HAL
open science

Physiologie isotopique du Calcium chez les mammifères

Théo Tacail

To cite this version:

Théo Tacail. Physiologie isotopique du Calcium chez les mammifères. Sciences de la Terre. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSEN071 . tel-01799638

HAL Id: tel-01799638

https://theses.hal.science/tel-01799638

Submitted on 25 May 2018

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.

Numéro National de Thèse : 2017LYSEN071

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée par

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N°341

Ecosystèmes Evolution Modélisation Microbiologie

Discipline de doctorat : Sciences de la Terre

Spécialité de doctorat : Géochimie isotopique

Soutenue publiquement le 24/11/2017, par :

Théo TACAIL

Physiologie isotopique du calcium chez les mammifères

Calcium isotope physiology in mammals

Devant le jury composé de :

Schmitt Anne-Désirée	Maître de conférences	Université de Strasbourg (LHyGeS-EOST)	Rapporteure
Vico Laurence	Directrice de recherche	INSERM (SAINBIOSE)	Rapporteure
Laville Martine	Professeure	Université de Lyon (CRNH)	Examinatrice
Maureille Bruno	Directeur de recherche	CNRS (PACEA)	Examinateur
Skulan Joseph	Doctor	University of Wisconsin-Madison, USA	Examinateur
Albarède Francis	Professeur	Ens de Lyon (LGLTPE)	Examinateur
Balter Vincent	Directeur de recherche	CNRS (LGLTPE)	Directeur de thèse

Table des matières

1 Introduction **1**

I Physiologie du Ca chez les mammifères et l'humain 2

A Une répartition hétérogène 4

B De nombreuses fonctions, à tous les niveaux d'organisation 6

C Homéostasie phosphocalcique 10

D Equilibres et déséquilibres calciques au cours de la vie et de la maladie 18

II Notions de géochimie des isotopes stables et isotopes du Ca 23

A Isotopes du Ca et notation "delta" 23

B Fractionnements isotopiques dépendants de la masse 24

III Etat de l'art de la physiologie isotopique du Ca 28

A Les débuts 28

B Alimentation et consommation de lait 32

C Effets trophiques et écologies des vertébrés 33

D Suivi dynamique de la balance osseuse 34

IV Problématique et plan de thèse 37

I Méthodes d'analyse **39**

2 Principe général de l'analyse des compositions isotopiques du Ca par MC-ICP-MS **41**

I Mesures de rapports d'isotopes stables par MC-ICP-MS 42

A Spectrométrie de masse à torche plasma et multicollection 42

B Mesure de $\delta^{44/42}Ca$ 42

C Contraintes analytiques du MC-ICP-MS et de l'analyse du Ca 45

D Préparation des échantillons 48

E Justesse et précision 48

II Analyses élémentaires par ICP-AES et ICP-MS 48

III Conclusion et développement de méthodes analytiques de la thèse 49

3 Protocole d'analyse des compositions isotopiques du Ca des tissus biologiques **51**

I Introduction . . . 52

II Article "*A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples*" . . . 52

4 Justesse des analyses, compilation et conversion des données de la littérature **55**

I Compilation des standards de la littérature . . . 56

A Description du travail de compilation . . . 56

B Compilation des principaux standards . . . 59

II Compilation des analyses de standards des travaux de thèse . . . 61

III Conversion des données de la littérature . . . 65

A Composition du SRM915a, justesse et principe de conversion . . . 65

B Création d'une base de données de la littérature . . . 68

5 Résolution spatiale des analyses de tissus minéralisés **71**

I Introduction . . . 72

II Article « *Precise analysis of Ca stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MCICPMS* » . . . 74

II Les sources de Ca, de l'écosystème à l'individu **77**

6 $\delta^{44/42}Ca$ des tissus minéralisés et utilisation du Ca au sein des écosystèmes **81**

I Relation entre alimentation et os . . . 82

II Milieu marin . . . 84

III Milieu continental terrestre . . . 85

IV Sources primaires de Ca environnemental des vertébrés . . . 86

7 Estimation des compositions en isotopes du Ca de l'alimentation humaine **89**

I Principe de l'étude . . . 90

II Méthodes . . . 91

A Estimation des distributions des $\delta^{44/42}Ca$ des différents groupes d'aliments . . . 91

B Modèle mathématique . . . 94

III Résultats et discussion . . . 97

IV Perspectives préhistoriques et historiques . . . 99

8 Transitions nutritionnelles précoces **105**

I Introduction . . . 106

II Article *"Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel"* . . . 106

III Effets physiologiques : observations et modélisations **109**

9 Distribution des isotopes du Ca dans l'organisme **113**

I Introduction . . . 114

II Matériel et méthodes . . . 114

A Echantillons de moutons . . . 114

B Echantillons de rats . . . 114

C Echantillons humains . . . 115

D Analyses des compositions isotopiques du Ca . . . 117

III Résultats et relations entre les principaux réservoirs . . . 117

A Relations entre os et Ca alimentaire . . . 117

B Relations entre sang et urines . . . 118

C Composition isotopique du sang et relations entre le sang et l'os . . . 121

D Tissus mous, absorptions et excrétions . . . 128

IV Mécanismes des fractionnements des isotopes du Ca . . . 130

A Fractionnement rénal des isotopes du Ca . . . 131

B Autres transports transépithéliaux . . . 135

C Fractionnement à la minéralisation osseuse . . . 139

D Fractionnements dans les tissus mous et Ca intracellulaire . . . 140

V Mécanismes moléculaires possibles . . . 140

VI Bilan et modèle conceptuel . . . 141

A Fractionnements isotopiques . . . 141

B Modèle conceptuel . . . 142

10 Modèle de boîte **147**

I Introduction . . . 148

II Méthodes numériques . . . 148

A Programme *Isopybox* . . . 148

B Principe et formalisme mathématique . . . 149

C Construction du modèle isotopique pour le Ca des mammifères . . . 152

D Principe de la résolution de l'état stationnaire . . . 155

III Résultats et discussion . . . 157

A Les fractionnements à la minéralisation suffisent-ils ? . . . 157

B Les fractionnements à la minéralisation et à l'excrétion urinaire sont-ils compatibles ? 157

C Les effets du fractionnement rénal peuvent-ils être modérés par d'autres paramètres ? 160

D Comment expliquer les dérives des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sanguins et urinaires lors de la perte osseuse induite ? 166

Conclusions et perspectives **173**

Annexes **179**

A Suppléments à l'article
A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples **179**

B Suppléments au Chapitre 4 **181**

C Article
Spatial distribution of trace element Ca-normalized ratios in primary and permanent human tooth enamel **185**

D Suppléments à l'article
Precise analysis of calcium stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MCICPMS **187**

E Article
Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs **189**

F Article
Calcium Isotopic Evidence for Vulnerable Marine Ecosystem Structure Prior to the K/Pg Extinction **191**

G Article
Non-traditional isotope perspectives in vertebrate palaeobiology **193**

H Figure S4 de l'article
Assessing Human Weaning Practices using Calcium isotopes in tooth enamel **195**

I Suppléments au Chapitre 9 **197**

J Article
Calcium isotope evidence for dramatic increase of continental weathering during the Toarcian oceanic anoxic event (Early Jurassic) **201**

Bibliographie 202

Résumé 222

Abstract 222

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

I Physiologie du Ca chez les mammifères et l'humain 2

A Une répartition hétérogène 4

B De nombreuses fonctions, à tous les niveaux d'organisation 6

C Homéostasie phosphocalcique 10

D Equilibres et déséquilibres calciques au cours de la vie et de la maladie 18

II Notions de géochimie des isotopes stables et isotopes du Ca 23

A Isotopes du Ca et notation "delta" 23

B Fractionnements isotopiques dépendants de la masse 24

III Etat de l'art de la physiologie isotopique du Ca 28

A Les débuts 28

B Alimentation et consommation de lait 32

C Effets trophiques et écologies des vertébrés 33

D Suivi dynamique de la balance osseuse 34

IV Problématique et plan de thèse 37

I Physiologie du Ca chez les mammifères et l'humain

Le calcium est un élément de la famille des métaux alcalino-terreux découvert en 1808 par Humphry Davy. Son numéro atomique est 20 et il présente à l'état fondamental la configuration électronique suivante : [Ar]$4s^2$. A pression atmosphérique et température ambiante, il forme en solution des cations divalents Ca^{2+}, en perdant les deux électrons de son orbitale 4s, et atteint la configuration électronique de l'argon. Il ne possède qu'un état d'oxydation et la forme hydratée de son ion présente des coordinations variant entre 6 et 8 molécules d'eau (Hewish *et al.* 1982, Katz *et al.* 1996, Jalilehvand *et al.* 2001). Majeur en contexte continental (4.6 % de la croûte continentale) et relativement abondant en domaine marin ($\simeq$420 mg.L^{-1} dans l'eau de mer), il est apporté dans l'organisme par l'alimentation (nourriture et boisson), à hauteur d'environ 1 g par jour chez l'humain (Truswell 2017). Les produits laitiers représentent la majeure partie des ces apports dans les populations occidentales, soit 50 à 70 % des apports, notamment en France et en Amérique du Nord (Guéguen et Pointillart 2000, Leblanc et Sirot 2011, Del Valle *et al.* 2011). Dans le corps humain, il est le cinquième élément le plus abondant (1.5 % de la masse soit environ 1 kg pour un humain de 70 kg) après l'oxygène (65 %), le carbone (85 %), l'hydrogène (9.5 %) et l'azote (3.2 %).

Dans la cellule, l'homéostasie du Ca^{2+} est primordiale pour toute forme de vie. Malgré des caractéristiques qui en font un élément d'intérêt pour l'organisme vivant (chimie de coordination, cinétiques de liaisons aux protéines, *etc.*), le seuil de cytotoxicité dans la cellule est bas et des concentrations trop élevées peuvent être létales. Des excès de Ca^{2+} intracellulaire menacent l'intégrité des membranes lipidiques, induisent la formation d'agrégats protéiques et d'acides nucléiques ou encore initient la précipitation de phosphates intracellulaires dans les lumières des organites (Case *et al.* 2007, Shemarova et Nesterov 2007, Doherty *et al.* 2015). La régulation des flux intracellulaires, via des canaux et pompes protéiques, est évolutivement conservée chez les procaryotes et les eucaryotes (Case *et al.* 2007, Shemarova et Nesterov 2007) et la sélection du Ca comme porteur universel de signaux cellulaires est probablement associée à l'apparition des organismes pluricellulaires et de leurs tissus différenciés (Case *et al.* 2007, Shemarova et Nesterov 2007, Brini *et al.* 2013). L'apparition au cours du cambrien (entre 541 et 485Ma) des tissus minéralisés phosphatés, chez les chordés à os dorsal, ou vertébrés, marins puis terrestres, marque l'adoption de nouvelles stratégies et fonctions dont les ordres d'apparition sont encore débattus, mais mettant notamment en jeu les fonctions de régulations ioniques et osmotiques, ainsi que des fonctions mécaniques (Bouillon et Suda 2014, Doherty *et al.* 2015).

Cette partie s'attache à dégager les traits caractéristiques de la distribution, des fonctions et de la régulation des flux de Ca^{2+} chez les mammifères, et particulièrement chez l'homme. Je vais donc décrire la physiologie du Ca chez l'humain - bien que de nombreux d'aspects, en particulier moléculaires, soient partagés avec les autres vertébrés et particulièrement avec les mammifères (*e.g.* Hoenderop 2005, Doherty *et al.* 2015).

