

Mémoire commandé

VARIATIONS DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DANS LE METABOLISME ANIMAL

M. LACROIX, Florentina MOSORA

Institut de physique,

Université de Liège, Sart Tilman,

Liège, Belgique

Abstract-Résumé

VARIATIONS IN THE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ISOTOPIC RATIO IN THE ANIMAL METABOLISM.

Following the work undertaken by Duchesne et al., a synthesis of the results obtained since 1968 is presented. Differences up to 10‰ are observed in the isotopic ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of the CO_2 exhaled by various animals as a function of their diet and especially of the presence in their diet of vegetables characterized by a C4 photosynthetic pathway (such as maize). Weak but significant variations of the CO_2 isotopic ratio are also observed during starvation, after injection of hormones which regulate the glycaemia or even simply in relation to the metabolic rhythms of normal digestion; these variations seem to be correlated with the modifications arising in the relative proportion of substrates from which carbon dioxide is formed. Small isotopic fractionations, appearing mainly in bones and fats, were also shown by combustion of various tissues. Moreover, a change in diet (use of corn) affects clearly, not only the exhaled CO_2 , but also, within a few days, the mean ^{13}C content of organs, mainly in the case of the liver. These metabolic fractionations remain, however, limited enough to use the ^{13}C content, naturally a little higher, of C4 photosynthetic vegetables as a tracer in order to follow some metabolic processes. An application of this is presented by way of a glucose tolerance test.

VARIATIONS DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DANS LE METABOLISME ANIMAL.

A la suite des travaux entrepris par Duchesne et coll., une synthèse des résultats obtenus depuis 1968 est présentée. Des différences atteignant 10‰ sont observées dans le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 exhalé par divers animaux en fonction de leur régime alimentaire et spécialement de la présence dans celui-ci de végétaux à photosynthèse en C4 (par exemple le maïs). Des variations faibles, mais significatives, du rapport isotopique du CO_2 sont également mises en évidence au cours de jeûnes, sous l'effet d'injections d'hormones régulatrices de la glycémie ou même simplement en fonction des rythmes métaboliques de la digestion normale; ces variations paraissent liées aux modifications qui se produisent dans la proportion relative des substrats dont est issu le gaz carbonique. De petits fractionnements isotopiques, se manifestant surtout dans les os et les graisses, ont également été mesurés lors de la combustion de différents tissus. Enfin un changement d'alimentation (utilisation du maïs) affecte nettement, non seulement le CO_2 exhalé, mais aussi, en quelques jours, la teneur moyenne des organes en ^{13}C et principalement dans le cas du foie. Ces divers fractionnements restent toutefois suffisamment limités pour qu'on puisse utiliser, en tant que traceur permettant de suivre certains processus métaboliques, la teneur en ^{13}C , naturellement un peu plus élevée, des plantes à photosynthèse en C4. Une application en est présentée dans le cadre du test de tolérance au glucose.

INTRODUCTION

Dès 1968, Duchesne et coll. ont entrepris l'étude systématique des variations naturelles du rapport des isotopes ^{13}C et ^{12}C chez l'homme et l'animal supérieur. Ces travaux firent l'objet de nombreuses publications [1-10] et mirent en évidence divers effets isotopiques liés au métabolisme, en particulier sous l'action du jeûne [2-4,10] ou de différentes hormones [5]. Ils révélèrent aussi la possibilité d'utiliser l'enrichissement naturel de certaines substances en tant que traceur métabolique dans des problèmes de pathologie humaine [8,9].

L'intérêt présenté par les divers résultats obtenus nous a paru justifier l'opportunité de publier, à présent, une synthèse de ces recherches. Nous allons donc discuter l'ensemble des principaux travaux antérieurs en y ajoutant un certain nombre de données et de figures complémentaires et inédites.

Auparavant, il nous paraît cependant utile de rappeler quelques résultats obtenus au cours des cinq dernières années en ce qui concerne les variations isotopiques dans le domaine végétal.

On sait depuis longtemps [11] que les plantes réalisent un fractionnement d'environ 2% qui les enrichit en ^{12}C par rapport au CO_2 atmosphérique. Ce résultat est la conséquence de deux processus qui interviennent concurremment pendant la photosynthèse: il s'agit d'abord de la diffusion qui incorpore le CO_2 au milieu cytoplasmique et ensuite de la réaction de carboxylation du ribulose diphosphate [12]. Cette réaction, qui est à l'origine du cycle de Calvin, ne peut cependant donner lieu à un effet isotopique que si le CO_2 y a accès librement, en d'autres termes s'il n'y a pas antérieurement une réaction déterminante de vitesse qui conditionne la cinétique de la chaîne réactionnelle. Or on a découvert récemment [13-15] que, si cette condition est effectivement remplie pour la majorité des plantes, il existe certaines espèces qui fixent préalablement le CO_2 sur des acides organiques à quatre carbones (d'où le nom de plantes à photosynthèse en C4) en vue de le transporter plus efficacement vers les cellules où s'effectue le cycle de Calvin. Le CO_2 n'étant plus, dès lors, librement disponible au niveau du ribulose diphosphate, ne peut plus y être l'objet d'une sélection préférentielle du ^{12}C . On constate effectivement que ces plantes, parmi lesquelles on trouve notamment le maïs et la canne à sucre, ont un enrichissement en ^{12}C dû uniquement à la diffusion et réduit par conséquent à moins de la moitié de ce qu'il est chez la plupart des végétaux.

Ces fractionnements isotopiques, par leur situation au début de la photosynthèse, auront pour conséquence que le carbone organique aura une proportion de ^{12}C plus élevée que celle du carbone des minéraux ou du CO_2 atmosphérique. A cet enrichissement fondamental, qu'on retrouvera tout le long de la chaîne vivante puisque les animaux se nourrissent directement ou indirectement à partir des plantes, se superposeront, en outre, de petits fractionnements dus au métabolisme proprement dit [2-7, 16-20].

