure, the strong  $^{16}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  line is truncated at the top due to saturation of  
 the absorption scale of the instrument (this point will be addressed below). The isotopic ratio is then  
 obtained as the ratio of the line areas for the considered isotopologue normalized to that of the main  
 isotopologue. It is straightforward to demonstrate that, under conditions of constant gas sample  
 135 temperature and pressure, this ratio is indeed linearly proportional to the ratio of the mole fractions  
 of these species in the sample. The isotopic ratio variation (delta value -  $\delta$  - in permil units - ‰) is then  
 calculated after measuring the ratio of areas of the same absorption lines for a reference sample by  
 using the simple equation (written here for the  $^{18}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  case):

$$\delta^{18}\text{O} = \left( \frac{\left( \frac{A_{18}}{A_{16}} \right)_{\text{sample}}}{\left( \frac{A_{18}}{A_{16}} \right)_{\text{reference}}} - 1 \right) \times 1000$$

140 where  $A_{18}$  and  $A_{16}$  are the area of the absorption line for  $^{18}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  and  $^{16}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  respectively.

Given the low relative abundances of the  $^{18}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  (0.2 %) and  $^{17}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  (0.04 %) relative to the main  
 isotopologue  $^{16}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$ , the corresponding absorption lines appear much less intense, by about the  
 abundance ratio (Figure 1). For their measurement, this actually implies that the instrument sensitivity  
 must be high to obtain the absorption lines of these minor isotopologues with sufficient signal to noise  
 145 ratio. On the other hand, the absorption signal of the main variety will be so strong as to actually  
 exceed the dynamic range of the instrument. Indeed, the high finesse (50,000) optical cavity  
 containing the sample becomes opaque (no light transmitted) when the laser diode is tuned across  
 the center of any of the  $^{16}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  lines available near-by the strongest  $^{18}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  and  $^{17}\text{O}$ - $^{16}\text{O}$  lines in this  
 absorption band. The same problem would occur by choosing weaker absorption bands at other  
 150 wavelengths, but no instrument would be capable as of today of providing a sufficiently good signal  
 for the lines of the minor isotopologues. One way to avoid this would be to use a second diode laser  
 to address a sufficiently weak main isotopologue line lying rather far away in the same absorption  
 band or even in another absorption band (each diode laser covers a small spectral region). However,  
 this would double size and complexity of the experimental setup. Therefore, we decided to rely on

155 the measured wings of the main isotopologue line in order to obtain an estimate of the absorption  
line area. We achieved excellent performance, comparable to those obtained by the OF-CEAS  
technique with non-saturated absorption lines (see for example isotopic measurements on H<sub>2</sub>O,  
Landsberg et al., 2014). Even if this estimate may be affected by a multiplicative form factor, this same  
factor will affect measurements of the reference sample and cancel out in the above equation. The  
160 situation is particularly favorable for measurement of samples presenting small concentration  
variations from the target species, as it is here the case for dioxygen in atmospheric air varying from  
about 18 to 23 % in biological experiments.

In order to obtain the area of the saturated line of the main isotopologue, we exploit the fact that the  
data analysis software is able to “count” the cavity modes, each corresponding to a data point in the  
165 spectrum (Morville et al., 2014). This works well even though there is here a large region in the laser  
spectral scan where points are missing. This is possible thanks to the fact that cavity modes appear  
uniformly spaced over the laser scan. In addition, we had to take care of the fact that, due to  
temperature drift, the cavity length slowly changes. As a consequence, the absolute frequency  
positions of the cavity modes changes, thus at the end the position of the data points over the  
170 absorption line profiles changes too. That implies that one or the other of the two modes which are  
on the two sides of the strong line may go above/below the threshold for being used by the spectral  
fit. Such a change of the number of datapoints in the fit causes a discontinuity in the retrieved line  
areas. In order to fix this problem, we used the position of the data points relative to the absorption  
lines to continuously adjust (at the mK level) the cavity temperature setpoint and keep the cavity  
175 modes at absolute fixed frequency positions. This also allows more stable retrieval of all line areas  
from the spectral fit, as the spectral data points keep fixed positions relative to the absorption profiles  
which are fitted by Rautian profiles. Even if the Rautian model is much better than the more widely  
used Voigt profile, it still does not perfectly describe real line profiles. Thus, a displacement of the data  
points induces small changes in the fit results (even in the absence of noise).

180 Over the time span of presented results (18 months), we tested two different instrument  
configurations. For both initial and second configurations, we finally obtained similar performances.  
The main difference between the two configurations is the high reflectivity mirrors installed on the V-  
shaped optical cavity. For the initial configuration and its corresponding set of mirrors, the cavity  
finesse was higher by about a factor 2. The cavity throughput was also higher, which induced a higher  
185 level of scattered light and higher level of interference fringes on the recorded spectra. The second  
set of mirrors, corresponding to the second configuration with lower reflectivity, had also lower  
transmission (higher absorption losses in the coatings). This tuning produced less signal on the

photodetector at cavity output but with less parasitic fringes. In both cases the setup was carefully optimized in particular light traps were placed at all positions possibly causing light scatter by secondary light reflections. In the following we will specify which setup was used for which results which will account for somewhat varying performances.