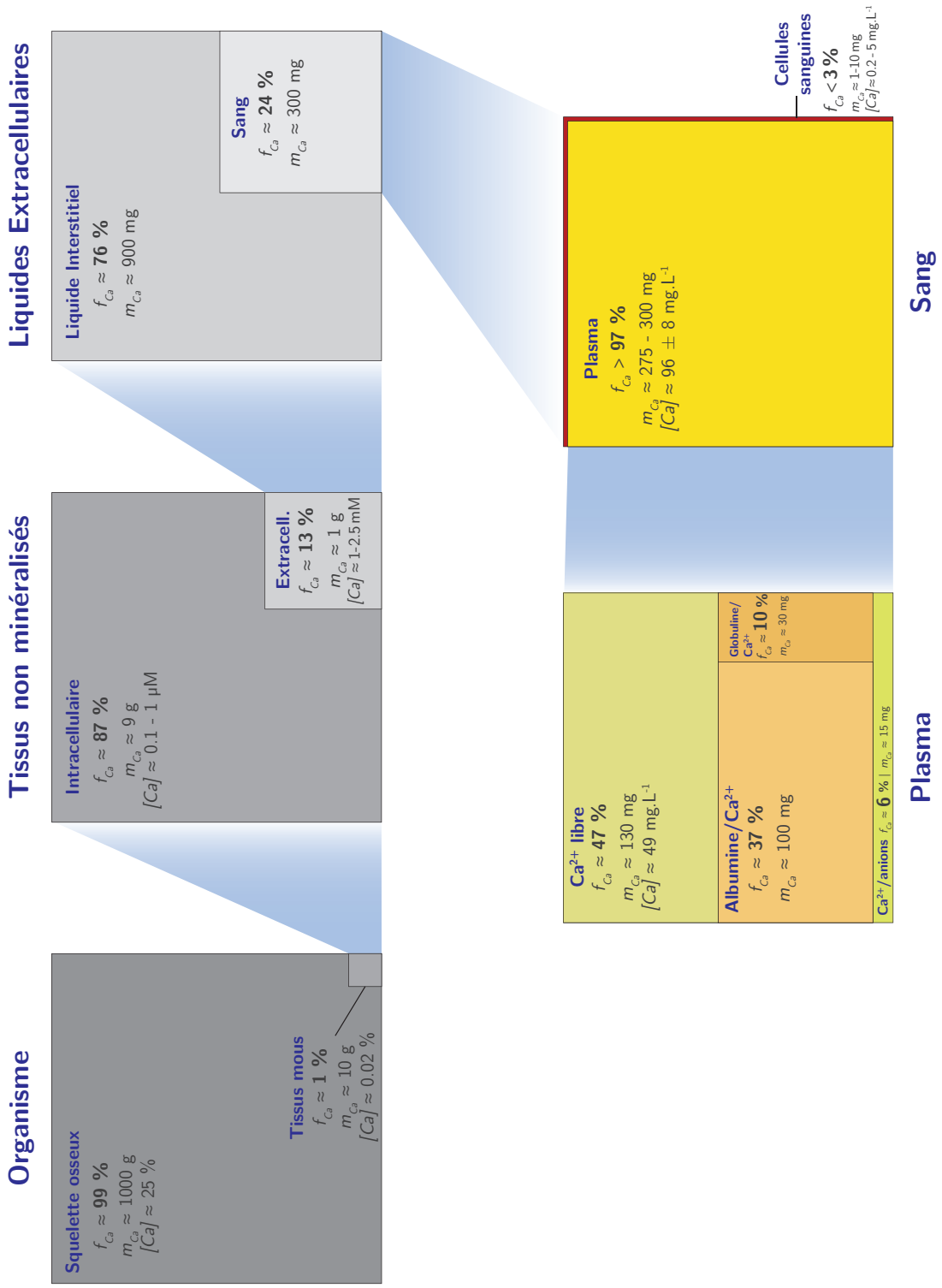

FIGURE 1.1 – **Répartition du Ca^{2+} entre les différents compartiments et à plusieurs niveaux d'organisation pour l'humain adulte et sain.** L'aire de chaque compartiment se rapporte à la proportion de Ca du compartiment relativement au compartiment supérieur. **Repartition of Ca^{2+} among the various reservoirs, given for all levels of organization for a healthy adult human.** The area of each reservoir corresponds to the proportion of Ca in the given reservoir relatively to the reservoir in which the former stands. (Iyengar *et al.* 1978, Bookchin et Lew 1980, LeGeros et Legeros 1984, Berridge *et al.* 2000, Raposo *et al.* 2002, Peacock 2010, Peterson et Riggs 2010, Del Valle *et al.* 2011, Truswell 2017)

A Une répartition hétérogène

La répartition du Ca^{2+} chez les mammifères est marquée par de grandes hétérogénéités à tous les niveaux d'organisation (Fig. 1.1).

A l'échelle de l'organisme, le calcium est réparti entre le squelette osseux (environ 1000 g de Ca chez l'humain adulte sain, soit 99 % du Ca de l'organisme) et les tissus mous et fluides circulants (1 %). Le squelette osseux est constitué en masse de 25 % de matrice organique (essentiellement des fibres de collagène), 10 % d'eau adsorbée et de 65 % de matrice minérale, essentiellement composée d'hydroxyapatite de formule moyenne $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (LeGeros et Legeros 1984).

Les dix grammes de Ca des tissus non-minéralisés sont répartis entre les compartiments cellulaires de tous les tissus (de l'ordre de 90 %) et les fluides extracellulaires (environ 10 %). L'ensemble des fluides extracellulaires, dont le sang, contient entre 1 000 et 1 400 mg de Ca^{2+} en moyenne et représentent un réservoir extrêmement dynamique, le temps de résidence du Ca y étant de l'ordre de quelques heures. Ce dynamisme reflète les échanges constants de Ca^{2+} entre le milieu extracellulaire et l'ensemble des organes, épithéliums et autres tissus.

A l'échelle de la cellule (Figure 1.2), le Ca^{2+} intracellulaire peut être stocké dans des organites (réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique, mitochondries et appareil de Golgi) ou lié à des protéines (*e.g.* calbindines D_{9k}, D_{28k}, ou calmodulines) mais la concentration cytosolique de Ca^{2+} libre est activement maintenue à des niveaux bas : environ 100 nmol.L^{-1} au repos, soit de l'ordre 10 000 à 20 000 fois moins qu'en milieu extracellulaire (Tableau 1.1), et autour de 1 000 nmol.L^{-1} dans la cellule "excitée", soit de l'ordre de 1 000 à 2 000 fois moins qu'en milieu extracellulaire. Cette différence de 3 à 4 ordres de grandeur entre concentrations intra- et extracellulaires distingue le Ca^{2+} des autres ions majeurs, pour lesquelles ces différences varient de 1 à 2 ordres de grandeur. Le Ca^{2+} est donc l'ion libre dont la répartition est parmi les plus hétérogènes à l'échelle cellulaire et tissulaire.

TABLEAU 1.1 – **Ordres de grandeurs des concentrations au repos (mM) des cations libres majeurs dans le cytoplasme, le liquide extracellulaire (LEC) et rapports des concentrations LEC/Cytoplasme**. Le symbole * désigne les concentrations intracellulaires en Ca^{2+} d'une cellule excitée. **Orders of magnitude of resting cell concentrations (mM) for main free cations within cytoplasm, extracellulair fluid (LEC) and LEC/cytoplasm concentration ratios**. The * symbol refers to intracellular Ca^{2+} levels for an excited cell. (Case *et al.* 2007, Bootman 2012)

Cation	Cytoplasme	LEC	LEC/Cytoplasme
Na^+	5-15	145	10-30
K^+	140	5	0.04
Mg^{2+}	0.5	$1-2$	$2-4$
Ca^{2+}	10^{-4}	1.2	$\approx 10\,000$
	10^{-5}*	1.2*	$\approx 1\,000$*

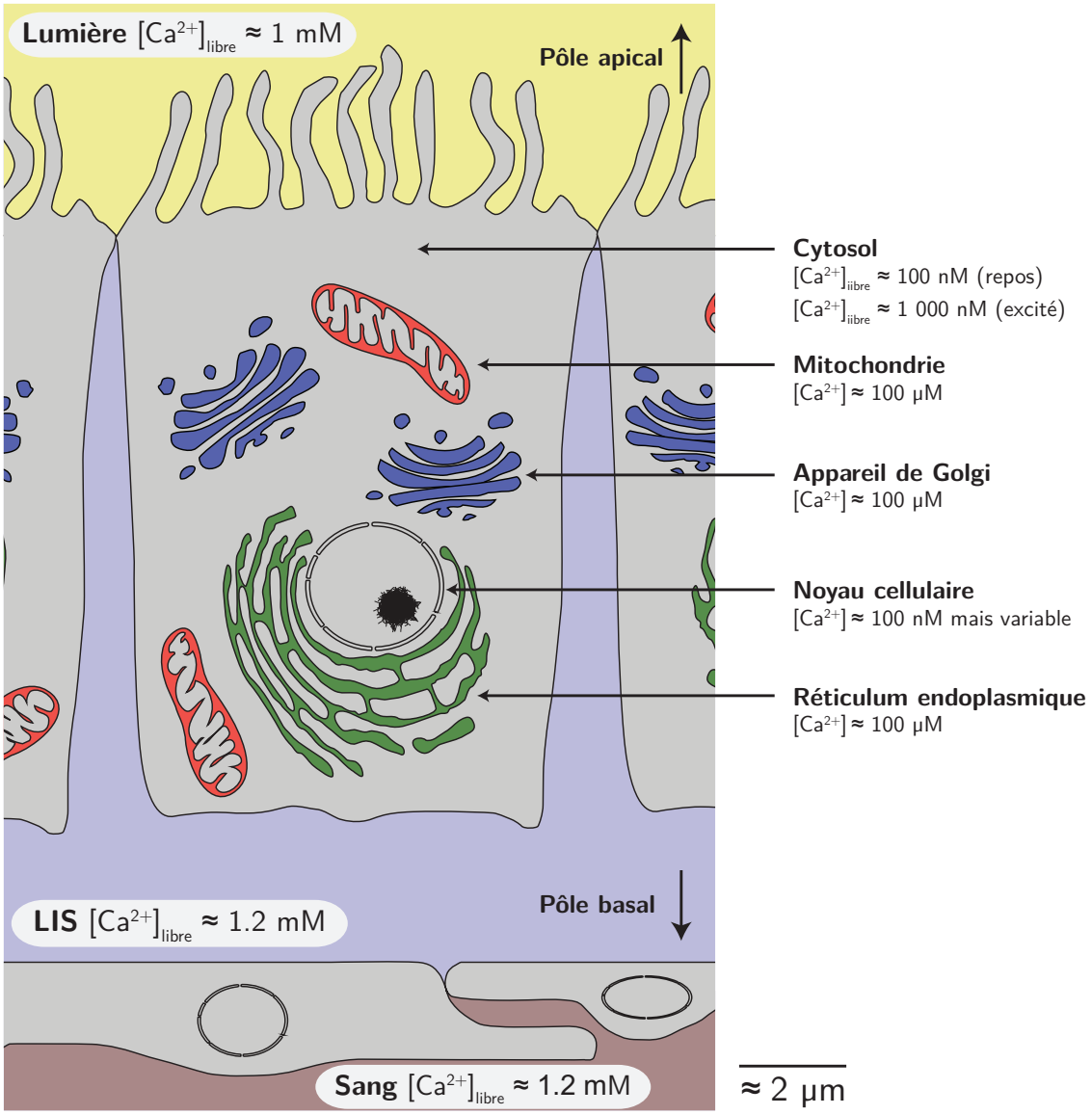

FIGURE 1.2 – **Répartition du Ca^{2+} libre entre les différents compartiments cellulaires et intercellulaire, exemple de l'entérocyte.** LIS : Liquide interstitiel. **Distribution of free Ca^{2+} among the extra- and intracellular reservoirs with the exemple of the enterocyte.** LIS stands for Interstitial Liquid. (Berridge *et al.* 2000, Hoenderop 2005, Case *et al.* 2007, Bootman 2012, Doherty *et al.* 2015)

Enfin, dans le sang, les cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes et plaquettes) ne représentent pas plus de 3 % du Ca sanguin, qui se trouve essentiellement dans le plasma (plus de 97 % du Ca sanguin) où il présente une concentration, appelée calcémie, de l'ordre de 96 mg.L^{-1} (environ 2.4 mmol.L^{-1}). La calcémie ne varie que dans une gamme restreinte autour de cette valeur nominale, d'environ 10 %. Le Ca du plasma est présent sous la forme de Ca^{2+} libre solvaté (de l'ordre de 47 %), lié à des protéines (l'albumine, environ 37 %, et la globuline, 10 %) et enfin complexé à des anions inorganiques (phosphates, carbonates ou oxalates, environ 6 %).