C'est une étude de ces effets sur les animaux supérieurs que nous rapportons ici.

1. METHODES EXPERIMENTALES

Les déterminations du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sont faites sur des échantillons de gaz carbonique obtenus, soit par extraction à partir de l'air expiré, soit par combustion des substances carbonées, nourriture ou prélèvement de tissu, qu'on veut étudier.

1.1. Prélèvement du CO_2 respiratoire

La quantité de CO_2 pur nécessaire à une mesure isotopique est d'environ une millimole, ce qui correspond à une durée de respiration de quelques minutes pour de petits animaux comme les rats ou les souris. Ceux-ci sont enfermés dans des enceintes étanches de deux litres soumises à une

circulation forcée (0,5 litre/min) d'un mélange azote-oxygène dans la proportion de l'air (79:21) de manière à éliminer les contaminations par le CO₂ atmosphérique. Pour les animaux plus grands, tels que les chiens ou les coqs, et pour les hommes, l'air expiré est recueilli dans un ballon en caoutchouc d'un litre, soit par l'intermédiaire d'une trachéotomie sous narcose au nembutal pour les premiers, soit par insufflation directe pour les seconds. Il est à noter que la plupart des gaz anesthésiants usuels, le chloroforme excepté, interfèrent avec le CO₂ au cours de la mesure isotopique et sont dès lors susceptibles de donner lieu à des erreurs parfois fort importantes; en outre, la diffusion à travers le caoutchouc oblige à extraire le CO₂ hors des ballons dans les deux heures qui suivent le prélèvement. Dans tous les cas, le gaz carbonique est séparé de l'air par piégeage à l'azote liquide; après pompage, le CO₂ piégé est recueilli par évaporation tandis que la vapeur d'eau est retenue par un bain de méthanol réfrigéré à la carboglace (environ -70°C).

1.2. Combustions

La technique utilisée est proche de celle décrite par Craig [11]. Environ 100 mg de l'échantillon carboné à étudier sont placés dans une nacelle de quartz. Celle-ci est ensuite glissée dans la partie en quartz d'un circuit où, après avoir fait le vide, on introduit une demi-atmosphère d'oxygène exempt de CO₂. Une pompe Toeppler automatique assure la circulation du gaz qui passe sur un catalyseur (oxyde de cuivre) porté à 400°C par un premier four, à travers la nacelle contenant l'échantillon chauffée à environ 900°C par un second four, et ensuite dans un piège horizontal placé à la surface d'un bain d'azote liquide où se condense le CO₂ formé tandis que l'oxygène est renvoyé vers les fours par la pompe. La combustion proprement dite a lieu après un échauffement progressif destiné à décomposer l'échantillon; l'ensemble de l'opération dure environ une heure. L'oxygène en excès est évacué par pompage; on recueille alors, par évaporation, le CO₂ tandis qu'un bain de méthanol-carboglace maintient la vapeur d'eau dans le piège.

1.3. Mesure du rapport isotopique

Les échantillons de CO₂ pur sont introduits dans un spectromètre de masse à double collecteur et à entrée à flux visqueux, de marque Varian Mat et de type CH5, qui compare le rapport des pics de masse 45/44 de l'échantillon à celui d'une référence simultanément présente et constituée par un CO₂ commercial (Air Liquide N45) d'origine pétrolière. Cette référence est étalonnée périodiquement par comparaison à deux standards internationaux [21]: le NBS 20, qui est un carbonate calcaire, et le NBS 21, qui est un graphite, tous deux fournis par le National Bureau of Standards de Washington. Cet étalonnage permet d'exprimer les résultats relativement à leur teneur en ¹³C du standard; nous avons choisi, pour base de nos mesures, le NBS 21, plus commode pour les problèmes biologiques que le PDB, choisi par les géologues, qui, outre qu'il n'est plus actuellement disponible, nous aurait obligés à exprimer nos résultats sous une forme négative et moins précise, étant donné la teneur en ¹³C assez différente de ce standard.

Les résultats s'expriment dès lors suivant la formule:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{\text{Rapport } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ de l'échantillon}}{\text{Rapport } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ du standard NBS 21}} - 1 \right] \cdot 10^3$$

Si l'on veut transposer ces résultats dans l'échelle PDB, il suffit, en bonne approximation, d'en retrancher une quantité égale à 27,8 qui correspond à la différence entre les deux standards [21]. Il est intéressant de noter que la teneur en ^{13}C du NBS 21 est de 1,0807% et qu'une unité (1‰) de $\delta^{13}\text{C}$ correspond par conséquent à une variation d'environ 0,001% en ^{13}C ou de $1 \cdot 10^{-5}$ dans l'expression du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

La précision de la détermination de $\delta^{13}\text{C}$ est d'environ 0,2‰ (écart quadratique moyen variant entre 0,03 et 0,12). Pour les combustions, plusieurs mesures effectuées sur des prélèvements différents d'un même échantillon ont donné une reproductibilité qui permet d'estimer à moins de 0,5‰ l'erreur totale sur le $\delta^{13}\text{C}$ obtenu.