## 2.2 Air stream selection

The air stream allowed to the instrument inlet was selected using a Valco multiposition valve (EUTF-SD8MWE, VICI AG, Switzerland),  $\frac{1}{8}$  PFA tubing (PFA-T2-030-100, Swagelok), and filtered using a Swagelok 7 $\mu$ m filter (SS-2F-7). Three gas streams, at ambient pressure, could be selected by the Valco valve: (1) synthetic mixture of O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> with an O<sub>2</sub> concentration similar to ambient (synthetic dry air, Alphagaz 2, Air Liquide France), (2) ambient atmospheric air (sampled at the inlet of the room ventilation duct) dried with a 40 mL magnesium perchlorate filter, (3) natural dry atmospheric air cylinder enriched in oxygen (Natural Air enriched at 22.9 % O<sub>2</sub>, Air Liquide Spain) subsequently diluted with N<sub>2</sub> (Alphagaz 2, Air Liquide France) using two mass flow controllers (F200CV and F201CV, Bronkhorst, The Netherlands). All the measurements took place in a temperature-controlled room, with temperature fluctuations within +/- 2 °C around setpoint.

In routine mode, humid air was dried using a 20 cm long home-made humidity trap made with 6 mm PFA tubing (Swagelok PFA-T6M-1M-30M). This trap was daily replaced. For water vapor dependency measurements, the humidity trap was removed, and a stream of synthetic air (Air Product, < 3 ppm of water), with constant O<sub>2</sub> concentration and  $\delta^{18}\text{O}$ , was humidified at a constant setpoint using a vapor generator (see Leroy-Dos Santos et al., 2021 for more details) up to 9,000 ppm.

## 2.3 Isotope-ratio mass spectrometry (IRMS) measurements

IRMS analyses were used as a reference method to validate measurement achieved with OF-CEAS technique. Samples of air were punctually collected in 5 ml glass flasks to be analyzed through IRMS. Operation of the automated sampling system is detailed in Paul et al (submitted). Briefly, air from a closed chamber system was circulating through the instrument and the flask for 30 min. Then the flask was automatically isolated thanks to two valves and collected to be analyzed. Results from the flask and the 30 min data acquisition were, in the end, compared.

Flasks were analyzed for  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub> and  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$ .  $\delta\text{O}_2/\text{Ar}$  can be converted into O<sub>2</sub> concentration (or vice versa) knowing that:

$$\delta_{O_2/Ar} = \left( \frac{([O_2]/[Ar])_{sample}}{([O_2]/[Ar])_{reference}} - 1 \right) \times 1000$$

[O<sub>2</sub>] and [Ar] are the concentrations of O<sub>2</sub> and Ar respectively and the reference is the present-day atmospheric air.

220 Before analysis, samples are purified to isolate O<sub>2</sub> and Ar from total air using a gas chromatography column as in Barkan and Luz (2003). Measurements are then performed using mass spectrometry with dual inlet as described in (Paul et al., 2023). For each sample, 2 sequences of 16 measurements are performed and the final uncertainty is 0.03 ‰ (1σ) for δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> and 0.5 ‰ (1σ) for δO<sub>2</sub>/Ar.

### **3. Results and discussion**

#### 225 3.1 Precision and drift

The instrument was primarily designed and optimized to measure oxygen isotope ratio of dioxygen (δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub>), but was also capable of measuring, simultaneously, dioxygen concentration.

230 The first characterization of the instrument was done through the measurement of the Allan deviation (Figure 2). We introduced in the instrument over several hours dry atmospheric air, which had a constant elemental and isotopic O<sub>2</sub> composition. Allan deviation was done repeatedly for each different configuration, and the result shown is a typical reproducible result. The minimum of the Allan deviation was reached between 10 and 20 minutes of measurements for both O<sub>2</sub> concentration and δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub>, and with both configurations (Figure 2). The precision achieved for O<sub>2</sub> concentration measurement was better using the initial configuration (0.002 ‰; Figure 2 dark green data) than the second configuration (0.005 ‰; Figure 2 light green data). On the contrary, the δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> minimal Allan deviation was lower with the second configuration than the initial one (50 ppm vs 80 ppm respectively; Figure 2 grey and dark data).



