

## Métabolisme et microgénérateur de $^{13}\text{CO}_2$

J. Guitton<sup>1</sup>, A. Francina<sup>2</sup> et M. Désage<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biochimie C, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France

<sup>2</sup> Unité de Pathologie Moléculaire, Fédération de Biochimie, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France

<sup>3</sup> CRNHL, Faculté de Médecine RTH Laënnec, 8 rue G. Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France

**CO<sub>2</sub> can be produced by a lot of metabolic reactions and is the end point of numerous metabolisms. The high performances of continuous flow isotope ratio mass spectrometry (CF-IRMS) allow measuring very low levels of <sup>13</sup>C enrichment from very small analytical samples. These CO<sub>2</sub> micro-generator technology can be used in a lot of biological protocols. This paper presents the inverse isotopic dilution method used for the determination of <sup>13</sup>C from CO<sub>2</sub> generated by cells ( polymorpho nuclear cells) or microorganisms. The determination of amino acids using the <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> generated by the reaction with ninhydrin from micro samples is also presented. These examples show that microgenerators of CO<sub>2</sub> can be used for the study of a lot of biological or chemical systems in so far as they can produce CO<sub>2</sub>.**

### Introduction

Le dioxyde de carbone est un composé formé au cours de nombreuses réactions métaboliques, de sorte que sa détermination peut permettre dans un certain nombre de cas de quantifier l'activité du système biologique ou chimique qui l'a généré. De nombreux détecteurs sont capables de mesurer le CO<sub>2</sub> (spectrométrie de masse, infrarouge, ...) [1]. Cependant ces modes de détection ne permettent qu'une mesure globale du CO<sub>2</sub> inapplicable à l'étude des voies métaboliques particulières d'un système isolé. De plus, ces techniques ne sont pas appropriées pour mesurer et suivre la production de CO<sub>2</sub> pour des quantités de l'ordre de la nano-

mole. Au contraire, l'utilisation de substrats spécifiques marqués avec un isotope du carbone conduit à la production de CO<sub>2</sub> marqué, et permet d'obtenir une spécificité et une sensibilité excellente. Les premières applications ont fait appel au <sup>14</sup>C, mais l'emploi du <sup>13</sup>C paraît particulièrement intéressant.

Le concept de microgénérateur que nous développons ici, repose sur le principe de l'incubation *in vitro* d'un substrat spécifiquement marqué par l'isotope <sup>13</sup>C du carbone, dont le métabolisme génère du gaz carbonique <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> qui vient enrichir l'atmosphère du milieu d'incubation sur laquelle est réalisée une mesure très précise de l'enrichissement isotopique. Ainsi, le substrat est utilisé comme sonde vis-à-vis d'un système biologique ou chimique, dit « système générateur », qui est impliqué dans la consommation de ce substrat et plus spécifiquement du groupe fonctionnel marqué.

Nous aborderons ici les travaux dans lesquels la micro-production de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> provient exclusivement de la transformation du substrat marqué par un processus biologique ou chimique au sein du système générateur étudié. Le cas de la transformation thermique (combustion) d'une molécule organique marquée en <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> ne rentre pas dans le cadre de cet exposé.

### Principe de la dilution isotopique inverse

La quantité de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> générée lors des réactions de métabolisation du substrat marqué est très faible, de l'ordre de quelques nanomoles. Cette micro-production de gaz ne peut être directement quantifiée avec la grande précision qu'impose l'expérimentation. On fait alors appel au principe, un peu particulier, de la dilution isotopique inverse [2].

L'analyse par dilution isotopique est à la base d'importantes applications des isotopes stables [3]. Le principe consiste à mesurer le rapport des abondances d'une molécule non marquée et de son homologue marqué, après ajout d'une quantité précisément connue de la molécule marquée. Dans le cas de la dilution isotopique inverse, comme son nom l'indique, on cherche à déterminer la quantité de molécules marquées connaissant la quantité de molécules non marquées. Le principe peut facilement se mettre en équation. Soit :

- $Q$  = quantité de  $\text{CO}_2$  (connue) }  $\text{CO}_2$  introduit dans le tube d'analyse,
- $a$  = abondance isotopique naturelle (mesurée),
- $q$  = quantité de  $^{13}\text{CO}_2$  (inconnue) }  $^{13}\text{CO}_2$  généré par la réaction,
- $a'$  = abondance isotopique (connue, égale au taux de marquage du substrat).