2. RESULTATS

2.1. Variations du CO_2 respiratoire

2.1.1. Effet global au niveau du CO_2 , importance de la nourriture

Les premières observations effectuées par Duchesne sur le CO_2 respiratoire d'animaux [1,3] avaient fourni des $\delta^{13}\text{C}$ allant de 10,2 pour des oiseaux à 0,0 pour des batraciens. L'examen de ces résultats faisait ressortir une dispersion de 2‰ entre des individus d'une même espèce et une différence de quelque 5‰ entre les mammifères et les oiseaux. Un travail ultérieur [4] montra cependant que la différence entre les espèces n'était pas liée à un fractionnement spécifique dû au métabolisme, mais plus simplement à une variation de la composition isotopique de l'alimentation fournie et plus particulièrement à la présence de maïs dans la farine spéciale que mangeaient les oiseaux étudiés. Ces résultats permirent de constater que le CO_2 exhalé a sensiblement le même $\delta^{13}\text{C}$ que celui de la nourriture habituellement consommée par les différents animaux [2,4] et que les fractionnements isotopiques propres à leur métabolisme se limitent, au niveau du CO_2 , à des fluctuations d'environ 2‰. Pour l'homme, une cinquantaine de mesures, réalisées au hasard sans surveillance du régime alimentaire, ont donné un $\delta^{13}\text{C}$ moyen de $3,2 \pm 1,2$. Il est à noter toutefois que les habitudes nutritives de notre pays sont telles que des substances riches en ^{13}C , comme le maïs et le sucre de canne, y sont peu utilisées.

2.1.2. Effets d'un changement de la composition isotopique de la nourriture

En vue de préciser davantage la liaison entre les $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 respiratoire et de la nourriture, l'effet d'un changement de celle-ci a été étudié. Pour cela, on a donné à des rats Wistar femelles d'environ 250 g une alimentation ayant un rapport isotopique différent de celui de la nourriture qu'ils

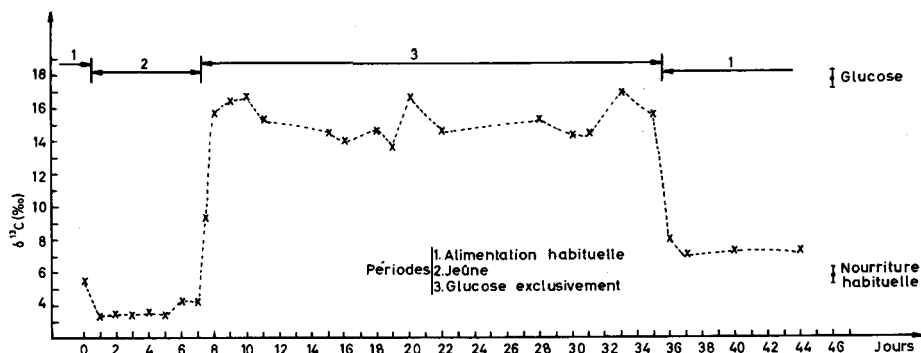


FIG. 1. Rapport isotopique du CO₂ respiratoire d'un rat nourri au glucose de maïs après une période préalable de jeûne.

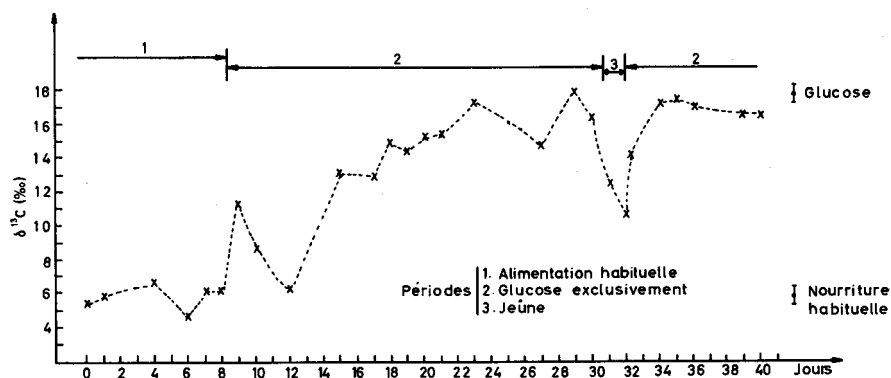


FIG. 2. Rapport isotopique du CO₂ respiratoire d'un rat nourri au glucose de maïs sans période préalable de jeûne.

recevaient habituellement auparavant et qui était constituée d'un agglomérat de diverses farines formant un aliment standardisé pour rats de laboratoires ($\delta^{13}\text{C}$ de ce mélange: $5,8 \pm 0,5$). Comme nouvelle nourriture, fournie après un jeûne préalable de cinq jours destiné à épuiser les réserves endogènes, on a tout d'abord utilisé des graines de maïs ($\delta^{13}\text{C}$: 15,0). Les $\delta^{13}\text{C}$ obtenus deux jours plus tard étaient de 13,2, 14,7 et 15,3, tandis que pour des rats témoins renourris, après le même jeûne, avec leur aliment standardisé habituel, on obtenait dans les mêmes conditions 5,1, 5,6, 5,9 et 6,5.

Dans une étude plus détaillée, on a également nourri des rats exclusivement avec du glucose pur (99,5% de dextrose) préparé à partir d'amidon de maïs ($\delta^{13}\text{C}$: 17,7) [4]. Les figures 1 et 2 décrivent les résultats obtenus pour deux rats qui se nourrissaient librement en glucose (environ 12 g par jour) et pour lesquels on a mesuré quotidiennement le $\delta^{13}\text{C}$ du CO₂ exhalé durant un quart d'heure de respiration. Dans la figure 1, on suit l'évolution

du $\delta^{13}\text{C}$ pour un rat d'abord soumis à un jeûne de sept jours, ensuite à une alimentation exclusive au glucose durant vingt-neuf jours et enfin remis à son alimentation standardisée antérieure. On constate que le $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 correspond bien, si l'on néglige de petites fluctuations de 2‰, à celui de la nourriture et que la transition d'un niveau isotopique à l'autre est très rapide (un à deux jours), mais il convient de noter, dans ce cas, l'absence de réserves endogènes que le jeûne a éliminées et que le régime déséquilibré de glucose pur n'a pas permis de reconstituer. Si, au contraire, l'animal est nourri exclusivement avec le glucose sans période de jeûne préalable, on observe (fig.2) une période transitoire d'une dizaine de jours durant laquelle le $\delta^{13}\text{C}$ s'élève progressivement et qui correspond au mélange des contributions du glucose exogène et des substrats endogènes de réserve dans la formation du CO_2 .