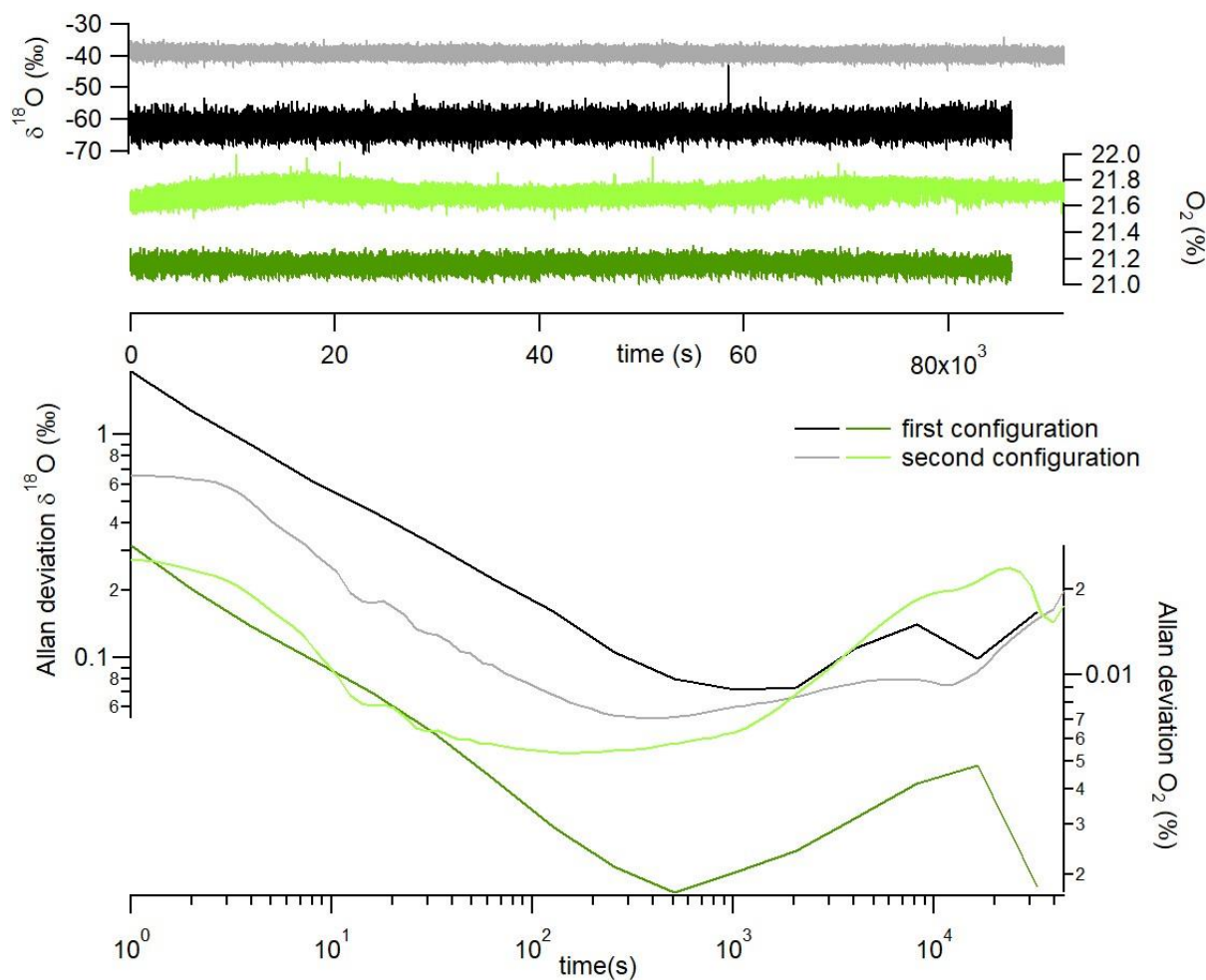
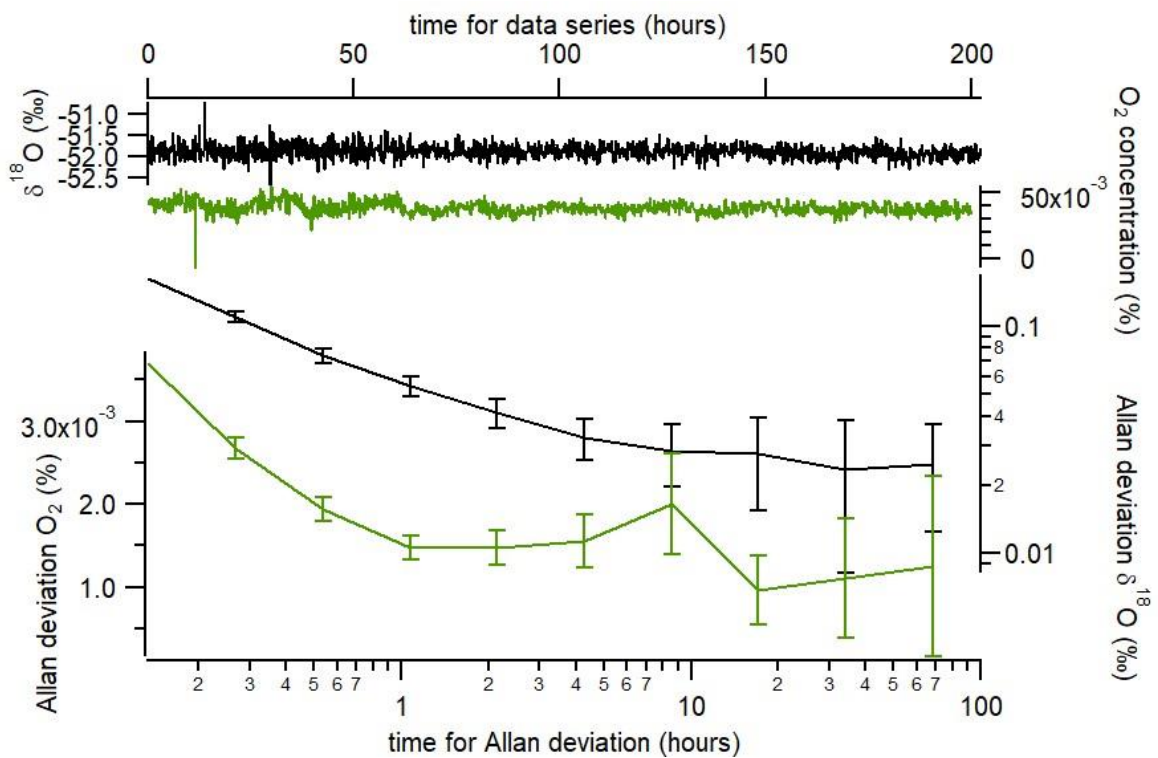


Figure 2: Top panel shows continuous measurement of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (grey and black) and  $\text{O}_2$  concentration (light and dark green). Down panel shows Allan deviation plots based on continuous measurement of both  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  (grey and black) and  $\text{O}_2$  concentration (light and dark green). Black and dark green are used for initial configuration; grey and light green for second configuration.

After 2 hours, the values of the Allan deviations stayed below 0.2 ‰ for  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and 0.03 % for  $\text{O}_2$  concentration. This showed a moderate drift of the instrument and the need for regular measurement of standard during experimentation.