À l'équilibre isotopique, c'est-à-dire quand l'abondance isotopique relative ( $b$ ) est homogène partout au sein du mélange ( $Q + q$ ), on peut écrire :

$$Q \cdot a + q \cdot a' = (Q + q) \cdot b \quad (1)$$

Ainsi la mesure de  $b$  permet de déterminer la quantité  $q$  inconnue. En effet, en considérant que  $Q \gg q$ , l'équation (1) se simplifie telle que :

$$Q \cdot a + q \cdot a' \approx Q \cdot b \quad (2)$$

on en déduit que 
$$q \approx \frac{Q(b - a)}{a'} \quad (3)$$

L'utilisation d'un substrat fortement enrichi conduit à des abondances isotopiques relatives élevées. Plus le taux de marquage est élevé pour une même quantité de  $^{13}\text{CO}_2$  généré, plus le test est sensible. En pratique, on utilise des produits marqués à un taux d'enrichissement de l'ordre de 99 % ( $a'$ ).

Dans la résolution de l'équation (1) on suppose que  $Q \gg q$ , ce qui correspond effectivement à la réalité puisque  $Q$  est de l'ordre de 5 micromoles, selon les conditions d'incubation, et  $q$  varie en général de 1 à 20 nanomoles.

Ainsi, la corrélation existant entre les cinétiques de production du  $^{13}\text{CO}_2$  et les capacités fonctionnelles du système permet de récolter des informations sur l'intégrité ou sur les modifications du système étudié.

### Réalisation pratique

Le test est réalisé dans un tube en verre hermétiquement fermé à l'aide d'un bouchon en caoutchouc (type Vacutainer®) permettant l'introduction de l'aiguille d'une seringue pour réaliser le prélèvement gazeux. Le  $\text{CO}_2$  est en

équilibre entre deux phases : une phase liquide renfermant le système générateur de  $^{13}\text{CO}_2$  et une phase gazeuse constituée du  $\text{CO}_2$  introduit en quantité connue. De façon pratique, avant incubation le tube est balayé à faible débit pendant environ 30 secondes par un mélange gazeux (air synthétique par exemple) contenant 3 à 5 % de  $\text{CO}_2$  (Fig. 1). Au terme de la réaction de métabolisation, quelques microlitres d'un acide fort sont introduits dans le tube afin de déplacer sous forme gazeuse la totalité du  $\text{CO}_2$  ( $^{13}\text{CO}_2$  et  $^{12}\text{CO}_2$ ).

### Mesure de l'enrichissement isotopique

La mesure de l'enrichissement isotopique est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse isotopique couplé à une colonne de chromatographie gazeuse qui assure la purification de l'échantillon de  $\text{CO}_2$  (GC-IRMS). Cet appareil permet d'obtenir des résultats rapides (5 minutes) d'une très grande précision et d'une excellente reproductibilité [4]. Le spectromètre de masse isotopique est un spectromètre de masse à champ fixe permettant une mesure simultanée des différents isotopomères du  $\text{CO}_2$ . Les caractéristiques analytiques ainsi que les performances de l'appareillage ont été décrites par ailleurs [5]. Nous nous contenterons ici de rappeler brièvement le mode d'expression des résultats. Les mesures sont réalisées et exprimées par rapport à un  $\text{CO}_2$  de référence dont l'enrichissement est parfaitement connu. Les résultats peuvent être exprimés de deux façons :

- La première expression fait appel au delta  $^{13}\text{C}$  ‰ ( $\delta^{13}\text{C}$  ‰) qui est égal à :

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰} = \frac{\left( (R_{\text{éch}} - R_{\text{réf}}) \times 1000 \right)}{R_{\text{réf}}} \quad (4)$$

où  $R_{\text{éch}}$  correspond à la mesure du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de l'échantillon et où  $R_{\text{réf}}$  correspond à la mesure du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  de référence.