2.1.3. Effet du jeûne

Un examen attentif du début de la courbe de la figure 1 montre, en outre, que le $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 de ce rat s'est abaissé de 1 à 2‰ durant la semaine de jeûne. Cet effet apparaît plus clairement dans la figure 3 où l'on constate cependant qu'à partir du cinquième jour le $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 remonte pour dépasser les valeurs obtenues en période d'alimentation normale. Comme cette remontée a été suivie, après deux jours, par la mort de l'animal, on en conclut que le CO_2 ne provenait plus, dans cette phase ultime, des réserves épuisées de l'animal, mais d'un autre substrat, en l'occurrence les protéines constitutionnelles qui seraient plus riches en ^{13}C [17]. Par contre, durant les premiers jours du jeûne, le CO_2 est issu essentiellement des graisses de réserve qui sont connues pour être enrichies en ^{12}C [4,16,18-20]. Cette légère diminution de 1 à 2‰ du $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 exhalé au cours du jeûne a été observée à plusieurs reprises chez le rat et la souris [2-4,10].

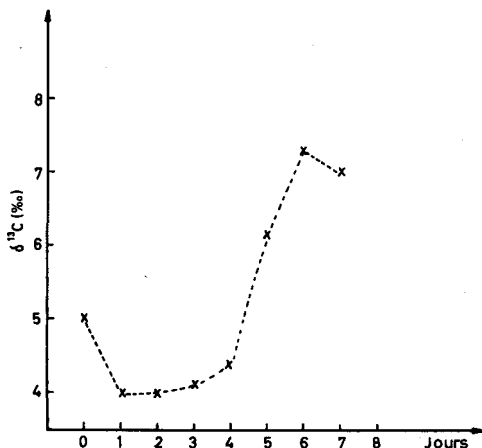


FIG. 3. Rapport isotopique du CO_2 respiratoire d'un rat au cours d'une période de jeûne prolongée jusqu'à la mort de l'animal.

Une observation récente [10] a cependant montré que si les rats étaient vieux (plus de trois ans), le jeûne ne produisait pas de diminution du $\delta^{13}\text{C}$, mais que celui-ci restait stabilisé, durant environ cinq jours, à la valeur, d'ailleurs un peu plus élevée que celle observée chez de jeunes rats recevant la même nourriture, qu'il avait en période d'alimentation normale; la croissance du $\delta^{13}\text{C}$ s'observe néanmoins durant les derniers jours du jeûne. Ce résultat paraît indiquer que les sujets âgés sont devenus incapables de mobiliser leurs réserves lipidiques et qu'ils font davantage appel à leurs protéines, ce qui correspondrait au bilan azoté négatif caractéristique de certains états (diabète, dénutrition, etc.) fréquents chez les sujets âgés.

On a tenté d'étendre ces observations à l'homme (jeunes enfants, adultes, vieillards), mais on n'a pas obtenu de différences significatives. Ceci est vraisemblablement dû à ce que, si un jeûne de cinq à six jours suffit à épuiser les réserves d'un rat (fig.1 et 3), il faut beaucoup plus longtemps pour affecter celles de l'homme, en sorte que les jeûnes, limités à 24 heures, effectués par celui-ci étaient insuffisants pour perturber le $\delta^{13}\text{C}$. Par contre, chez une jeune obèse qui était soumise à une cure prolongée de jeûne absolu, on a retrouvé la diminution du $\delta^{13}\text{C}$ de 2‰ au cours de la deuxième semaine de privation; le $\delta^{13}\text{C}$ est revenu à sa valeur habituelle dès qu'elle a repris un peu de nourriture.

2.1.4. Fluctuations du $\delta^{13}\text{C}$, effets des hormones

Les différences isotopiques qui existent entre les différents substrats glucidiques, lipides ou protides, dont est issu le CO_2 , laissent à penser que les fluctuations de 1 à 2‰, observées entre les individus ou chez un même individu au cours du temps, sont liées aux changements de proportion qui se produisent, pour ces substrats, au cours des cycles métaboliques ultradiens. On ne doit pas seulement tenir compte du $\delta^{13}\text{C}$ global de la nourriture, mais aussi de sa composition biochimique qui conditionnera les phénomènes de digestion et de mise en réserve des aliments. Etant donné les faibles différences isotopiques qui existent entre les divers métabolites, on ne peut guère toutefois s'attendre à des effets importants, mais suffisants néanmoins pour expliquer les fluctuations observées.

L'effet principal résultera du jeûne postprandial. Une mesure effectuée quelques heures après le repas concernera un CO_2 où la contribution lipidique sera devenue prépondérante et aura donc un $\delta^{13}\text{C}$ abaissé par rapport à une mesure plus immédiate pour laquelle le glucose constitue le substrat dominant. Une démonstration de ces influences a été fournie par l'observation, une heure après leur repas, du $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 exhalé par des rats nourris à heure fixe [5]. L'égalité (à 0,3‰) des $\delta^{13}\text{C}$ mesurés dans ces conditions traduit l'élimination des fluctuations par le fait qu'on observe le CO_2 en un même moment du cycle digestif.

Comme ce cycle est régularisé par les hormones de la glycémie, on peut s'attendre à ce que des injections importantes de celles-ci se traduisent par des variations isotopiques au niveau du CO_2 correspondant aux modifications qu'elles induisent dans la répartition des substrats du métabolisme intermédiaire. On a effectivement pu vérifier cette hypothèse et observer [5] une petite augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ après injection de désoxycorticostérone ou d'insuline, qui accroissent la contribution des acides aminés et des glucides plus riches en ^{13}C , et, inversement, une diminution après injection de glucagon, qui favorise l'utilisation des graisses enrichies en ^{12}C . Cet

effet reste cependant très limité, de l'ordre de 1‰, à cause des faibles différences entre les métabolites et de la forte régulation du système endocrinien qui tend à conserver l'homéostasie en libérant des antagonistes de l'hormone injectée. On a pu, toutefois, observer des effets atteignant 3‰ chez des rats dont la régulation avait été neutralisée par l'ablation préalable de la glande concernée [5].