To assess the stability of the instrument on periods longer than 2 hours, we ran measurements of two standards during 8 consecutive days. The 2 standards were dry atmospheric air and a mixing of  $\text{O}_2$  and  $\text{N}_2$  in atmospheric proportions (synthetic air from Air Liquide). The evolution of the Allan deviation on

250 Figure 3 was calculated from successive injections of the two standards every 4 minutes. Averages of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration were calculated taking into account the 2 last minutes (the first two minutes after injection were removed from the calculation to take into account memory effect). With this approach, we obtained an Allan deviation for  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  below 0.03 ‰ after 6 hours of measurements. The evolution of  $\text{O}_2$  concentration was marked by a diurnal variability which may have  
 255 been linked with room temperature changes. The Allan deviation however reached values lower than  $1.5 \cdot 10^{-3}$  ‰ after 15 hours of measurements.



260 Figure 3: Evolution of difference in mean  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration when running successive measurements of two gases (dry atmospheric air and synthetic air) at a periodicity of 8 minutes (4 minutes of atmospheric air followed by 4 minutes of synthetic air). The data used for calculation are the mean values obtained over the last 2 minutes of measurements of each gas. For this series of measurements, the initial configuration has been used but a similar result was obtained with the second configuration.

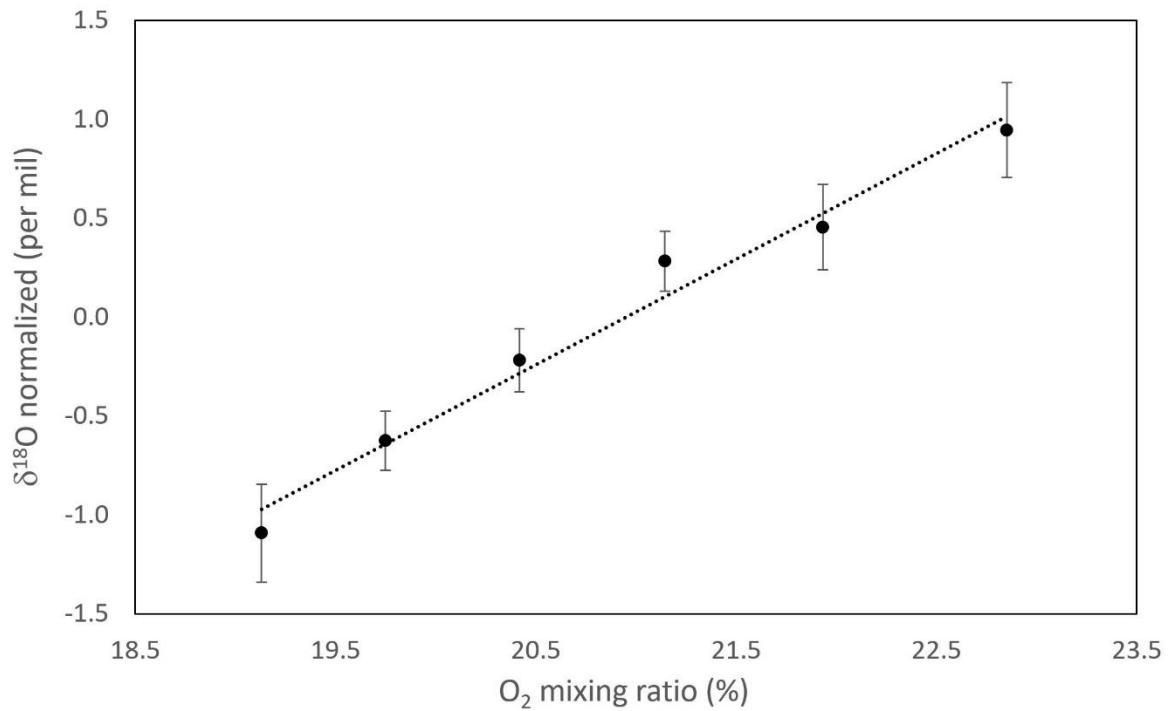
265

### 3.2 Influence of water vapor concentration

We measured the dependence of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration on humidity and found that there was only a slight dependence. A dependence of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration on humidity is actually expected for two reasons. First, there is no water vapor absorption line with sufficient intensity to be relevant even at high humidity levels, within the wavelength range analyzed by the instrument. Second, water vapor could still significantly affect the linewidth of all the oxygen lines by collisional broadening. Indeed, even at the modest 1 % mixing ratios corresponding to high atmospheric humidity, water vapor is known to produce significantly enhanced pressure broadening of the absorption lines of other molecules compared to major atmospheric components like  $\text{N}_2$  or  $\text{O}_2$ . As a consequence, and even if we can correct for the humidity influence, we prefer measuring  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration after gas have been dried before introduction in the instrument.

### 3.3 Linearity

An influence of  $\text{O}_2$  concentration on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  was expected. Indeed, the parameterized models used for spectrum simulations are associated with uncertainties so that using the theoretical spectroscopic profile does not enable us to faithfully reproduce the shape of the experimental spectrum. As a consequence, we cannot precisely subtract the effect of the amplitude variation of the large  $^{16}\text{O}$  line (directly linked to the abundance of  $\text{O}_2$ ) on the neighboring  $^{18}\text{O}$  line (see spectrum in Figure 1). This difficulty can be overcome by quantifying this effect through the study of the influence of  $\text{O}_2$  concentration on the measured  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$ . Figure 4 showed the linearity effect, *i.e.* the evolution of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  with increasing  $\text{O}_2$  concentration. Standard dry atmospheric air enriched with  $\text{O}_2$  was diluted with nitrogen to measure 6 different  $\text{O}_2$  mixing ratios (Figure 4 x-axis). The difference in  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  between diluted standard and atmospheric air was then used to correct for any instrument drift (Figure 4 y-axis). The influence of  $\text{O}_2$  concentration on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  was clearly significant.  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  increased by 0.37 ‰ with 1 % increase in  $\text{O}_2$  concentration (Figure 4).