Les quantités de Ca du squelette ainsi que les équilibres entre apports et pertes de Ca osseux sont

marqués par une forte variabilité interindividuelle chez l'humain. La quantité de Ca squelettique est dépendante de nombreux facteurs endogènes (génétiques, hormonaux) et exogènes (activité physique et diète par exemple), et varient selon la physiologie de l'organisme (*e.g.* sexe, croissance, vieillissement, ménopause, ethnie) ou certaines pathologies (*e.g.* rachitisme, ostéomalacie, ostéoporose) (Del Valle *et al.* 2011, Truswell 2017).

B De nombreuses fonctions, à tous les niveaux d'organisation

La distribution si hétérogène du Ca^{2+} entre ces compartiments reflète l'adaptation de cette organisation aux fonctions qu'il remplit aux échelles intra- et extracellulaires. Il est impliqué dans des fonctions clefs dans le compartiment extracellulaire : il participe au maintien de l'intégrité et de la fonction des membranes en tant que cofacteur majeur de protéines (*e.g.* adhésion moléculaire, facteurs de coagulation, sécrétion d'enzymes) (Brown et MacLeod 2001). Il est, avec le phosphate, un composant majeur de la phase minérale de l'os. Dans les compartiments intracellulaires, il participe aux fonctions d'exocytose, à la contraction musculaire ou à la propagation de potentiels d'actions dans certains types de cellules nerveuses. Plus généralement, le Ca^{2+} est un second messager intracellulaire vital et ubiquiste, ce qui le place au cœur de la vie cellulaire, depuis la différenciation jusqu'à la mort programmée, l'apoptose (Clapham 1995, Berridge *et al.* 2000, Bootman 2012, Brini *et al.* 2013, Brown 2013) (Figure 1.3).

Production de carburant cellulaire
- Glycogénolyse (Phospholipase b kinase)
- Lipases et phospholipases
- α-glycérophosphate déshydrogénase
- Pyruvate déshydrogénase phosphate phosphatase
- Déshydrogénase isocitrique NAD-dépendante
- α-cétoglutarate déshydrogénase
- NADH-déshydrogénase
- β-hydroxybutyrate déshydrogénase

Fonctions en lien avec les membranes
- Couplage excitation-contraction
- Couplage excitation-sécrétion (p.ex. neurotransmetteurs)
- Certains potentiels d'action
- Jonctions serrées
- Contact cellulaire

Régulation hormonale
- Formation/dégradation d'AMP cyclique et GMP
- Relargage de plusieurs hormones de vésicules de stockage

Fonctions diverses
- Emission lumineuse
- Cycle cellulaire
- Certaines enzymes protéolitiques
- Couplage transcription-excitation
- Certaines protéines kinases
- Calcineurine
- Production de messagers (p.ex. NO)
- Vision

Systèmes contractiles et de motilité
- Myofibrilles musculaires
- Cils et flagelles
- Microtubules et microfilaments
- Cyclose cytoplasmique
- Formation de pseudopodes

FIGURE 1.3 – **Principales fonctions dans lesquelles le Ca^{2+} est impliqué en tant que second messager intracellulaire. Main fonctions in which Ca^{2+} is involved as an intracellular second messenger.** (adapté de Brini *et al.* (2013))

1 Interactions entre Ca^{2+} et protéines

Le Ca^{2+} interagit avec un très grand nombre de protéines en établissant des liaisons réversibles, d'affinités et de spécificités variables, notamment grâce à un nombre élevé de coordinations (de 6 à 8) qui permettent son accommodation dans des sites protéiques de géométries irrégulières (Carafoli 2002, Brini *et al.* 2013). Il interagit principalement avec l'oxygène et présente une forte affinité pour les groupements carboxylates, qui sont fréquents dans les protéines (Katz *et al.* 1996, Jaiswal 2001, Brini *et al.* 2013). Le Ca^{2+} établit et rompt rapidement ces liaisons avec les protéines et cette cinétique en fait un cation particulièrement mobile. Ces interactions entre protéines et Ca^{2+} permettent le stockage de ce dernier, son transport transmembranaire, transépithelial ou dans les fluides intra- et extracellulaires, et enfin la régulation de l'activité d'enzymes et de protéines plus généralement.

Parmi les protéines libres liant le Ca^{2+} (Calcium Binding Proteins, CBP), deux grandes familles peuvent être distinguées selon leurs rôles : *i)* les protéines "tampon" ou de transport, mobiles, qui stockent ou participent au transport du Ca extracellulaire (*e.g.* albumine, globuline), intracellulaire ou dans le lumen des organites (*e.g.* parvalbumine, Calbindines D_{9k} et D_{28k}) ; *ii)* les protéines récepteurs de Ca^{2+}, que ce dernier active ou inactive, et qui participent à la transduction d'un signal (*e.g.* calmoduline, troponine *etc.*). Les frontières entre les rôles de ces protéines sont cependant parfois floues puisque certaines de CBP remplissent ces deux rôles (*e.g.* Yáñez *et al.* 2012, Brini *et al.* 2013).

Les liaisons établies avec les protéines ayant le Ca^{2+} pour cofacteur sont suffisamment fortes pour induire des changements de conformation de ces protéines (Katz *et al.* 1996). Les changements de conformation induits par le Ca^{2+} permettent l'activation ou l'inactivation de ces protéines par fixation du Ca^{2+} sur des sites généralement non réactionnels. Le Ca^{2+} a en effet majoritairement un effet allostérique contrairement à nombre de métaux essentiels (Fe, Zn, Cu ou Mn) impliqués dans les réactions enzymatiques (Brini *et al.* 2013). Par ailleurs, ces liaisons sont suffisamment réversibles ce qui permet des échanges et donc des flux très dynamiques de Ca^{2+}. Ainsi, les protéines CBP modulent le signal de Ca^{2+} dans l'espace et dans le temps. Les voies de signalisation dans lesquelles le Ca^{2+} est impliqué sont donc caractérisées par des vitesses de transduction variables selon les types et les structures des sites d'accueil des protéines, ces vitesses pouvant être particulièrement grandes.

Les activités de beaucoup de protéines sont régulées directement ou indirectement par le Ca^{2+}, incluant les activités de nombreuses kinases et phosphatases, de facteurs de transcription, de la protéine ubiquiste calmoduline (CaM), ou encore de la troponine C au cours de la contraction musculaire.

2 Régulation du Ca^{2+} libre intracellulaire et rôle de second messager

La régulation de la concentration du Ca^{2+} libre cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) est au cœur de son mode d'action. Les flux de Ca^{2+} sont régulés par 4 grands types de protéines transmembranaires :

— des **canaux transmembranaires** permettent la diffusion du Ca^{2+} selon le gradient de concentration donc depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol. L'ouverture de ces canaux peut être régulée par des potentiels d'action membranaires, des récepteurs d'hormones ou autres molécules ou encore des variations de quantités de Ca^{2+} d'un organite.

— des **échangeurs transmembranaires** emploient le gradient électrochimique d'un autre ion (*e.g.* Na2+) pour échanger ce dernier contre Ca^{2+}, déplacé à l'encontre du gradient électrochimique, donc vers le milieu extracellulaire.

— des **pompes Ca^{2+}-ATP-asiques** consomment l'énergie chimique de l'ATP pour transporter deux Ca^{2+} de l'autre côté de la membrane, à l'encontre du gradient électrochimique, donc vers le milieu extracellulaire ou le lumen d'un organite.

— des **protéines tampon** du cytosol et des organites participent à l'ajustement de la concentration de Ca^{2+} libre dans l'espace et dans le temps.

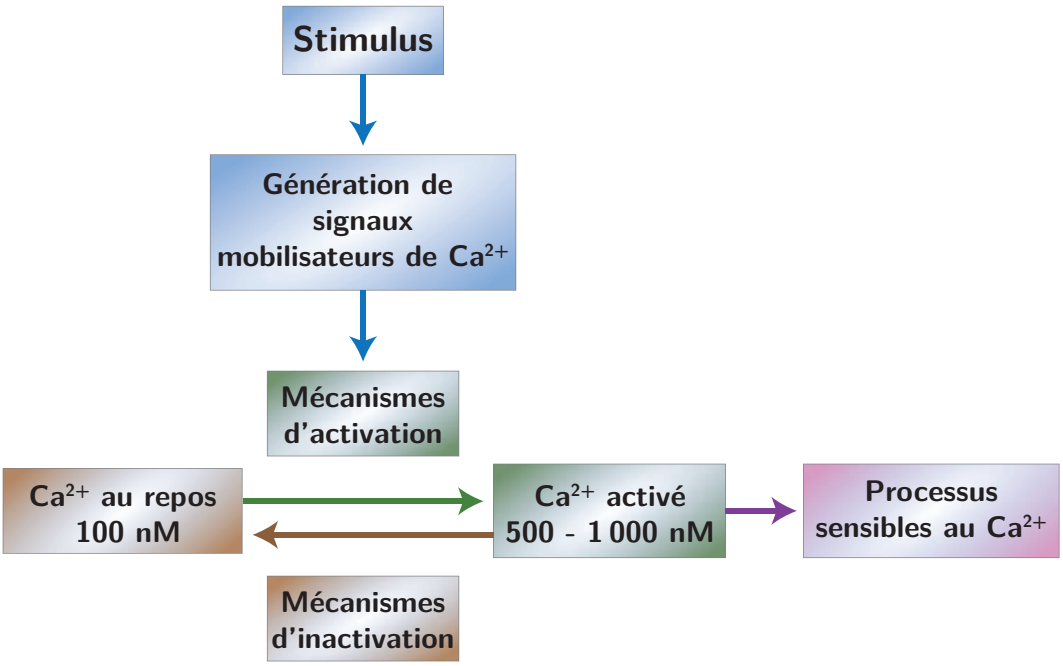

FIGURE 1.4 – **Principe de l'action du Ca^{2+} comme second messager intracellulaire.** La stimulation génère un signal activateur (bleu) de mécanismes libérateurs de Ca^{2+} (vert). L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} libre dans le cytosol (vert) stimule divers mécanismes dépendants du Ca^{2+} ce qui induit la réalisation de diverses fonctions (rose). Enfin, la réponse est inhibée après l'activation de mécanismes inactivateurs impliquant le retour à la concentration de repos. **Principle of the Ca^{2+} action as an intracellular second messenger.** Stimulation produces an activating signal (blue) stimulating Ca^{2+} release mecanism (green). Increase in free Ca^{2+} in cytosol (green) triggers several mecanisms depending on Ca^{2+}, involving in turn diverse functions (pink). Finally, the response is inhibited following the activation of inactivating mecanisms resulting in the decrease of Ca^{2+} back to resting levels. (adapté de Berridge *et al.* (2000)).