2.1.5. Effets liés aux variations du pH sanguin

Le CO_2 , principal produit du catabolisme énergétique, n'est pas seulement un résidu à éliminer de l'organisme; par l'intermédiaire des formes carbonates et carbamines avec lesquelles il est en équilibre il joue aussi un rôle important de tampon pour le maintien du pH du milieu intérieur. Les acidoses ou alcaloses, qu'elles soient d'origine métabolique ou respiratoire, influenceront par conséquent la cinétique de sortie du CO_2 et pourront, de ce fait, avoir une répercussion sur sa composition isotopique [2].

Pour vérifier cette contribution, on a provoqué, chez des rats, une acidose métabolique par injection de 0,1 g de chlorure d'ammonium, une alcalose métabolique par injection de 0,3 g de citrate de soude, une hypercapnie (acidose respiratoire) en les maintenant deux heures dans une enceinte étanche de deux litres, et une hyperoxie en les laissant une demi-heure en présence d'un air renforcé par trois atmosphères d'oxygène. Dans tous ces cas, on a observé une légère augmentation, inférieure à 1‰, du $\delta^{13}\text{C}$. Dans le cas des deux injections, le retour à la valeur initiale s'est effectué après une heure.

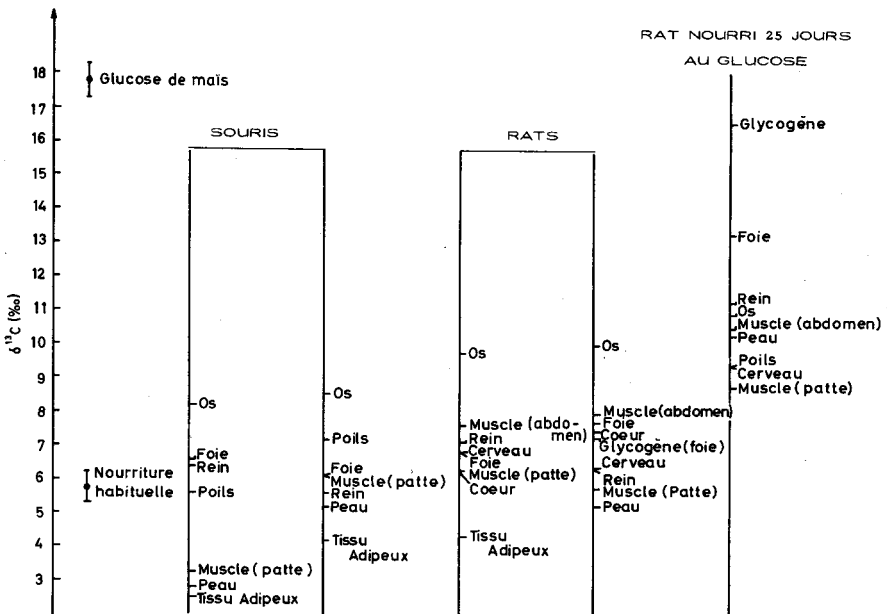


FIG. 4. Variations du rapport isotopique du carbone total dans différents organes de rats et de souris.

2.2. Distribution des isotopes dans l'organisme

Comme on l'a vu, notamment à propos du jeûne, la distribution isotopique du carbone n'est pas uniforme et certaines voies métaboliques accumulent préférentiellement le ^{13}C ou le ^{12}C . Pour étudier ces variations, on a mesuré, après combustion, le $\delta^{13}\text{C}$ de fragments de tissus ou de substances provenant de rats [4,7] ou de souris. La figure 4 montre les $\delta^{13}\text{C}$ obtenus. On peut y voir que si les graisses abdominales sont enrichies légèrement en ^{12}C , un effet inverse se manifeste au niveau des poils et surtout des os. Pour ceux-ci, l'élimination de la partie minérale par complexation avec l'éthylène diamine a montré que l'enrichissement subsistait dans la partie organique (collagène ...). Ce résultat est à rapprocher des observations de Vogel et coll. [22] qui constatèrent, en relation avec des mesures de datage au radio-carbone, un enrichissement d'environ 6‰ en ^{13}C dans le collagène d'os humains.

La dernière colonne de la figure 4 montre, en outre, que les tissus d'un rat qui a reçu pendant vingt-cinq jours une alimentation au glucose de maïs sont plus riches en ^{13}C que les tissus correspondants des rats nourris normalement [4]. Cette variation dépend naturellement de l'activité métabolique du tissu concerné que cette étude permet donc de suivre. On constate ainsi que le $\delta^{13}\text{C}$ de l'os reste pratiquement inchangé alors qu'au contraire celui du foie est augmenté de quelque 6‰. On remarque, en outre, que le glycogène, extrait du foie par dissolution dans l'acide trichloroacétique, a un $\delta^{13}\text{C}$ très proche de celui du glucose fourni, tandis que celui provenant des rats nourris normalement a un rapport isotopique légèrement plus élevé que le $\delta^{13}\text{C}$ moyen de la nourriture standardisée.