290

Figure 4: Evolution of the difference in  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  between a diluted standard (atmospheric air enriched with  $\text{O}_2$ ) with  $\text{N}_2$  and the atmospheric air vs  $\text{O}_2$  concentration of the diluted standard.  $\delta^{18}\text{O}$  is normalized for the ambient  $\text{O}_2$  mixing ratio, and error bars are the standard deviation of individual measurements ( $n=27$ ). This result was obtained with the initial configuration.

295

Finally, note that the spectroscopic profile is influenced by many environmental parameters. Because of possible drift in pressure and temperature sensors, it is a good practice to regularly check the evolution of this influence of  $\text{O}_2$  on the measured  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  once every 15 days.

### 300 3.4 Response time

The response time of the analyzer, when switching between different gas streams, was dependent on the total volume of the system (valve, filter, dryer, tubing, and the instrument internal volume) and

the flow rate at the inlet. It was determined that 2 minutes purge time, between samples, were necessary to reach a new steady state for both O<sub>2</sub> concentration and  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub> (Figure 5).

305

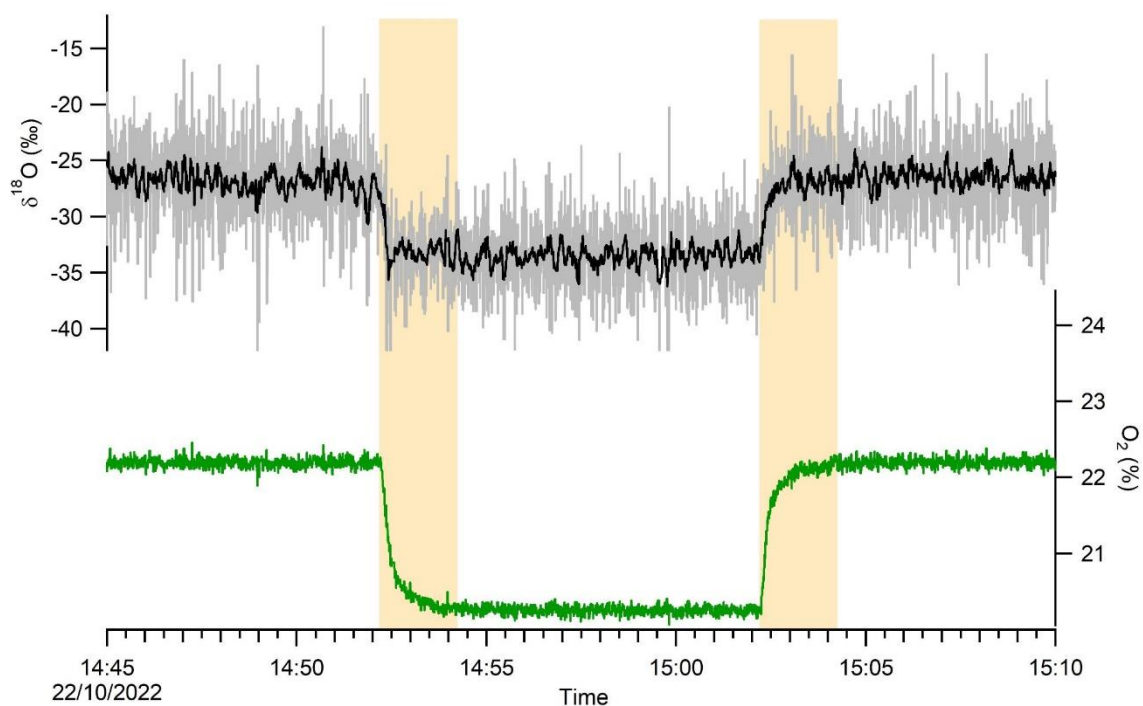


Figure 5: Raw data of  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub> (3 Hz, gray line) and moving average (over 5 second, black line) measured with two gas streams with contrasted O<sub>2</sub> concentration (green line). The response time is outlined in yellow. These results were exactly the same for the two configurations.

310

### 3.5 Calibration strategy

Based on the detailed results above, we used the following strategy to ensure good quality measurements of the isotopic and elemental composition of O<sub>2</sub> in atmospheric air using an OF-CEAS instrument.

- 315 1- Place a magnesium perchlorate trap at the entrance of the instrument to work with dry air, hence easily work with standards made of dry air and avoid the dilution effect observed on the O<sub>2</sub> concentration.

2- According to our observations, we suggest checking the dependency of the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  on  $\text{O}_2$  concentration by running successive dilution of a standard with  $\text{N}_2$  every 15 days.

320 3- A two-point calibration is needed with different values of  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  concentration. In our case, we used dry atmospheric air and a standard made of dry atmospheric air enriched with 2 % of  $\text{O}_2$  (hence  $\text{O}_2$  concentration of 23 % instead of 21 % in dry atmospheric air). Our tests have shown that the measured difference in  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and in  $\text{O}_2$  concentration between the two standards is stable over a 24 hours period. As a consequence, it is enough to run the two standards only once or twice a  
325 day and then to measure only one standard with the measurements in the daily routine.

4- The evolution of the Allan variance suggested that, to avoid any drift, a one-point calibration should be done at least every 20 minutes. Moreover, to obtain a small  $1\sigma$  value, averages over 5-10 minutes should be done for each sample injection.

5- In order to account for the instrument response time, it is important to remove the first 2 minutes  
330 from the measurement series (purge time) when we switch from one standard to a sample or from one standard to another standard.