On peut distinguer quatre étapes principales de la signalisation (Figure 1.4 et Berridge *et al.* (2000), Brini *et al.* (2013)). L'arrivée d'un stimulus (chimique, mécanique ou électrique) induit la génération d'un signal mobilisateur de Ca^{2+}, qui peut être par exemple une première décharge de Ca^{2+} lui-même ou encore l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3). Le signal active le mécanisme de libération de Ca^{2+} du réticulum et/ou extracellulaire et donc l'augmentation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Ce processus est donc passif et met en jeu des canaux spécifiques au Ca^{2+} comme InsP3R, récepteur de IP3. La décharge de Ca^{2+} enclenche des processus sensibles au Ca^{2+} particulièrement variés, dépendant notamment du phénotype cellulaire. Enfin, l'excès de Ca^{2+} libre est évacué activement et plus ou moins rapidement du cytosol à travers l'action des pompes et échangeurs transmembranaires de la membrane plasmique ou des organites. La concentration en Ca^{2+} libre est également contrôlée par l'action de protéines tampon intracellulaires se liant au calcium (*e.g.* parvalbumine, les calbindine D_{9k} et D_{28k}) et qui jouent des rôles de tampons chimiques en empêchant l'action du Ca^{2+} sur d'autres protéines. La régulation de cette concentration cytosolique correspond à l'homéostasie calcique cellulaire.

La grande diversité des réponses à la transduction du signal d'un second messager unique est en grande partie due à la capacité de la cellule à exploiter les distributions spatiales et temporelles des signaux transitoires de Ca (Rizzuto et Pozzan 2006, Bading 2013). Les protéines intervenant dans la régulation des flux de Ca^{2+} cellulaires sont exprimées de manière différentielle selon les tissus. Une des conséquences en est que les constantes de temps tissus-spécifiques des oscillations temporelles et spatiales de concentrations intracellulaires dépendent des phénotypes cellulaires. Les myocites cardiaques présentent ainsi des augmentations transitoires rapides de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, de quelques centaines de millisecondes permettant des contractions fréquentes du muscle cardiaque, chaque seconde ou moins. A l'inverse, des cellules non-excitables présentent des oscillations de plusieurs dizaines de secondes ou de quelques minutes, participant au contrôle de l'expression de gènes ou du métabolisme (Dupont *et al.* 2011).

3 Fonctions de l'os

Le Ca participe à l'architecture de la phase minérale de l'os en constituant 36 à 40 % en masse de l'hydroxyapatite, qui elle même représente plus de 90 % de la phase minérale de l'os (LeGeros et Legeros 1984). L'os spongieux ou trabéculaire (20 % de la masse osseuse), entouré d'os cortical plus dense (80 %), baigne dans la moelle osseuse, lieu de l'hématopoïèse, différenciation des cellules sanguines : érythrocytes, leucocytes et plaquettes (Del Valle *et al.* 2011).

Par ailleurs, l'hydroxyapatite participe aux fonctions de résistance, de rigidité et d'élasticité de l'os grâce à sa structure nanocristalline et à l'agencement de ces cristaux avec la matrice organique (Glimcher 2006). Indirectement, le Ca participe donc aux fonctions de locomotion, de support et de protection du squelette.

Enfin l'os, à travers les cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes), présente une fonction

endocrine et interagit à l'échelle de l'organisme avec d'autres organes (*e.g.* cerveau, reins, muscle, foie). Il est impliqué dans l'homéostasie de l'organisme total, en lien notamment avec le métabolisme énergétique, le métabolisme des graisses ou encore la fertilité, via par exemple les actions de la leptine ou de l'ostéocalcine, deux hormones respectivement interagissant avec et produites par l'os (Karsenty et Ferron 2012).

C Homéostasie phosphocalcique

Le maintien de la concentration en Ca^{2+} libre du fluide extracellulaire conditionne le fonctionnement normal des processus cellulaires car il est le réservoir source des compartiments intracellulaires. On distingue la calcémie ionisée, notée ici $[Ca^{2+}]_{pl}^{libre}$, qui se réfère à la concentration en Ca^{2+} libre du plasma, de la "calcémie totale" ou "calcémie" , notée $[Ca^{2+}]_{pl}$, qui désigne la concentration en Ca^{2+} total du plasma. La calcémie est donc une mesure de la calcémie ionisée, variable régulée de l'homéostasie calcique, bien que le Ca^{2+} lié aux protéines circulantes ne soit pas impliqué directement dans l'homéostasie sur le court terme (Courbebaisse et Souberbielle 2011).

La régulation de la calcémie est couplée à la régulation de la concentration en phosphate inorganique du plasma $[P_i]_{pl}$, également appelée phosphatémie. Le phosphate inorganique du plasma est réparti entre une forme ionisée (55 % environ), des complexes protéiques (10 %) et des complexes avec des cations inorganiques (35 %) (Courbebaisse et Souberbielle 2011). Bien que les mécanismes soient discutés (*e.g.* O'Neill 2007, Peacock 2010, Courbebaisse et Souberbielle 2011, Shroff *et al.* 2013, Lomashvili *et al.* 2014), le maintien du produit phosphocalcique, produit de $[P_i]_{pl}$ par $[Ca^{2+}]_{pl}$, à des valeurs "basses" semble être primordial car des valeurs trop élevées pourraient induire directement ou indirectement des calcifications ectopiques et une valeur trop basse, une déminéralisation accrue.

L'homéostasie phosphocalcique met en jeu trois organes principaux, un organe de stockage de Ca^{2+} et P_i, l'os, et deux épithéliums, le rein et l'intestin, faisant l'interface entre les milieux intérieur et extérieur et participant à la régulation des flux entrant et sortant de l'organisme. Ces organes permettent d'équilibrer les entrées et sorties de Ca du fluide extracellulaire (Figure 1.5) et participent de la sorte au maintien de la calcémie ionisée dans la gamme vitale.

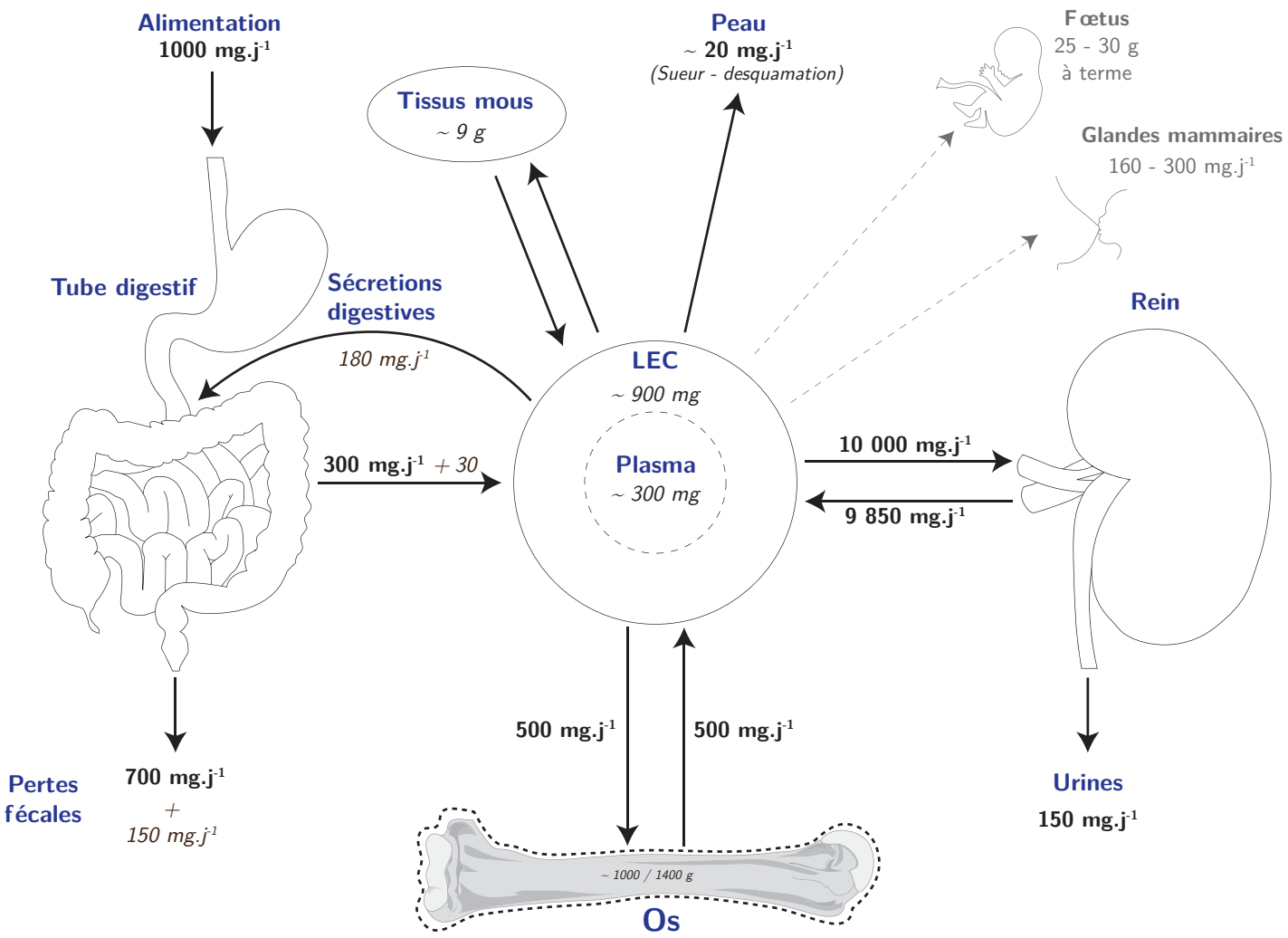

FIGURE 1.5 – **Modèle des principaux flux de Ca pour un individu adulte et sain.** Les ordres de grandeurs pour la femme enceinte ou allaitante sont indiqués en gris. LEC : Liquide extracellulaire, sang exclu. **Model of main Ca fluxes for a healthy adult individual.** Orders of magnitude for pregnant or lactating woman are given in grey. LEC : Extracellular fluid except blood. (Hoenderop 2005, Peterson et Riggs 2010, Peacock 2010, Courbebaisse et Souberbielle 2011, Del Valle *et al.* 2011, Truswell 2017)

1 Rôle de l'os

L'os est un matériau modelé pendant l'enfance et en constant remodelage à l'âge adulte. Grâce à l'action conjointe de deux types de cellules, les ostéoclastes et les ostéoblastes, l'os est en permanence déconstruit et reconstruit (Figure 1.6). Les ostéoclastes sécrètent des protons et des enzymes vers la phase minérale ce qui a pour effets respectifs de dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite et de digérer par hydrolyse la matrice organique, principalement des fibres de collagène type I (Teitelbaum 2000). Ces cellules sont dérivées de la famille des macrophages (Udagawa *et al.* 1990). Les ostéoblastes remplacent l'os détruit en sécrétant la matrice organique de l'os, ou ostéoïde, puis en régulant la minéralisation qui s'ensuit. Ils sont issus de la différenciation de cellules mésenchymateuses (Long 2011). Les microstructures héritées

de ce remodelage sont les ostéons et les cavités de ces ostéons abritent des ostéocytes, provenant de la différenciation de certains ostéoblastes.