De manière analogue, on compare, dans le tableau I, des rats qui, après un jeûne de cinq jours, ont été renourris, durant dix jours, le premier groupe avec du maïs, le second avec leur nourriture habituelle. Les graisses et le glycogène ont été extraits du foie par dissolution dans du chloroforme méthanol, pour les premières, et dans l'acide trichloroacétique, pour le second. Une étude simultanée de Jacobson et coll. [20] a montré une différence semblable (4,6‰) entre les graisses et le glycogène extraits également de foies de rats; le fait que les valeurs obtenues soient environ 3‰ plus élevées que les nôtres (compte tenu de la conversion au NBS 21) provient sans aucun doute de différences dans l'alimentation des rats des

TABLEAU I. EFFETS D'UN CHANGEMENT DE NOURRITURE SUR LE $\delta^{13}\text{C}$ (‰)

	Nourriture	Foie entier	Graisse	Glycogène	CO ₂ exhalé
Rats nourris					
— au maïs	15,0	14,0	12,6	13,6	13,2 à 15,3
— normalement	5,8	5,3	2,1	6,4	5,1 à 6,5

Avant le prélèvement de leur foie, les rats ont, après un jeûne préalable de cinq jours, reçu, durant dix jours, une alimentation, soit normale (mélange standardisé), soit composée exclusivement de maïs.

deux élevages. Par ailleurs, le fait que la différence soit réduite à 1‰ (tableau I) pour les rats nourris au maïs est à interpréter vraisemblablement par la persistance de l'influence, dans leur graisse, de la nourriture antérieure. Comme dans le cas du rat nourri au glucose, on remarque, chez ces rats nourris au maïs, la rapide et forte influence du $\delta^{13}\text{C}$ de la nourriture sur la composition isotopique du foie (fig. 4 et tableau I) en bonne correspondance avec le taux de renouvellement rapide bien connu des substances de cet organe.

Au moyen d'une séparation, par centrifugation en gradient de sucrose, de différents constituants de cellules hépatiques, on a également montré [7] un enrichissement en ^{12}C , d'environ 2‰, de la fraction nucléaire par rapport au cytoplasme et aux mitochondries.

Enfin, on a observé, dans les sarcomes induits par injection de méthylcholanthrène chez des rats, un enrichissement en ^{13}C de 1‰ de la tumeur par rapport au tissu musculaire sous-jacent [6].

2.3. Utilisation des sucres de maïs en tant que traceurs métaboliques

Les variations, nettement mesurables, qui se manifestent dans le CO_2 lorsqu'on nourrit l'animal avec du maïs ou ses dérivés (fig.1 et 2, tableau I) d'une part, ainsi que la petitesse des perturbations (2‰) que produisent

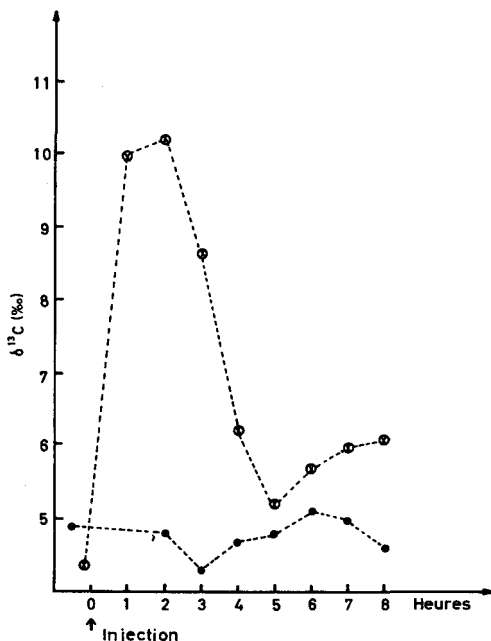


FIG. 5. Variation du rapport isotopique du CO_2 respiratoire d'un rat au cours d'une épreuve de tolérance au glucose; comparaison entre un glucose de maïs (● --- ● ---, $\delta^{13}\text{C}$: 17, 7) naturellement enrichi en ^{13}C et un glucose ayant à peu près le même rapport isotopique (● --- ● ---, $\delta^{13}\text{C}$: 7, 1) que l'alimentation habituelle de l'animal.

les processus du métabolisme animal, d'autre part, nous ont incités à utiliser l'enrichissement naturel du maïs pour suivre, au niveau du CO_2 , la cinétique des processus métaboliques.

En utilisant, en tant que traceur, le ^{13}C naturel du glucose extrait du maïs, on obtient, en mesurant le rapport isotopique des prélèvements d'air expiré effectués durant les huit heures qui suivent la prise du sucre, des courbes remarquables qui permettent de déterminer, en fonction du temps, la combustion métabolique de ce produit [8,9].

En bon accord avec les résultats obtenus à l'aide du ^{14}C , ces courbes montrent que:

- le glucose ingéré commence très rapidement à être utilisé et transformé en CO_2 (modification du $\delta^{13}\text{C}$ dès la première demi-heure);
- le glucose enrichi contribue au maximum à la moitié du CO_2 exhalé, maximum atteint environ trois heures après la prise du sucre;
- l'utilisation préférentielle de ce glucose est terminée après une période d'environ huit heures; on peut estimer à près de la moitié de la dose fournie le glucose brûlé durant cette période.

Une comparaison a été effectuée en remplaçant le glucose extrait du maïs par du glucose dont le $\delta^{13}\text{C}$ (7,1‰) est proche de celui de l'alimentation standardisée habituelle et qui est obtenu en mélangeant (1:3) du glucose de maïs ($\delta^{13}\text{C}$: 17,7) et du glucose de pomme de terre ($\delta^{13}\text{C}$: 3,0). La figure 5 permet de constater que les effets de fractionnement isotopique propres à l'individu restent voisins de 1‰ dans le cas du glucose non enrichi par

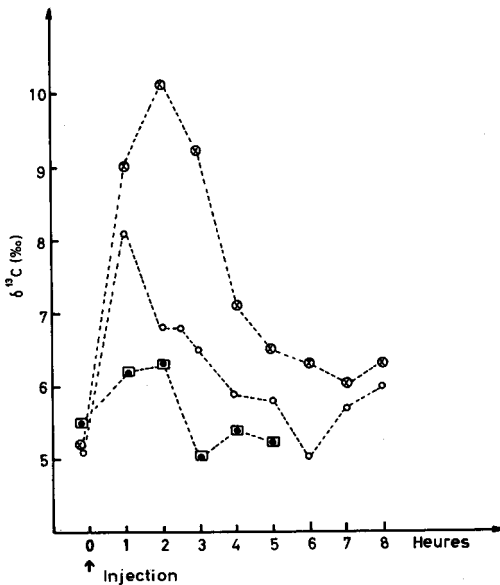


FIG. 6. Variation du rapport isotopique du CO_2 respiratoire d'un rat au cours d'une épreuve de tolérance au glucose; comparaison pour trois doses différentes de glucose de maïs: □ --- □ --- □: 0,5 g; ○ --- ○ --- ○: 1 g; ⊗ --- ⊗ --- ⊗: 1,5 g.