6- Finally, for our purpose, we used the following measurement sequence:

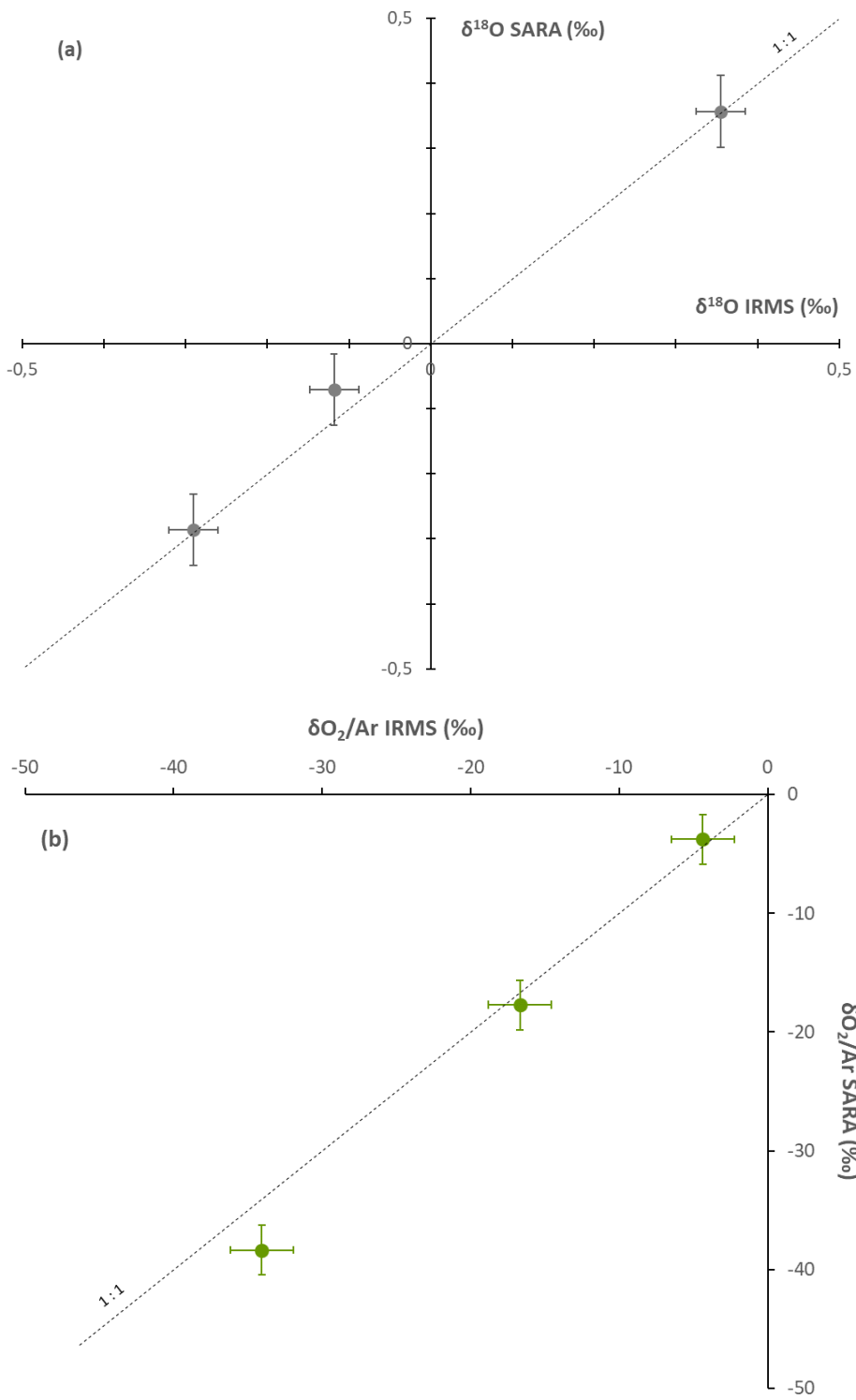
- Every 15 days: calibration of the influence of  $\text{O}_2$  concentration on  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{O}_2$
- Every morning: 6-minutes measurement of atmospheric air enriched with  $\text{O}_2$  and 6-minutes  
335 measurement of atmospheric air. Only the last 4 minutes of each plateau were kept for calculation of the average values.
- During the day: 6-minutes measurements of dry atmospheric air, 6-minutes measurements of sample 1, 6-minutes measurements of sample 2, 6-minutes measurements of sample 3, back to 6-minutes measurement of dry atmospheric air. Only the last 4 minutes of each plateau  
340 were kept for calculation of the average values.

### 3.6 Accuracy of measurements: comparison with IRMS measurements

In order to validate the performance of this new analyzer, with the calibration sequence proposed in the previous section, we measured the same samples with our analyzer and with an IRMS. We sampled

air in 5 mL flasks from a closed biological chamber while the analyzer was measuring the elemental  
345 and isotopic composition of O<sub>2</sub> following the sequence described above. We measured the isotopic  
value of O<sub>2</sub> from the flasks by IRMS (see section 2.3). These values were compared to the values  
obtained by the analyzer during the same period.

The results of this comparison are displayed on Figure 6 for configuration 1 (same result was obtained  
for configuration 2). The values obtained by the two techniques agree for the 3 biological samples  
350 within uncertainty range for measurements of  $\delta^{18}\text{O}$  of O<sub>2</sub>, and with only a slight discrepancy for O<sub>2</sub>  
concentration, which validates the use of the spectroscopy analyzer for ambient air and biological  
chambers measurements.