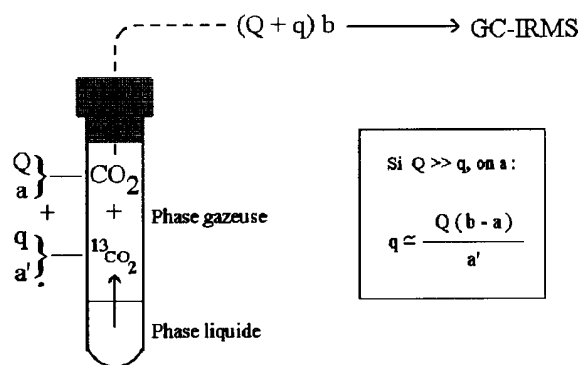


Figure 1. Présentation schématique du principe de la dilution isotopique inverse.

- La seconde manière d'exprimer les résultats est d'employer l'APE, pour Atom Percent Excess, qui correspond à :

$$APE = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \times 100. \quad (5)$$

La GC-IRMS permet de connaître exactement la quantité de  $^{13}\text{CO}_2$  (en nanomoles par exemple) qui a induit la variation d'enrichissement isotopique mesurée. En effet la correspondance est possible en réalisant une gamme d'étalonnage à partir de bicarbonate marqué au  $^{13}\text{C}$ . La variation d'enrichissement isotopique de la phase gazeuse est corrélée linéairement à la quantité de bicarbonate marqué ajouté [6].

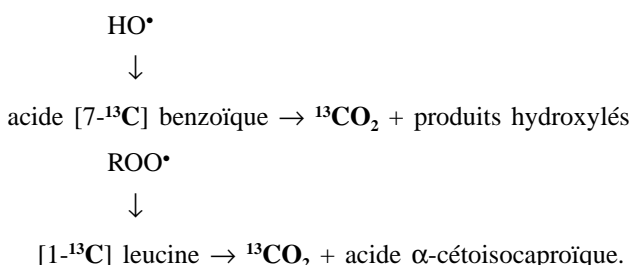
### Applications

Plusieurs applications utilisant la dilution isotopique inverse ont déjà été décrites dans la littérature. Elles recouvrent plusieurs domaines : la biochimie, la toxicologie ou l'enzymologie.

#### Détection de la production de radicaux libres

Un radical libre est une espèce possédant un ou plusieurs électrons non appariés qui lui confèrent généralement une importante réactivité. Cette réactivité peut s'exercer, par l'intermédiaire de réactions en chaîne, à l'encontre des constituants de la matière vivante. Selon l'espèce radicalaire générée, les techniques de détection sont différentes. Certaines peuvent être directes, c'est le cas de la résonance paramagnétique électronique, ou indirectes. Ainsi pour suivre la production du radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) il est par exemple employé l'hydroxylation aromatique de différents substrats (salicylate, benzoate, phénylalanine) [7,8]. La détection indirecte de production du radical peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) fait appel à d'autres principes : hémolyse des globules rouges ou chimiluminescence du luminol par exemple [9].

Le principe de la dilution isotopique inverse a été utilisé pour la détection indirecte de la production de radicaux libres [10-12]. En utilisant des substrats marqués au carbone 13, tel que la leucine ou l'acide benzoïque il a été possible de mettre en évidence la production de radicaux  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{ROO}^\bullet$  (Fig. 2).



Une technique utilisant l'acide [7- $^{14}\text{C}$ ] benzoïque pour la détermination de radicaux  $\text{HO}^\bullet$  a été décrite [14]. La technique utilisant la dilution isotopique inverse avec un isotope