rapport à la nourriture habituelle, tandis que le glucose de maïs produit une variation nettement plus importante (6‰), qui permet d'utiliser, en tant que traceur, son enrichissement naturel. Cette expérience, représentée ici pour des rats (injection intrapéritonéale de 1,5 g de glucose dans 2 cm³ d'eau), a également été réalisée [8,9] sur l'homme (prise orale de 100 g de glucose dans 0,4 litre d'eau).

En vue de pouvoir apprécier l'utilisation quantitative de ce marqueur, on a également comparé, chez le rat, les variations du $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 obtenues pour trois doses différentes (0,5, 1,0 et 1,5 g) de glucose de maïs. La figure 6 montre, compte tenu de la précision des mesures et des incidences métaboliques d'un changement de dose, l'excellente proportionnalité de l'effet mesuré. Il est à remarquer qu'au niveau de la glycémie (taux de glucose dans le sang), un tel changement de dose conduit à une variation nettement moins marquée [23], ce qui met bien en évidence l'apport nouveau de cette méthode de mesure.

Cette technique de marquage isotopique naturel a déjà été utilisée pour comparer, chez l'homme, le métabolisme glucidique dans quelques cas pathologiques: obésité, diabète chimique, diabète insulino-dépendant. Des variations ont pu être observées [9] par rapport aux sujets normaux, particulièrement dans le cas du diabète insulino-dépendant où l'augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ est réduite, à peu près de moitié, au maximum de la courbe.

Dans une dernière étude, basée sur la même méthode, on a utilisé, chez le rat, du fructose de maïs et obtenu une courbe très semblable à celle obtenue avec une dose égale de glucose.

CONCLUSIONS

L'ensemble de cette étude permet de constater que le rapport des isotopes du carbone chez l'animal est essentiellement conditionné par la teneur isotopique de son régime alimentaire et plus particulièrement par la présence ou l'absence, dans celui-ci, de plantes à photosynthèse en C4 comme le maïs ou la canne à sucre. Une modification importante de ce régime se marque rapidement au niveau du CO_2 respiratoire et également dans la composition isotopique des organes et particulièrement dans celle du foie.

En outre, de petits fractionnements propres au métabolisme animal se manifestent et conduisent à des faibles enrichissements, notamment en ^{12}C dans les graisses et les noyaux cellulaires et en ^{13}C dans les os et les poils. Ces différences isotopiques se révèlent également par de petites modifications du CO_2 exhalé en fonction des substrats métabolisés, particulièrement en période de jeûne. Par ailleurs, des variations semblables peuvent aussi s'observer en cas de troubles pathologiques affectant la composition des tissus (cas du sarcome) ou les métabolismes produisant le CO_2 , par exemple en cas de déséquilibres hormonaux ou de troubles liés à la sénescence ou modifiant le pH sanguin.

Tous ces effets isotopiques restent néanmoins limités à quelques pour-mille. Si l'on tient compte de ce que leur importance est un peu plus que doublée lorsqu'on passe de ^{13}C à ^{14}C , on peut estimer qu'ils entraîneront, comme conséquence, des corrections qui sont de l'ordre de la centaine d'années [22] pour certaines mesures de datage au radiocarbone ou de l'ordre de 1 à 2% pour les études de distribution de traceurs au ^{14}C suivant la nature des métabolites recueillis.

Ces fractionnements métaboliques restent cependant suffisamment limités pour que l'enrichissement naturel des plantes à photosynthèse en C4 puisse être utilisé pour suivre la métabolisation de substances glucidiques préparées à partir d'elles, et fournir, sur ces processus, de précieuses informations qu'on ne pouvait obtenir qu'à l'aide de substances artificiellement enrichies. Mais l'usage du carbone-14 ou du carbone-11 a toujours été très limité, surtout chez l'homme, en raison des dangers de leur radioactivité; quant au carbone-13, ce n'est que très récemment [24] que sa production en quantités importantes a permis de considérer son emploi dans ce genre de problèmes. Les premiers résultats, qui viennent d'être publiés [25] et qui concernent une étude du CO₂ exhalé après ingestion de glucose enrichi à 1% en ¹³C, ont fourni des courbes tout à fait semblables à celles obtenues avec le glucose de maïs dont l'enrichissement naturel est beaucoup moins onéreux.

L'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt que présente l'étude des variations isotopiques naturelles et permet d'envisager les fructueux développements que l'on peut attendre de l'emploi des traceurs stables tels qu'ils nous sont fournis par la nature.

ADDENDUM

Dans un nouveau travail, développant une étude préliminaire [26], nous avons, à l'initiative de J. Duchesne, étudié le rapport ¹³C/¹²C du CO₂ exhalé par six rats recevant, par injection intrapéritonéale, environ 12 cm³/jour d'eau lourde et atteignant ainsi un niveau (contrôlé par résonance magnétique nucléaire) de 20% de D₂O dans leurs fluides (urine, sang). Un effet remarquable a ainsi été mis en évidence: le $\delta^{13}\text{C}$ du CO₂ s'élève, d'une manière très régulière, de 7 à 15‰ au cours de la semaine d'observation.