355 Figure 6: Comparison of the concentration (a) and isotopic composition (b) of O<sub>2</sub> obtained by IRMS and by our spectroscopic analyzer (SARA) for different biological samples. The dashed line shows the 1:1 relationship between δ<sup>18</sup>O measured by IRMS and δ<sup>18</sup>O measured by the spectroscopic analyzer.



## **4. Conclusion**

360 We developed a new instrument based on OF-CEAS technique enabling continuous measurements of elemental and isotopic composition of O<sub>2</sub> in the atmosphere. We targeted the region of the dioxygen absorption band around 760 nm to capture a signal for <sup>16</sup>O-<sup>17</sup>O, <sup>16</sup>O-<sup>16</sup>O and <sup>18</sup>O-<sup>18</sup>O and developed a special fitting for the <sup>16</sup>O-<sup>16</sup>O peak which is saturated.

365 The instrument has been characterized and we could reach a precision of 0.002 % on O<sub>2</sub> concentration and 50 ppm on δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> for an integration time of 10 minutes. The drift of the instrument deteriorates the signal but the values for Allan deviations stay below 0.2 ‰ for δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> and 0.03 % for O<sub>2</sub> concentration after 2 hours of continuous measurement. The measurements are not affected by humidity in the atmosphere but O<sub>2</sub> concentration has an influence on δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> which should hence be quantified.

370 Based on the performances of the instrument, we proposed a procedure for running O<sub>2</sub> measurements for sample or in a continuous way based on a frequent (every 20 minutes) injection of calibration standard. This procedure permitted to obtain performance in good agreement with dual inlet IRMS measurements in a shorter time. It was particularly adapted for monitoring biological processes in a continuous way.

375 In the future, this instrument may be used in several set-ups where a continuous measurement of O<sub>2</sub> concentration and δ<sup>18</sup>O of O<sub>2</sub> is needed. The instrument was also able to measure the δ<sup>17</sup>O of O<sub>2</sub> but the current precision was not sufficient yet for competing with IRMS measurements.

### **Data availability**

380 The data supporting the conclusions of this paper is available upon request.

### **Author contributions**

AL and CPI designed the project. DR designed the optical spectrometer, with assistance and expertise from MF and KJ, and most of the hardware was purchased to KJ from AP2E. MF conducted the initial tests and tuning at LiPhy. Final tuning was performed at Liphy by DR and JC. CPI, JS, CPa carried out 385 the experiments at ECOTRON of Montpellier and FP, NB and TL at LSCE. CPI, JS, CPa, NB and AL

analyzed the data from the optical spectrometer and CPa and AL analyzed the data from IRMS. CPi, DR, JS and AL prepared the manuscript with contributions from all the authors.

## Competing interests

390 The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Union H2020 Programme (H2020/20192024)/ERC grant agreement no. 817493 (ERC ICORDA). The authors acknowledge the scientific and technical support of PANOPLY (Plateforme  
395 ANalytique géOsciences Paris-saLaY), Paris-Saclay University, France. This study benefited from the CNRS resources allocated to the French ECOTRONS Research Infrastructure, from the Occitanie Region and FEDER investments as well as from the state allocation 'Investissement d'Avenir' AnaEE- France ANR-11-INBS-0001. We would also like to thank Sébastien Devidal, Abdelaziz Faez, Olivier Ravel and Alex Milcu from ECOTRON of Montpellier for their help.

## 400 Bibliography

Barkan, E. and Luz, B.: High-precision measurements of  $17\text{O}/16\text{O}$  and  $18\text{O}/16\text{O}$  of  $\text{O}_2$  and  $\text{O}_2/\text{Ar}$  ratio in air, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2809–2814, <https://doi.org/10.1002/rcm.1267>, 2003.

405 Bender, M., Sowers, T., and Labeyrie, L.: The Dole Effect and its variations during the last 130,000 years as measured in the Vostok Ice Core, *Glob. Biogeochem. Cycles*, 8, 363–376, <https://doi.org/10.1029/94GB00724>, 1994.

Berhanu, T. A., Hoffnagle, J., Rella, C., Kimhak, D., Nyfeler, P., and Leuenberger, M.: High-precision atmospheric oxygen measurement comparisons between a newly built CRDS analyzer and existing measurement techniques, *Atmospheric Meas. Tech.*, 12, 6803–6826, <https://doi.org/10.5194/amt-12-6803-2019>, 2019.

Brandon, M., Landais, A., Duchamp-Alphonse, S., Favre, V., Schmitz, L., Abrial, H., Prié, F., Extier, T., and Blunier, T.: Exceptionally high biosphere productivity at the beginning of Marine Isotopic Stage 11, *Nat. Commun.*, 11, 2112, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15739-2>, 2020.

415 Extier, T., Landais, A., Bréant, C., Prié, F., Bazin, L., Dreyfus, G., Roche, D. M., and Leuenberger, M.: On the use of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$  for ice core dating, *Quat. Sci. Rev.*, 185, 244–257, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.02.008>, 2018.