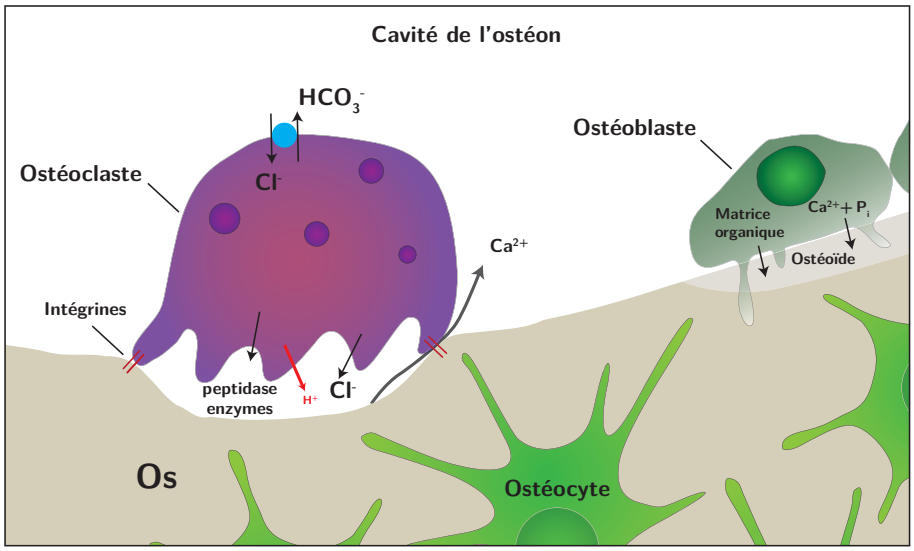

FIGURE 1.6 – **Principe cellulaire du remodelage osseux.** L'activité ostéolytique des ostéoclastes est due à l'acidification de domaines d'os minéralisés ainsi qu'à l'activité d'enzymes détruisant la matrice organique. Les ostéoblastes sécrètent l'ostéoïde, matrice organique précurseur de l'os, minéralisé ensuite. **Cellular principle of bone remodeling.** The osteolytic activity of osteoclastes is due to an acidification of mineralized bone domains as well as the activity of enzymes digesting the organic phase. Osteoblast secrete osteoid that is then mineralized. (Teitelbaum 2000, Long 2011)

Les ostéocytes présentent des prolongements membranaires parcourant des canalicules et forment un réseau à travers les ostéons. Ce réseau permet la communication intercellulaire, par jonctions gap, d'informations sur l'environnement mécanique (par exemple les contraintes physiques), la présence de lésions microscopiques et la concentration en Ca^{2+} extracellulaire. En modulant les activités de résorption et de formation osseuse des ostéoblastes et des ostéoclastes, le squelette joue un rôle de réservoir dynamique de Ca2+ et de phosphate inorganique (Pi) (Rodan et Martin 1981). Il participe activement à l'homéostasie phosphocalcique à court et long terme, en aidant à maintenir des concentrations de Ca^{2+} plasmatique adaptées aux demandes des autres tissus. Il est renouvelé entièrement par remodelage osseux en environ 10 ans chez l'homme adulte, bien que ces taux de renouvellement soient variables selon les types d'os.

2 Rôle de l'intestin

L'épithélium intestinal est le lieu de l'absorption du Ca^{2+} du chyme. Selon son environnement chimique, le Ca^{2+} du chyme est plus ou moins disponible à l'absorption. Cette biodisponibilité peut être définie comme étant la fraction de Ca^{2+} potentiellement absorbable par l'intestin et participant effectivement aux fonctions physiologiques du Ca^{2+} et à la minéralisation osseuse en particulier (Guéguen et Pointillart 2000). En effet, certains nutriments assimilés conjointement au Ca^{2+} peuvent induire son élimination rapide, par les urines

par exemple, empêchant son utilisation par l'organisme.

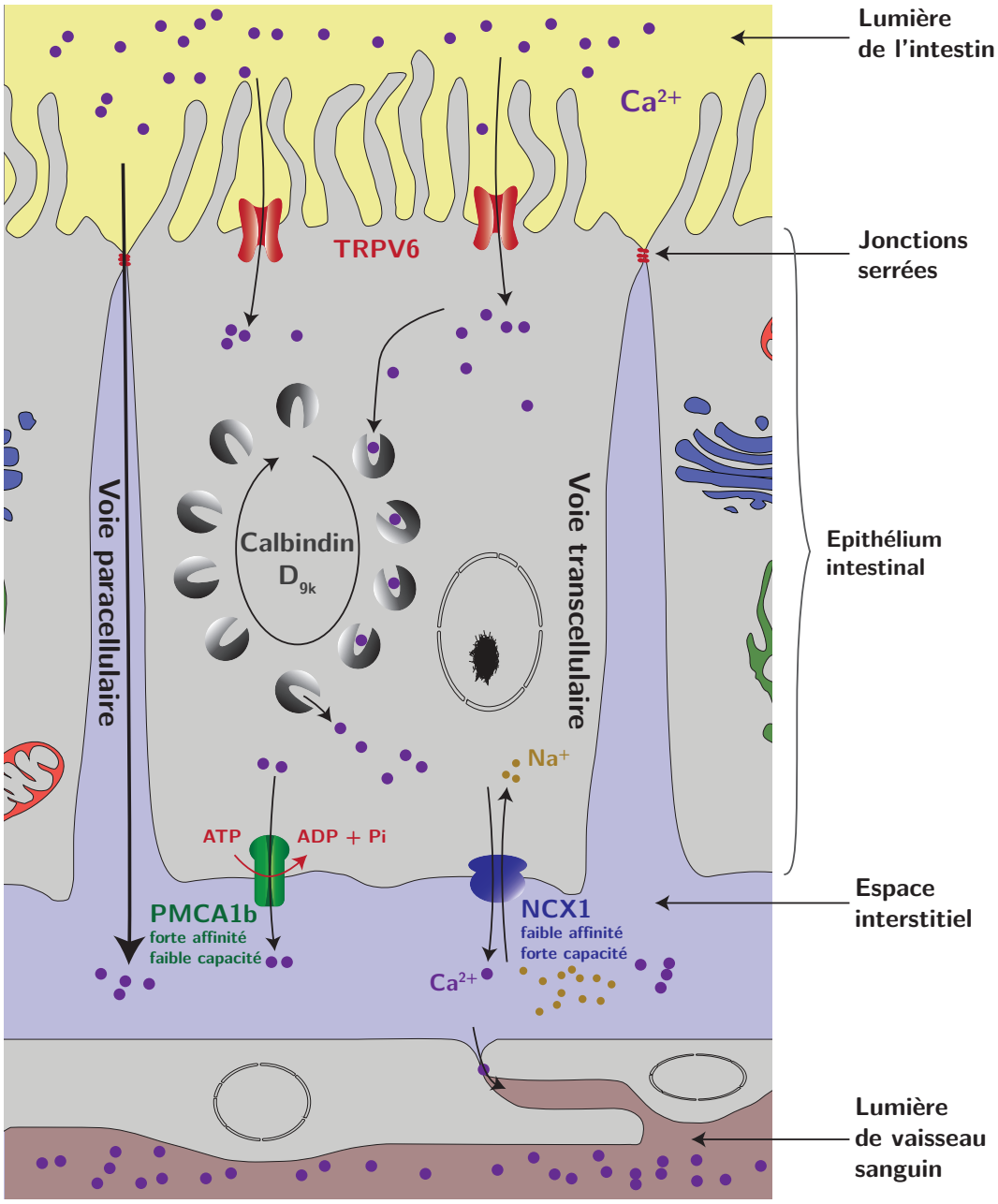

FIGURE 1.7 – **Voies d'absorption du Ca^{2+} à travers l'épithélium intestinal**. Exemple d'un entérocyte du duodénum. **Pathways of Ca^{2+} absorption through intestine epithelium.** Example is taken from a duodenum enterocyte. (Hoenderop 2005, Brini *et al.* 2013)

Le Ca^{2+} passe la barrière épithéliale pour atteindre le fluide interstitiel puis le sang selon deux voies (Figure 1.7). Une fraction du Ca^{2+} est absorbée par voie paracellulaire, c'est-à-dire en passant la barrière des jonctions serrées, et sans pénétrer l'entérocyte. Le transport paracellulaire est possible sur toute la longueur de l'intestin mais les perméabilités au Ca^{2+} sont variables selon les segments, avec les diffusions les plus marquées dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon (*e.g.* Hoenderop 2005, Weaver et Heaney 2006). Ce processus se fait sans apport d'énergie, il est donc passif et met en jeu des protéines permettant une

certaine perméabilité pour le Ca^{2+}, comme les protéines occludines et claudines (Hoenderop 2005, Brini *et al.* 2013).

Le reste du Ca^{2+} absorbé passe par la voie transcellulaire. Cette voie implique l'entrée du Ca^{2+} selon son gradient électrochimique par des canaux transmembranaires TRPV6 de la membrane apicale, et TRPV5 dans une moindre mesure, principalement dans le duodénum (Hoenderop 2005, Xue et Fleet 2009, Courbebaisse et Souberbielle 2011). Le Ca^{2+} est ensuite transporté à travers la cellule, lié à une calbindine D_{9k} ou des vésicules fusionnant avec la membrane basolatérale. Le Ca^{2+} est extrudé à travers la membrane basolatérale vers le fluide extracellulaire par le biais d'échangeurs Na^+/Ca^{2+}, de la famille NCX, principalement NCX1, qui emploient le gradient électrochimique du Na^+ pour échanger 3 Na^+ contre 1 Ca^{2+}. Une autre partie du Ca^{2+} est pompée hors de la cellule via des pompes Ca-ATPasiques, majoritairement PMCA1b, qui consomment une molécule d'ATP pour extruder activement 2 Ca^{2+}.

La balance entre l'absorption par les voies paracellulaire et transcellulaire dépend de la quantité de Ca^{2+} apporté par l'alimentation. En cas d'apports faibles ou modérés, la voie transcellulaire est majoritaire, stimulée par le système hormonal, mais saturable. En cas d'apports importants, la majeure partie du Ca^{2+} absorbé passe par voie paracellulaire, non saturable.

3 Rôle du rein

Le rein excrète par filtration glomérulaire environ 10g de Ca par jour dans les urines primaires. En moyenne 98 % de ces 10 g sont réabsorbés le long du néphron par voie paracellulaire et par voie transcellulaire (Figure 1.8). Environ 70 % du Ca^{2+} est réabsorbé dans le tubule proximal par voie paracellulaire. La réabsorption du Ca^{2+} y est principalement passive et suit la réabsorption locale de Na^+ et d'eau. La branche ascendante large de l'anse de Henlé est le lieu de la réabsorption d'environ 20 % du Ca des urines primaires. La réabsorption y est également principalement paracellulaire et rendue possible par l'électropositivité luminale produite par l'activité de la Na/K-ATPase basolatérale. La perméabilité au Ca^{2+} y est probablement accrue par la présence d'une protéine canal de la jonction serrée, telle que la paracelline-1 (*e.g.* Simon *et al.* 1999, Blanchard *et al.* 2001). Le tubule contourné distal, et dans une moindre mesure le tubule connecteur reliant le néphron au tubule collecteur, réabsorbent 5 à 15 % du Ca^{2+} initialement excrété. Cette réabsorption est principalement transcellulaire car elle se fait contre le gradient électrochimique et les jonctions serrées semblent être imperméables au Ca^{2+} (Figure 1.8).

Cette réabsorption active est finement contrôlée par le système hormonal régulateur. La voie transcellulaire implique les mêmes familles de protéines de transport du Ca^{2+} que dans l'intestin. L'épithélium du tubule distal exprime des canaux TRPV (principalement TRPV5) en domaine apical par lesquels le Ca^{2+} pénètre dans le cytosol. Ce dernier est ensuite transporté par la calbindine D_{28k} puis extrudé par l'échangeur Na^+/Ca^{2+}, majoritairement NCX1, et la Ca-ATPase de la famille PMCA, majoritairement PMCA1b

(Hoenderop 2005, Yeun *et al.* 2012, Brini *et al.* 2013).