REFERENCES

- [1] DUCHESNE, J., VAN DE VORST, A., C.R. Acad. Sci. Paris 266 D (1968) 522.
- [2] LACROIX, M., Bull. Soc. R. Sci. Liège 40 (1971) 68 et 179.
- [3] LACROIX, M., BADEA, M., DUCHESNE, J., C.R. Acad. Sci. Paris 273 D (1971) 240.
- [4] MOSORA, F., LACROIX, M., DUCHESNE, J., C.R. Acad. Sci. Paris 273 D (1971) 1423.
- [5] MOSORA, F., LACROIX, M., PONTUS, M., DUCHESNE, J., Bull. Acad. Sci. Belgique 58 (1972) 565.
- [6] MOSORA, F., LACROIX, M., DUCHESNE, J., C.R. Acad. Sci. Paris 275 D (1972) 1701.
- [7] MOSORA, F., LACROIX, M., DUCHESNE, J., C.R. Acad. Sci. Paris 277 D (1973) 237.
- [8] LACROIX, M., MOSORA, F., PONTUS, M., LEFEBVRE, P., LUYCKX, A., LOPEZ, G., Science 181 (1973) 445.
- [9] DUCHESNE, J., MOSORA, F., LACROIX, M., LEFEBVRE, P., LUYCKX, A., LOPEZ, G., C.R. Acad. Sci. Paris 277 D (1973) 2261; LEFEBVRE, P., MOSORA, F., LACROIX, M., LUYCKX, A., LOPEZ, G., DUCHESNE, J., Diabetes 24 (1975).
- [10] MOSORA, F., DUCHESNE, J., LACROIX, M., C.R. Acad. Sci. Paris 278 D (1974) 1119.
- [11] CRAIG, H., Geochim. Cosmochim. Acta 3 (1952) 53.
- [12] PARK, R., EPSTEIN, S., Geochim. Cosmochim. Acta 21 (1960) 110.
- [13] WHELAN, T., SACKETT, W., BENEDICT, C., Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 (1970) 1205.
- [14] SMITH, B., EPSTEIN, S., Plant Physiol. 47 (1971) 380.
- [15] BJORKMAN, O., BERRY, J., Sci. Am. 229(1973) 80.
- [16] PARK, R., EPSTEIN, S., Plant Physiol. 36 (1961) 133.
- [17] ABELSON, P., HOERING, T., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 47 (1961) 623.

- [18] DEGENS, E., in *Organic Geochemistry*, chap. 12 (Eglinton, G., Murphy, M., Ed.) Springer, Berlin (1969).
- [19] JACOBSON, B., SMITH, B., EPSTEIN, S., LATIES, J., *J. Gen. Physiol.* 55 (1970) 1.
- [20] JACOBSON, B., SMITH, B., JACOBSON, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47 (1972) 398.
- [21] CRAIG, H., *Geochim. Cosmochim. Acta* 12 (1957) 133.
- [22] VOGEL, J., LERMAN, J., MARAIS, M., *Radiocarbon* 11 (1969) 351, 12 (1970) 444, 13 (1971) 378.
- [23] TOELLER, M., KNUSSMANN, R., *Diabetologia* 9 (1973) 102.
- [24] HAMMOND, A., *Science* 176 (1972) 1315.
- [25] SHREEVE, W., 1st Conf. Stable Isotopes, Argonne, mai 1973, USAEC Conf. 730525 p. 390; cité dans *Science* 181 (1973) 1125.
- [26] MOSORA, F., *Rev. Roum. Zool.* 17 (1972) 69.

DISCUSSION

N.A. MATWIYOFF: In the growth of red and green algae on $^{13}\text{CO}_2$ (90 at.% excess) we have found an apparent non-uniformity in the distribution of the label. Specifically, carbons 1, 2 and 3 appear to be less enriched than carbons 4, 5 and 6. The photosynthesis times were probably long enough for the system to have achieved a state of isotopic equilibrium. We have no explanation for these perplexing results. Do you know if anyone has looked at the δ values of the individual carbon atoms of natural glucose?

M. LACROIX: In order to be able to interpret fully our results on the total anabolism of glucose from CO_2 , we found it very useful to verify whether the natural glucose was uniformly labelled. Unfortunately nuclear magnetic resonance, which seems to be the best technique for ^{13}C , is apparently not yet capable of dealing with glucose having only natural enrichment. We assumed that the enrichment of glucose in photosynthesis was homogeneous, considering the fact that the Calvin cycle incorporated the carbons one by one and that there was therefore no reason why there should be any discrimination at that level. Your observation confirms this, moreover, since the result of this cycle is a 3-carbon substance and you say that your carbons are similar in each group of 3. The fractionation observed must occur at a later stage of metabolism when the two 3-carbon substances (phosphoglyceric acid: PGA) combine to form the 6-carbon glucose. I think it is necessary to examine the biochemistry in more detail and, in particular, the metabolism of the pentoses in which a significant isotopic effect has been observed (see Ref. [18]). The Calvin cycle utilizes a pentose (ribulose) and, moreover, the pentose cycle also produces PGA which could be isotopically different from that derived from the Calvin cycle. It is therefore necessary to verify (a) whether all the glucose produced by your algae culture or only part of it shows isotopic heterogeneity, (b) whether the use of highly enriched $^{13}\text{CO}_2$ might not perturb the normal metabolic pathways and especially the pentose pathways (deuterium appears to exert an influence here) and (c) whether the natural glucose shows the same anomaly; this is more difficult to verify and may have been hidden by the greater amount of fractionation during photosynthesis which your enriched atmosphere causes to disappear (this partially answers the previous point).

N.A. MATWIYOFF: In contrast to your studies, Mr. Shreeve who worked with ^{13}C -enriched glucose did not find a good discrimination in the rate of excretion of breath $^{13}\text{CO}_2$ between normals and diabetics. I note that the diabetic whose breath test and blood glucose level were shown on the slide was a very sick person indeed (with a peak blood glucose level of over 400 mg%).