- 420 Goto, D., Morimoto, S., Ishidoya, S., Ogi, A., Aoki, S., and Nakazawa, T.: Development of a High Precision Continuous Measurement System for the Atmospheric O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> Ratio and Its Application at Aobayama, Sendai, Japan, *J. Meteorol. Soc. Jpn. Ser II*, 91, 179–192, <https://doi.org/10.2151/jmsj.2013-206>, 2013.
- Goto, D., Morimoto, S., Aoki, S., Patra, P. K., and Nakazawa, T.: Seasonal and short-term variations in atmospheric potential oxygen at Ny-Ålesund, Svalbard, *Tellus B Chem. Phys. Meteorol.*, 69, 1311767, <https://doi.org/10.1080/16000889.2017.1311767>, 2017.
- 425 Guy, R. D., Fogel, M. L., and Berry, J. A.: Photosynthetic Fractionation of the Stable Isotopes of Oxygen and Carbon, *Plant Physiol.*, 101, 37–47, <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.37>, 1993.
- Helman, Y., Barkan, E., Eisenstadt, D., Luz, B., and Kaplan, A.: Fractionation of the Three Stable Oxygen Isotopes by Oxygen-Producing and Oxygen-Consuming Reactions in Photosynthetic Organisms, *Plant Physiol.*, 138, 2292–2298, <https://doi.org/10.1104/pp.105.063768>, 2005.
- 430 Keeling, R. F. and Manning, A. C.: Studies of Recent Changes in Atmospheric O<sub>2</sub> Content, in: *Treatise on Geochemistry*, Elsevier, 385–404, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00420-4>, 2014.
- Keeling, R. F. and Shertz, S. R.: Seasonal and interannual variations in atmospheric oxygen and implications for the global carbon cycle, *Nature*, 358, 723–727, <https://doi.org/10.1038/358723a0>, 1992.
- 435 Kerstel, E. and Gianfrani, L.: Advances in laser-based isotope ratio measurements: selected applications, *Appl. Phys. B*, 92, 439–449, <https://doi.org/10.1007/s00340-008-3128-x>, 2008.
- Landais, A., Dreyfus, G., Capron, E., Masson-Delmotte, V., Sanchez-Goñi, M. F., Desprat, S., Hoffmann, G., Jouzel, J., Leuenberger, M., and Johnsen, S.: What drives the millennial and orbital variations of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{atm}}$ ?, *Quat. Sci. Rev.*, 29, 235–246, <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.07.005>, 2010.
- 440 Landsberg, J., Romanini, D., and Kerstel, E.: Very high finesse optical-feedback cavity-enhanced absorption spectrometer for low concentration water vapor isotope analyses, *Opt Lett*, 39, 1795–1798, <https://doi.org/10.1364/OL.39.001795>, 2014.
- 445 Leroy-Dos Santos, C., Casado, M., Prié, F., Jossoud, O., Kerstel, E., Farradèche, M., Kassi, S., Fourré, E., and Landais, A.: A dedicated robust instrument for water vapor generation at low humidity for use with a laser water isotope analyzer in cold and dry polar regions, *Atmospheric Meas. Tech.*, 14, 2907–2918, <https://doi.org/10.5194/amt-14-2907-2021>, 2021.
- Luz, B. and Barkan, E.: Assessment of Oceanic Productivity with the Triple-Isotope Composition of Dissolved Oxygen, *Science*, 288, 2028–2031, <https://doi.org/10.1126/science.288.5473.2028>, 2000.
- 450 Luz, B. and Barkan, E.: The isotopic composition of atmospheric oxygen, *Glob. Biogeochem. Cycles*, 25, 1–14, <https://doi.org/10.1029/2010GB003883>, 2011.
- Luz, B., Barkan, E., Bender, M. L., Thiemens, M. H., and Boering, K. A.: Triple-isotope composition of atmospheric oxygen as a tracer of biosphere productivity, *Nature*, 400, 547–550, <https://doi.org/10.1038/22987>, 1999.
- 455 Morville, J., Kassi, S., Chenevier, M., and Romanini, D.: Fast, low-noise, mode-by-mode, cavity-enhanced absorption spectroscopy by diode-laser self-locking, *Appl. Phys. B*, 80, 1027–1038, <https://doi.org/10.1007/s00340-005-1828-z>, 2005.

- 460 Morville, J., Romanini, D., and Kerstel, E.: Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy with Optical Feedback, in: *Cavity-Enhanced Spectroscopy and Sensing*, vol. 179, edited by: Gagliardi, G. and Loock, H.-P., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 163–209, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-40003-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-40003-2_5), 2014.
- Severinghaus, J. P., Beaudette, R., Headly, M. A., Taylor, K., and Brook, E. J.: Oxygen-18 of O<sub>2</sub> Records the Impact of Abrupt Climate Change on the Terrestrial Biosphere, *Science*, 324, 1431–1434, <https://doi.org/10.1126/science.1169473>, 2009.
- 465 Stephens, B. B., Keeling, R. F., Heimann, M., Six, K. D., Murnane, R., and Caldeira, K.: Testing global ocean carbon cycle models using measurements of atmospheric O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration, *Glob. Biogeochem. Cycles*, 12, 213–230, <https://doi.org/10.1029/97GB03500>, 1998.
- Stolper, D. A., Bender, M. L., Dreyfus, G. B., Yan, Y., and Higgins, J. A.: A Pleistocene ice core record of atmospheric O<sub>2</sub> concentrations, *Science*, 353, 1427–1430, <https://doi.org/10.1126/science.aaf5445>, 2016.
- 470 Stolper, D. A., Fischer, W. W., and Bender, M. L.: Effects of temperature and carbon source on the isotopic fractionations associated with O<sub>2</sub> respiration for 17O/16O and 18O/16O ratios in *E. coli*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 240, 152–172, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.07.039>, 2018.
- Tohjima, Y.: Method for measuring changes in the atmospheric O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> ratio by a gas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector, *J. Geophys. Res. Atmospheres*, 105, 14575–14584, <https://doi.org/10.1029/2000JD900057>, 2000.
- 475 Yang, J.-W., Brandon, M., Landais, A., Duchamp-Alphonse, S., Blunier, T., Prié, F., and Extier, T.: Global biosphere primary productivity changes during the past eight glacial cycles, *Science*, 375, 1145–1151, <https://doi.org/10.1126/science.abj8826>, 2022.
- 480