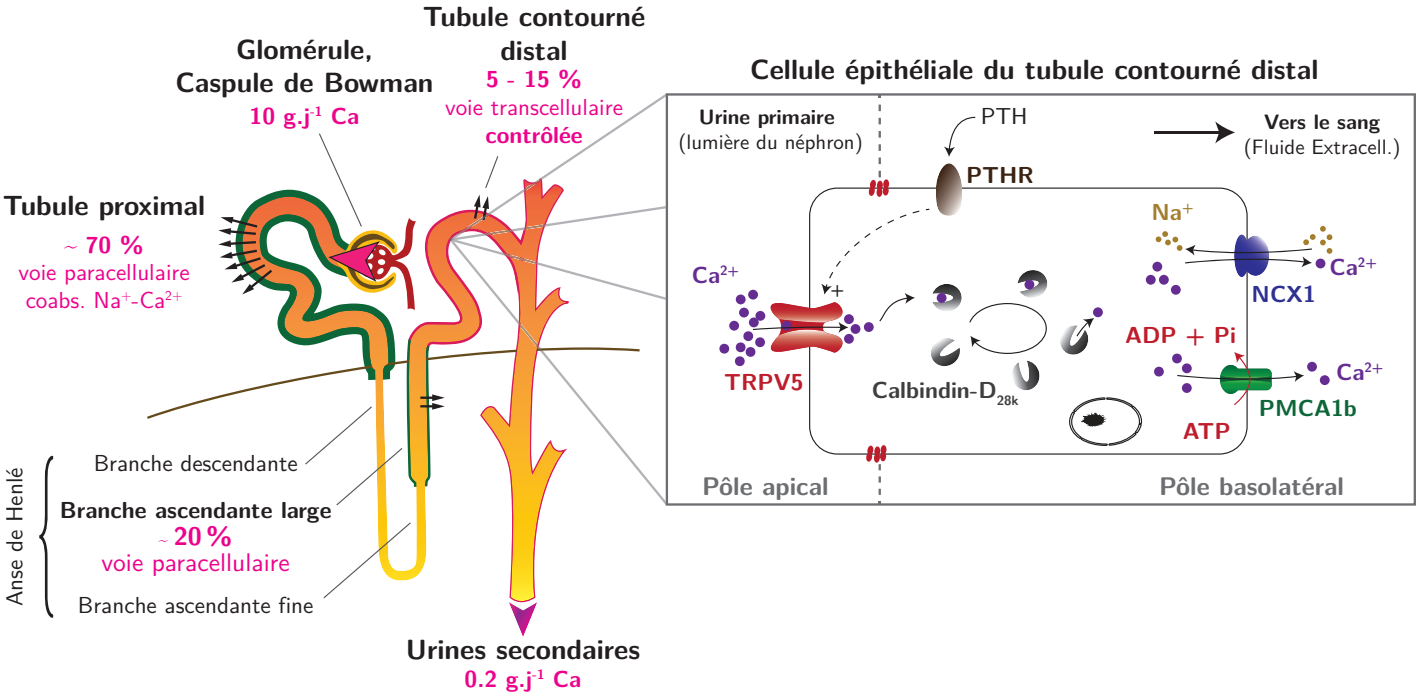

FIGURE 1.8 – **Modèle général de l'excrétion et de la réabsorption rénale du Ca^{2+} à l'échelle du néphron et par voie transcellulaire dans la cellule épithéliale du tubule distal.** General principle for Ca^{2+} renal excretion and reabsorption at the nephron scale together with the transcellular pathway of a distal tubule epithelial cell. (Hoenderop 2005, Yeun *et al.* 2012)

4 Régulation hormonale de l'homéostasie calcique

Les éléments clefs de l'homéostasie calcique sont

i) des détecteurs du Ca^{2+} libre : principalement le récepteur CaSR (Ca sensing receptor) ;

ii) des hormones régulant les entrées et sorties du Ca^{2+} de l'ECF ;

iii) des cellules rénales, intestinales et osseuses contrôlant le transport du Ca^{2+} vers l'intérieur ou l'extérieur du liquide extracellulaire.

Les **protéines membranaires CaSR**, de la famille des détecteurs de Ca^{2+}, sont des récepteurs couplés à des protéines G, et sont exprimées sur les membranes plasmiques des cellules de beaucoup, voire de la totalité, des tissus impliqués dans l'homéostasie calcique (Brown 2013). Cela concerne notamment les cellules principales de la parathyroïde, les cellules C de la thyroïde ainsi que divers types de cellules des reins, des intestins et de l'os.

La **parathormone (PTH)** est une protéine de 84 acides aminés synthétisée dans la parathyroïde, stockée dans des vésicules et sécrétée dans le sang. Elle est associée à un récepteur membranaire (PTH-R). La libération de PTH est stimulée par l'inactivation des CaSR au cours d'une hausse de la concentration en Ca^{2+} libre. L'inactivation de CaSR engendre à court terme la libération par exocytose de PTH, puis,

sur des périodes plus longues, la stimulation de l'expression de la PTH et de la prolifération des cellules principales de la parathyroïde.

La PTH a une action hypercalcémiante en stimulant la réabsorption rénale du Ca^{2+} dans le tubule distal et en augmentant le relargage rapide de Ca^{2+} immédiatement échangeable de l'os. Elle présente une action anabolique pour l'os lorsqu'elle est apportée à doses régulières et limitées, mais en excès prolongé son action devient catabolique pour l'os en stimulant l'activité ostéoclastique. La PTH agit également sur la phosphatémie en diminuant la réabsorption rénale des phosphates via l'inhibition de l'expression du transporteur NPT2a sur la membrane apicale des cellules du tubule proximal (Courbebaisse et Souberbielle 2011, Brown 2013).

La **Vitamine D**, ou cholécacliférol, provient de la diète (10 %) ou est synthétisée (90 %) à partir du 7-déhydrocholestérol dans la peau par l'action des UVB (290-315nm). La vitamine D3 est transportée dans le sang grâce aux protéines porteuses Vit D binding proteins (Vit D-BP) vers le foie, où celle-ci est hydroxylée, sans que ce processus soit régulé, et forme alors la 25OHD, ensuite relâchée dans le sang. Le **calcitriol** (1,25$(OH)_2D_3$), métabolite le plus actif de la vitamine D, est enfin formé par hydroxylation de la 25OHD dans les cellules du tubule proximal du rein. Cette étape d'activation est précisément régulée (*e.g.* Brown 2013). La synthèse de calcitriol est stimulée par la PTH, l'hypophosphatémie, l'hypercalcémie et inhibée par l'hyperphosphatémie, l'hypercalcémie et le calcitriol lui-même, effectuant ainsi une rétroaction négative sur sa propre synthèse (*e.g.* Brown 2013). Il est associé à un récepteur membranaire VDR notamment exprimé par les cellules de l'intestin et du rein, puis forme des complexes avec d'autres protéines cytosoliques qui se lient avec des éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) qui participent à la modulation de certains gènes.

Le 1,25$(OH)_2D_3$ stimule la libération de Ca^{2+} et de Pi par l'amplification de l'absorption intestinale et de la résorption osseuse. Il a pour effet de favoriser l'absorption intestinale de Ca2+, en stimulant l'expression des transporteurs transmembranaires (TRPV6, NCX1 et PMCA1b) et intracellulaires (calbindine D9k). Il stimule également l'absorption de phosphate par l'intermédiaire de co-transporteurs Na/P exprimés par les membranes apicales des entérocytes (NPT2b). Enfin, le calcitriol inhibe la sécrétion de PTH. Bien que son action la plus évidente soit centrée sur le maintien de l'homéostasie phosphocalcique, le calcitriol participe à un grand nombre d'autres actions endocrines, paracrines et autocrines non phosphocalciques (Courbebaisse et Souberbielle 2011).

Enfin, le **Ca^{2+} lui-même** participe à l'homéostasie et joue un rôle en partie assimilable à celui d'une hormone (Brown 2013). L'augmentation de la calcémie, après correction par les actions de la PTH et du calcitriol, entraîne la baisse de la réabsorption rénale dans le tubule distal, inhibe la sécrétion de calcitriol dans le tubule proximal, et enfin inhibe la sécrétion de PTH. En cas d'hypercalcémie, il stimulerait le recrutement et la prolifération de préostéoblastes, leur différenciation en ostéoblastes matures et donc la synthèse et minéralisation d'os neuf. En parallèle, il inhiberait la différenciation et l'activité des ostéoclastes,

probablement grâce à la présence de récepteurs CaSR sur ces cellules (Brown 2013).

La **phosphatémie** est également régulée mais tolère de plus grandes gammes de variations. Le rein est le principal organe impliqué dans sa régulation. Le squelette osseux joue également un rôle de stockage et le système régulateur met en jeu la PTH, le calcitriol ainsi que le Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) et Klotho (Long 2011, Brown 2013).

Une diminution de la calcémie ionisée induit l'inactivation de CaSR exprimés par les cellules principales de la parathyroïde, ce qui provoque une sécrétion aiguë de PTH dans le sang (Figure 1.9). Celle-ci stimule la libération rapide de Ca^{2+} osseux, probablement depuis des stocks de Ca^{2+} immédiatement échangeable des couches superficielles de l'os. Sur le plus long terme, la PTH stimule également la résorption osseuse par les ostéoclastes, qui expriment des récepteurs membranaires PTHR1 et inhibent la synthèse de collagène par les ostéoblastes. Par ailleurs, la PTH stimule la réabsorption rénale de Ca^{2+}, majoritairement par voie transcellulaire des tubules contournés distaux, entraînant la réduction de l'excrétion finale de Ca^{2+}. La PTH induit également une augmentation de la phosphaturie par réduction de la réabsorption de P_i dans le tubule proximal. Enfin, pour de longues expositions à la PTH (plusieurs heures), la synthèse et l'activité des 1-α-hydroxylases sont stimulées dans les tubules proximaux, catalysant la synthèse et la libération de calcitriol.

Une brève période d'hypocalcémie (moins de quelques heures) peut donc être corrigée par une réabsorption rénale accrue et une libération de Ca^{2+} de l'os. En cas d'hypocalcémie prolongée, la réponse peut impliquer une augmentation de l'absorption intestinale de Ca^{2+} et P_i stimulée par le calcitriol ainsi qu'une libération nette de Ca^{2+} et de P_i osseux.

Il existe cependant un ou plusieurs mécanismes indépendants du remodelage osseux, bien qu'encore mal contraints. L'os y aurait un rôle de tampon très réactif et de faible capacité, dont l'activité serait passive ou active, indépendante de la PTH ou encore, impliquerait des récepteurs CaSR (Marenzana *et al.* 2005, Brown 2013). Ainsi, l'os répondrait à des variations de calcémie ionisée par des flux de Ca^{2+} entrant ou sortant de l'os selon qu'il s'agisse d'une hyper- ou d'une hypocalcémie respectivement. Il pourrait s'agir d'une activité ostéolytique des ostéocytes et/ou de réponses passives et physico-chimiques à la variation de la calcémie (*e.g.* Bélanger 1969, Parfitt 2003, Marenzana *et al.* 2005, Teti et Zallone 2009, Peterson et Riggs 2010, Sansalone *et al.* 2013).

La réponse à l'hypercalcémie implique l'activation des récepteurs CaSR des cellules principales de la parathyroïde par l'arrêt de la sécrétion et la dégradation de la PTH. La baisse de la quantité de PTH circulant dans le sang entraîne l'augmentation de la réabsorption rénale, une baisse de l'absorption intestinale associée à une diminution de la quantité de calcitriol circulant et enfin une diminution de la libération de Ca^{2+} osseux. Chez certaines espèces, autres que l'homme, l'augmentation de la calcémie au-delà des valeurs nominales entraîne une sécrétion de calcitonine, hormone ayant pour effet de diminuer la résorption osseuse, mais la calcitonine ne semble cependant pas jouer un tel rôle chez l'humain (Brown 2013).