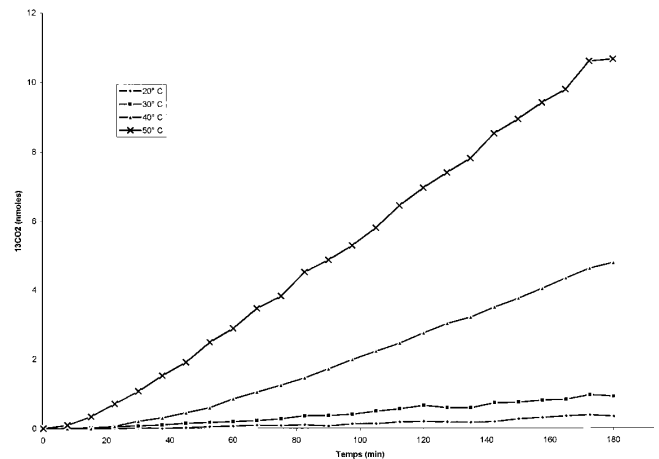


Figure 2. Influence de la température sur la cinétique de production de  $^{13}\text{CO}_2$  à partir de la décarboxylation de l'acide [7- $^{13}\text{C}$ ] benzoïque en présence de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)chlorhydrate (initiateur de radicaux libres) [13].

stable constitue une avancée technique. En effet, outre l'intérêt lié à l'utilisation de produits non radioactifs, cette technique permet une mesure en ligne du  $^{13}\text{CO}_2$  (la technique radioactive nécessite avant la mesure par scintillation, la capture du  $^{14}\text{CO}_2$  à l'aide d'une solution alcaline). De plus, la sensibilité de la méthode  $^{13}\text{C}$  permet la détection d'une quantité de  $^{13}\text{CO}_2$  inférieure à 500 picomoles (cette limite est de l'ordre de 5 à 10 nanomoles pour la méthode  $^{14}\text{C}$ ).

#### Mesure de la voie des hexoses monophosphates

Les cellules réagissent à un stress oxydatif par différents mécanismes ayant pour objectif de maintenir leur intégrité. Parmi les moyens de défense, la cellule met en jeu la voie des hexoses monophosphates (HMP) qui correspond à la dégradation oxydative du glucose avec production de  $\text{CO}_2$  et de NADPH. Il est par conséquent possible de suivre l'activité de la voie des HMP en estimant la production de  $^{14}\text{CO}_2$  ou de  $^{13}\text{CO}_2$  à partir de D-[1- $^{14}\text{C}$ ] glucose ou de D-[1- $^{13}\text{C}$ ] glucose [6,15]. L'emploi de glucose marqué en position 2 ou 6 permet de suivre d'autres voies.

Le travail réalisé sur des polynucléaires neutrophiles humains et utilisant le principe de la dilution isotopique inverse associée au marquage au carbone 13 du glucose nécessite une quantité de cellules pratiquement 10 fois inférieure à la technique radioactive. De plus, la production  $^{13}\text{CO}_2$  est exprimée en nanomoles à l'inverse de la technique radioactive qui ne permet d'obtenir qu'un résultat exprimé soit en coup par minute, soit en pourcentage de radioactivité par rapport à un témoin [6].

#### Mise en évidence d'un système enzymatique chez une larve

La technique utilisant le principe de la dilution isotopique inverse a été employée dans la recherche d'une activité enzy-

matique de type cytochrome P-450 dépendante (P-450) chez une larve de nématode : *Heligmosomoides polygyrus* [16]. Jusqu'alors les recherches de ce système oxydatif chez les helminthes avaient été infructueuses. Deux raisons ont été invoquées : absence effective de ces P-450 ou manque de performance des méthodes classiques employées [17]. Ces dernières consistent à suivre l'apparition, au cours d'un temps relativement court, du produit de métabolisation d'un substrat spécifique incubé sur des homogénats de larves.

La technique isotopique a consisté à utiliser des larves vivantes maintenues une douzaine d'heures dans un milieu contenant de la [2-<sup>13</sup>C] aminopyrine. Ce substrat est connu pour subir une réaction de déméthylation via les P-450 et conduire à la production de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>. La méthode présente plusieurs avantages. Le premier est de pouvoir travailler sur des larves vivantes ce qui écarte le risque de destruction ou d'inhibition des systèmes enzymatiques et préserve leur intégrité lors de la préparation des homogénats. Le second réside dans l'excellente sensibilité de la technique qui permet de détecter une très faible production de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>.

### Détermination de l'enrichissement en <sup>13</sup>C leucine des protéines musculaires humaines

Depuis quelques années se sont développées des méthodes analytiques, utilisant les isotopes stables, pour mesurer la synthèse protéique au niveau musculaire. Certaines techniques nécessitent une importante quantité de matériels biologiques et sont de réalisation laborieuse [18]. Une technique associant la GC-IRMS et la combustion permet d'une part d'éviter les nombreuses étapes préparatives liées à l'isolation de la leucine et d'autre part ne requière qu'une petite quantité de prélèvement musculaire. Une autre méthode basée sur la production de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> par de la ninhydrine à partir de la fonction carboxylique de la [1-<sup>13</sup>C] leucine et la mesure en ligne du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> a récemment été développée [19]. Cette technique demande une phase de préparation de l'échantillon biologique mais permet d'obtenir des résultats très précis et reproductibles même pour de faibles variations d'enrichissement.

### Conclusion

Le système de test *in vitro* présenté ici est d'une mise en œuvre facile grâce à la possibilité de mesure en ligne de l'enrichissement en <sup>13</sup>C du CO<sub>2</sub> prélevé dans l'atmosphère gazeuse du milieu d'incubation. La précision des mesures repose sur le concept de la spectrométrie de masse isoto-

pique en flux continu et des mesures par encadrement de CO<sub>2</sub> de référence. La sensibilité de l'appareillage capable de mettre en évidence des variations du millionième du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, associée à la méthode de dilution isotopique inverse confère à cette technique une très grande sensibilité.

Le test est applicable à tous les systèmes biologiques ou chimiques qui produisent du CO<sub>2</sub>. Le choix du substrat marqué et la position de marquage permet de suivre spécifiquement une voie métabolique.

### Références

- Dixon, N. M.; Kell, D. B. *J. Microbiol. Methods* **1989**, *10*, 155-162.
- Krumbiegel, P. In: P. Krumbiegel P., Eds, Gusta Fisher Verlag, Jena, 1991.
- Sabot, J. F. *Analisis* **1994**, *22*, 381-391.
- Guilluy, R.; Billion-Rey, F.; Brazier, J. L. *J. Chromatogr.* **1991**, *222*, 341-350.
- Guilluy, R.; Billion-Rey, F.; Pachiaudi, C.; Normand, S.; Riou, J. P.; Jumeau, E. J.; Brazier, J. L. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *259*, 193-202.
- Lamrini, R.; Lacan, P.; Francina, A.; Guilluy, R.; Brazier, J. L. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1017-1020.
- Grootveld, M.; Halliwell, B. *Biochem. J.* **1986**, *237*, 499-504.
- Gutteridge, J. M. C. *Biochem. J.* **1987**, *243*, 709-714.
- Freisleben, H. J.; Packer, L. Free-radical scavenging activities, interactions and recycling of antioxidants. *Biochem. Soc. Transact.* **1993**, *21*, 325-330.
- Tinardon, F.; Lamrini, R.; Lacan, P.; Désage, M.; Francina, A. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1373-1376.
- Lamrini, R.; Lacan, P.; Francina, A.; Guilluy, R.; Désage, M.; Michon, J.; Becchi, M.; Brazier, J. L. *Free Radic Biol. Med.* **1998**, *24*, 280-289.
- Lamrini, R.; Crouzet, J. M.; Francina, A.; Guilluy, R.; Steghens, J. P.; Brazier, J. L. *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 129-136.
- Lamrini, R. Étude d'un modèle cellulaire et de deux modèles acellulaires de production d'espèces oxygénées réactives, Thèse de doctorat, Université Lyon 1, 1996.
- Sagone, A. L.; Decker, M. A.; Wells, R. M.; DeMocko, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *628*, 90-97.
- Absolom, D. R. *Meth. Enzymol.* **1986**, *132*, 95-101.
- Kerboeuf, D.; Soubieux, D.; Guilluy, R.; Brazier, J. L.; Rivière, J. L. *Parasitol Res.* **1995**, *81*, 302-304.
- Precious, R.; Barrett, J. *Parasitol Today* **1989**, *5*, 156-160.
- Balagopal, P.; Nair, K. S.; Stirewalt, W. S. *Anal. Biochem.* **1994**, *221*, 72-77.
- Balagopal, P.; Ford, G. C.; Ebenstein, D. B.; Nadeau, D. A.; Nair, K. S. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 77-85.