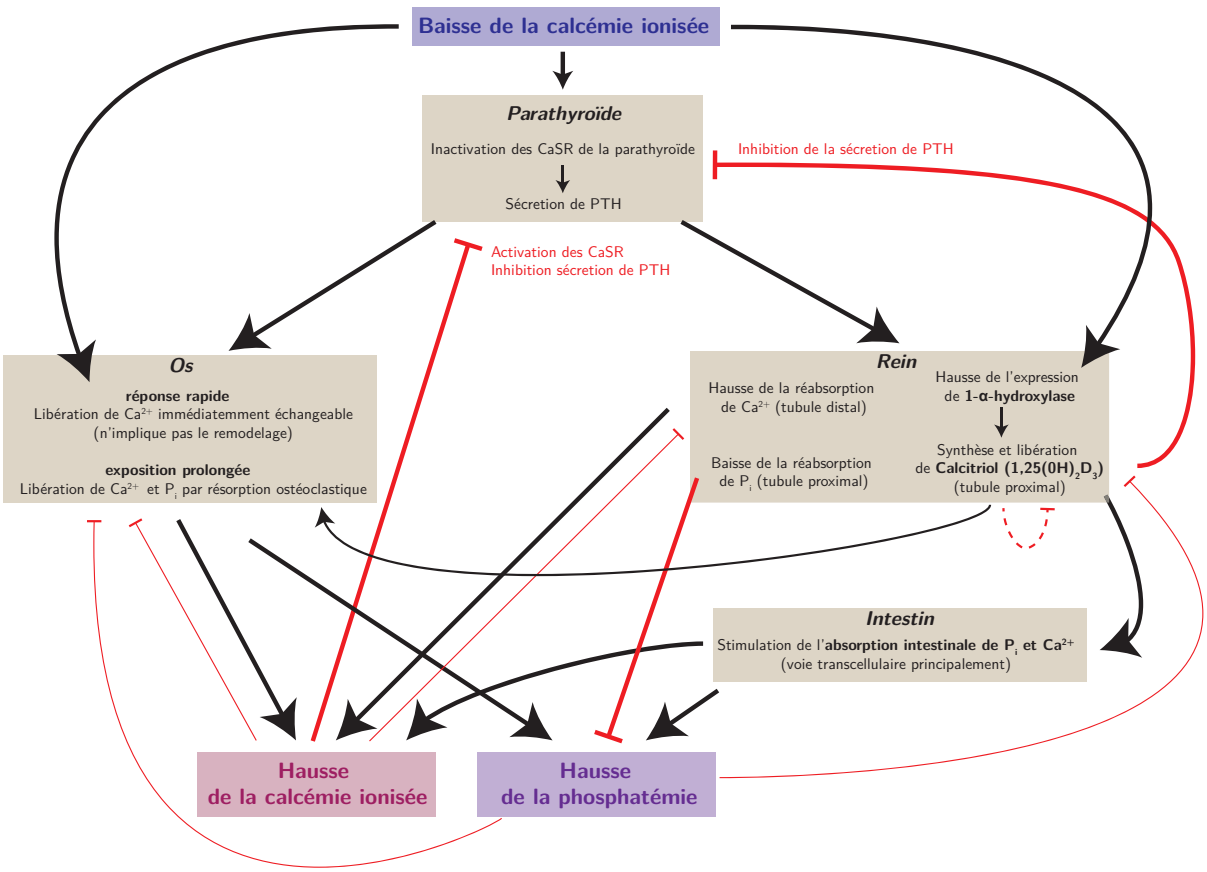

FIGURE 1.9 – **Principaux mécanismes hormonaux de réponse à une baisse de calcémie ionisée.** Les traits épais se rapportent aux interactions principales, les traits fins aux interactions secondaires. Les flèches noires se réfèrent à la stimulation d'un mécanisme, les flèches rouges à leur inhibition. **Main hormonal mecanisms involved in response to a drop in ionized calcemia.** Thick lines are for main interactions whereas fine ones are for secondary interactions. Black arrows correspond to an stimulating action and red ones refer to inhibiting effects. (Peterson et Riggs 2010, Courbebaisse et Souberbielle 2011, Brown 2013)

D Equilibres et déséquilibres calciques au cours de la vie et de la maladie

1 Cycles de vie

Au cours du développement et du vieillissement, les caractéristiques de l'homéostasie calcique évoluent.

L'absorption intestinale du Ca^{2+} change au cours des périodes critiques de la vie. Chez les nouveau-nés, l'absorption fractionnelle du Ca^{2+} peut atteindre 60 % du Ca^{2+} ingéré et est réalisée principalement par voie passive, puis la proportion de Ca^{2+} absorbé activement augmente avec l'âge du nourrisson (Guéguen et Pointillart 2000, Del Valle *et al.* 2011). La fraction de Ca^{2+} absorbé dépend alors grandement de la quantité de Ca^{2+} ingéré (Abrams 2010). Au cours de l'enfance, l'absorption fractionnelle de Ca^{2+} diminue avant d'augmenter à nouveau à la puberté, moment où le modelage osseux est intense (Del Valle *et al.* 2011). Chez les adultes, bien que dépendante de multiples facteurs, notamment du type d'alimentation, l'absorption moyenne du Ca^{2+} serait de l'ordre de 25 à 30 % (*e.g.* Hunt et Johnson 2007). L'absorption

fractionnelle de Ca^{2+} tend à décroître avec l'âge et après la ménopause chez la femme (Heaney *et al.* 1989, Nordin *et al.* 2004, Aloia *et al.* 2010). Il semblerait que cette diminution de l'absorption soit associée à une baisse de l'absorption active de Ca^{2+} (Bullamore *et al.* 1970, Alevizaki *et al.* 1973, Gallagher *et al.* 1979, Tsai *et al.* 1984, Eastell *et al.* 2009, Ebeling *et al.* 1996).

La masse osseuse varie également avec le développement et le vieillissement (Figure schématique 1.9).

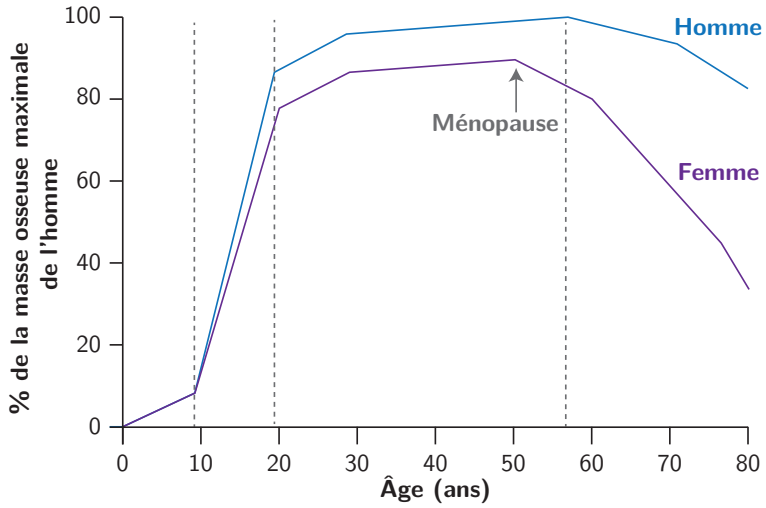

FIGURE 1.10 – **Evolutions schématiques des masses osseuses chez la femme et l'homme**, exprimées en pourcentage de la masse osseuse maximale atteinte par l'homme en fonction de l'âge. **Simplistic evolutions of bone masses in men and women**, expressed as the percentage of the men average peak bone mass as a function of age (yrs). (adapté de Heaney *et al.* (2001), Truswell (2017))

A la naissance, le nouveau-né possède environ 26 à 30 g de Ca, se trouvant en grande majorité dans le squelette. Au cours de l'allaitement, il en ingère environ 200 $mg.j^{-1}$ bien que cette quantité varie au cours des premiers mois et selon les individus. La rétention nette de Ca^{2+} chez le nouveau-né et au cours de la première année de croissance est de l'ordre de 70 ± 40 $mg.j^{-1}$, puis augmente relativement linéairement jusqu'à 9-10 ans (110 $mg.j^{-1}$) (Del Valle *et al.* 2011). La puberté correspond à une accélération majeure, où l'accrétion osseuse varie de 90 à 210 $mg.j^{-1}$ de Ca^{2+} en moyenne entre 9 et 18 ans (Vatanparast *et al.* 2010) et peut culminer à des valeurs de 300 à 400 $mg.j^{-1}$ au cours de phases de croissance intense (Bailey *et al.* 2000).

Après la puberté et au cours d'une grande partie du stade adulte, la résorption et la formation s'équilibrent globalement. La masse osseuse est consolidée et les besoins en Ca sont relativement constants. La masse osseuse maximale (PBM pour Peak Bone Mass) est atteinte au début de l'âge adulte (Bonjour *et al.* 1994, Heaney *et al.* 2001). Le Ca alors contenu dans l'os à maturité est de l'ordre de 1200 g chez la femme et de 1400 g chez l'homme (Ilich et Kerstetter 2000, Anderson 2001).

La perte osseuse liée à l'âge chez la femme et l'homme est due au découplage du remodelage, lorsque la résorption excède la formation osseuse. La frontière entre vieillissement et développement de pathologies

est floue. Les rôles et les interactions entre les facteurs génétiques, environnementaux, hormonaux de la perte osseuse ou de la genèse de pathologies osseuses sont encore discutés et au cœur de nombreuses recherches, alors que les effets de contre-mesures telles que la supplémentation en Ca et vitamine D sont débattus.

Chez la femme, bien qu'il existe une grande variabilité de la réponse osseuse à la ménopause, cette période marque en général le début d'une accélération du remodelage et d'une perte accrue de Ca^{2+} osseux, notamment due à la baisse des niveaux circulant d'oestrogènes (Riggs *et al.* 1998, Seeman 2003). Cela a pour effet d'abaisser la densité minérale osseuse. Il est par ailleurs possible que la chute des niveaux d'oestrogènes participe à une augmentation de la perte urinaire de Ca^{2+} à travers une réabsorption diminuée du Ca^{2+} des urines primaires (Nordin *et al.* 2004). La combinaison d'un remodelage accéléré et d'une densité minérale basse augmente le risque de fractures (Garnero *et al.* 1996). La perte osseuse dans la période de 7 à 10 ans autour de la ménopause peut s'étendre de 3 à 7 % de la masse initiale chaque année (Kenny et Prestwood 2000), et chez les femmes de plus 65 ans, cette perte ralentit et atteint 0.5 à 2 % par an (Greenspan *et al.* 1994). Chez l'homme de plus de 65 ans, la perte de masse osseuse est d'environ 1 à 2 % par an (Orwoll *et al.* 1990, Hannan *et al.* 1992).

Des apports pauvres en Ca chez la personne âgée peuvent également provoquer, par compensation, des hyperparathyroïdies secondaires qui participent à une augmentation des pertes osseuses. La réduction de la filtration glomérulaire liée à l'âge chez l'homme et la femme est un autre facteur affectant la conservation du Ca^{2+} par le rein (Goldschmied *et al.* 1975), ce qui peut également amener au développement d'une hyperparathyroïdie pouvant provoquer des pertes osseuses accentuées (Del Valle *et al.* 2011).

La grossesse et l'allaitement sont des périodes durant lesquelles l'homéostasie maternelle du Ca est adaptée (Figure 1.11).

La grossesse est globalement caractérisée par une consommation et une absorption accrues de Ca^{2+}, un remodelage osseux probablement intense, une excrétion urinaire plus intense et un flux actif de Ca^{2+} à travers le placenta et vers le fœtus, principalement concentré sur le dernier trimestre de la grossesse (Kovacs et Fuleihan 2006).

Au cours de la lactation, l'organisme de la mère est caractérisé par une résorption osseuse stimulée et amplifiée, une réabsorption rénale intensifiée et un flux important de Ca^{2+} vers le bébé, de l'ordre de 200 $mg.j^{-1}$ (Kovacs et Fuleihan 2006, Del Valle *et al.* 2011). La densité minérale osseuse maternelle peut alors décroître de 5 à 10 % au cours de 2 à 6 mois d'allaitement exclusif mais est généralement rétablie ensuite (Kalkwarf 1999).

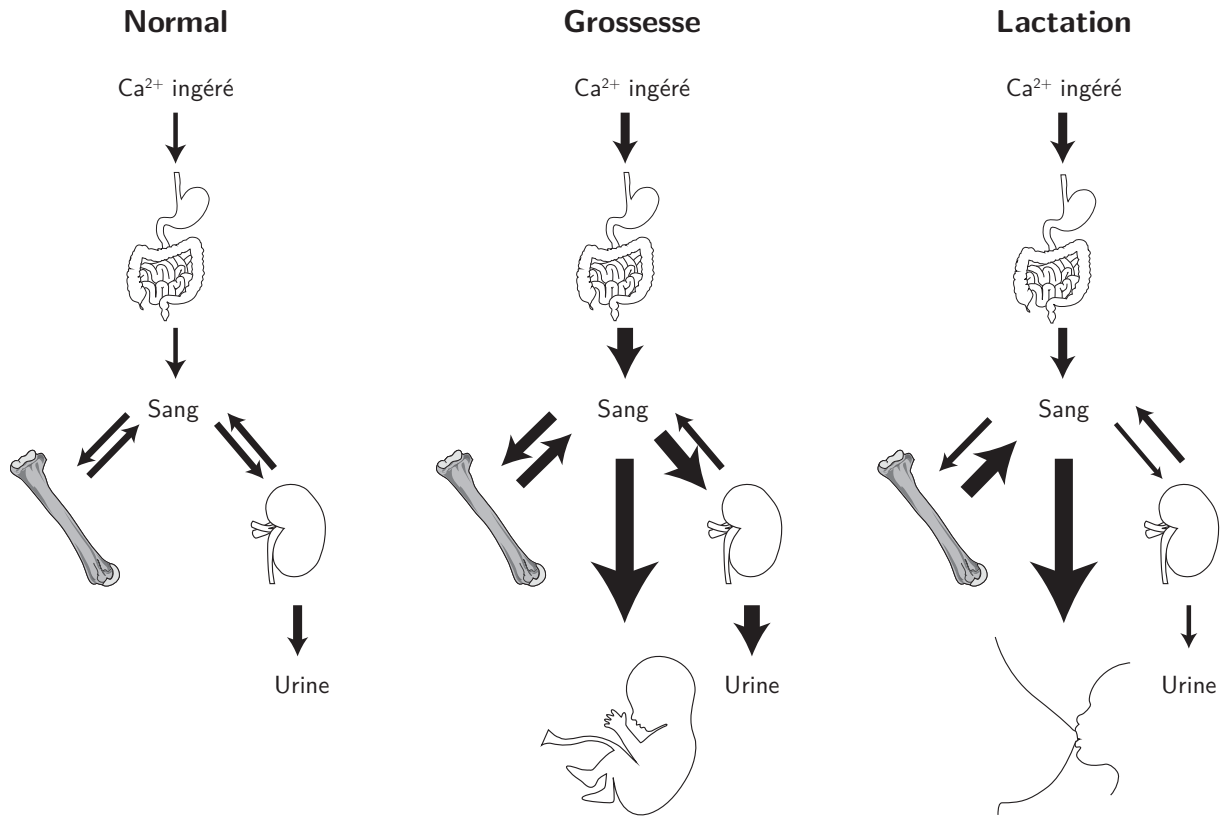

FIGURE 1.11 – **Adaptations de l'homéostasie calcique chez la femme enceinte et allaitante.** Les épaisseurs des flèches reflètent les changements des flux relativement à l'état normal. **Changes in calcium homeostasis in pregnang and lactating women.** Thickness of arrows reflects the changes in flux intensities relatively to the normal state. (adapté de Kovacs et Fuleihan (2006))

2 Situations physiologiques et pathologiques

En conditions extrêmes ou pathologiques, le système régulateur maintient la calcémie ionisée dans les gammes vitales mais équilibre les flux dérégulés par des mécanismes compensatoires dont les conséquences sont variables.

Les contraintes mécaniques jouent un rôle important dans le remodelage osseux, probablement à travers une sensibilité des ostéocytes aux contraintes mécaniques, bien que les mécanismes sous-jacents restent incertains et fassent encore l'objet de discussions (*e.g.* Pearson et Lieberman 2004). Les activités sportives favorisent dans une certaine gamme le maintien ou la formation d'os alors que l'inactivité, comme l'alitement, ou la microgravité induisent des pertes osseuses sévères, passant par un découplage entre résorption osseuse accrue et formation osseuse inhibée, ce qui peut amener des pertes osseuse pouvant atteindre 10 % de la masse osseuse initiale (*e.g.* Collet *et al.* 1997, Nagaraja et Risin 2013).

Le rachitisme est un trouble de la croissance osseuse chez le nouveau-né et l'enfant. Le cartilage de croissance n'est pas ou peu maturé et minéralisé à cause d'une activité ostéoclastique stimulée par la sécretion de PTH, généralement en réaction à de faibles apports de Ca^{2+} (et P_i). Ceci aboutit à des os

dans lesquels l'ostéoïde est peu ou pas minéralisé. Les os sont donc mous et flexibles et le malade peut subir des hypocalcémies graves. Cette maladie est provoquée par plusieurs facteurs parmi lesquels de faibles apports alimentaires en Ca^{2+}, P_i et en Vitamine D.

L'ostéomalacie est une maladie similaire caractérisée par une minéralisation déficiente de l'ostéoïde nouvellement déposé au cours du remodelage, ce qui cause le ramollissement de l'os. Elle est généralement due à des apports pauvres en Ca^{2+}, déclenchant des hyperparathyroïdies secondaires, une déminéralisation accrue et une formation osseuse réduite.

L'ostéoporose est un trouble du squelette osseux associé au vieillissement et caractérisé par une masse osseuse réduite et des perturbations de l'architecture osseuse. Le risque accru de fractures associé à la fragilité de l'os constitue la conséquence clinique majeure et la principale cause de souffrance, d'invalidité, de mort des patients ainsi qu'un coût social important. En 2013, l'Union Européenne comptait environ 22 millions de femmes et 5.5 millions d'hommes atteints d'ostéoporose (Hernlund *et al.* 2013).

La **déficience rénale chronique** (CKD pour Chronic Kidney Disease) peut également être associée à des perturbations majeures de l'homéostasie calcique comme les désordres minéraux et osseux (CKD-BMD pour CKD Bone and Mineral Disorders) (*e.g.* Pirklbauer et Mayer 2011, Shroff *et al.* 2013). Ces désordres incluent des résorptions osseuses accrues et des calcifications vasculaires augmentant les risques cardiaques. Bien que les mécanismes soient encore étudiés, des niveaux élevés de Ca^{2+} et P_i du sérum chez les patients dialysés atteints de CKD jouent par exemple un rôle prépondérant dans le déclenchement des calcifications de cellules musculaires lisses des parois de certains vaisseaux (*e.g.* Shroff *et al.* 2013).

En conclusion, le cycle du Ca dans l'organisme est intense et hautement régulé. Les flux de Ca entre les compartiments sont contrastés et changeants à des échelles de temps allant de la seconde à la vie de l'individu. Les transports de Ca sont souvent actifs et impliquent des franchissements d'épithéliums majeurs. Les mécanismes mettent en jeu une grande variété d'interactions avec des protéines et des phénomènes de diffusion. L'ensemble de ces caractéristiques biologiques font du Ca un élément d'intérêt pour l'étude de son cycle isotopique.

II Notions de géochimie des isotopes stables et isotopes du Ca

A Isotopes du Ca et notation "delta"

Les isotopes d'un élément possèdent le même nombre de protons mais diffèrent par leur nombre de neutrons. On les distingue donc par leurs masses atomiques. Selon leurs proportions de protons et de neutrons, les noyaux sont stables ou se décomposent par désintégration radioactive.

Les abondances naturelles des isotopes sont les proportions molaires de chaque isotope trouvé dans la nature. Les noyaux sont les produits de réactions nucléosynthétiques réalisées dans les étoiles : fusions thermonucléaires, captures neutroniques et désintégrations radioactives. Les abondances moyennes des isotopes trouvés sur Terre sont donc héritées de ces histoires nucléosynthétiques et sont dans certains cas modifiées par d'autres processus au cours de la formation du système solaire et de la Terre.

Dans la nature, le calcium possède six isotopes stables (ou de très grandes demi-vies) d'abondances variées (Tableau 1.2). Avec une abondance de 97%, le ^{40}Ca est l'isotope majeur. La composition en isotopes stables d'un matériau se rapporte aux abondances en tous les isotopes de cet élément.

TABLEAU 1.2 – **Masses atomiques et abondances naturelles moyennes des isotopes stables du Ca.** Les nombres entre parenthèses sont les incertitudes sur les derniers chiffres significatifs. **Atomic masses and natural mean abundances of Ca stable isotopes.** Uncertainties are given in parenthese for the last digits. (Gussone *et al.* 2016)

Isotope	Masses atomiques (u.m.a.)	Abondances (% molaire)
^{40}Ca	39.9625909 (2)	96.941(156)
^{42}Ca	41.958618 (1)	0.647(23)
^{43}Ca	42.958766 (2)	0.135(10)
^{44}Ca	43.955482 (2)	2.086(110)
^{46}Ca	45.95369 (2)	0.004(3)
^{48}Ca	47.9525228 (8)	0.187(21)

La mesure précise des abondances des isotopes d'un élément est complexe et ces abondances ne sont pas aisées à manipuler conceptuellement et mathématiquement. La géochimie des isotopes stables fait donc appel aux rapports des abondances molaires de deux isotopes d'un élément, dont les mesures précises sont plus simples et la manipulation mathématique plus aisée. Par convention, les isotopes légers sont la plupart du temps au dénominateur. J'utiliserai tout au long de ce manuscrit la notation *delta*. Pour le rapport d'abondances des deux isotopes du calcium ^{44}Ca et ^{42}Ca, il faut écrire par exemple :

$$\delta^{44/42}Ca\,(‰) = \left(\frac{(^{44}Ca/^{42}Ca)_{éch}}{(^{44}Ca/^{42}Ca)_{std}} - 1\right) \times 1000 \tag{1.1}$$

où ^{44}Ca et ^{42}Ca se réfèrent aux abondances naturelles de ces mêmes isotopes dans un échantillon (*éch*)

et un standard de référence (*std*).

De la même manière, pour les rapports $^{44}Ca/^{40}Ca$, nous écrivons :

$$\delta^{44/40}Ca\,(‰) = \left(\frac{(^{44}Ca/^{40}Ca)_{éch}}{(^{44}Ca/^{40}Ca)_{std}} - 1\right) \times 1000 \tag{1.2}$$

Ce calcul permet d'exprimer la déviation, normalisée à un matériau de composition isotopique de référence, et d'amplifier cette déviation qui est infime dans la nature, en la multipliant par un facteur 1000. La valeur d'un delta est donc donnée en unités "pour mille" (‰). Les standards utilisés pour exprimer les compositions en isotopes stables du Ca sont nombreux et sont décrits dans la partie I, aux chapitres 1 et 2.

Les géochimistes qualifient les compositions isotopiques de "lourdes" ou de "légères" pour désigner des valeurs "enrichies en isotopes lourds" ou "légers" respectivement, et ce toujours relativement à une composition de comparaison, celle d'un réservoir central par exemple ou bien d'un matériau de référence. Dans le cas particulier de la comparaison au standard de référence, des matériaux aux δ positifs peuvent être qualifiés d'enrichis en isotopes lourds relativement à ce standard, et inversement, des valeurs négatives de légères par rapport à ce même standard.

B Fractionnements isotopiques dépendants de la masse

Le fractionnement est une variation d'abondances isotopiques provoquée par une réaction chimique, physique ou nucléaire.

Les isotopes d'un même élément ont des propriétés physico-chimiques identiques au premier ordre mais leurs différences de masses leur confèrent des propriétés très légèrement différentes. Pour la plupart des éléments ayant plusieurs isotopes, les processus chimiques majeurs trient les isotopes d'un élément selon leurs masses, ce qui provoque des fractionnements isotopiques dépendants de la masse de l'isotope. Les masses des isotopes influencent les vitesses de réactions et les diffusivités des atomes et des molécules. Par ailleurs, elles affectent les fréquences de vibration des liaisons, ce qui a pour effet de modifier les énergies des liaisons et donc les constantes d'équilibre thermodynamique.

Il en résulte que l'amplitude du fractionnement entre deux isotopes augmente proportionnellement avec la différence de masse entre ces deux isotopes. Par exemple, les rapports $^{44}Ca/^{42}Ca$ varient à peu près deux fois plus que les rapports $^{43}Ca/^{42}Ca$ car la différence de masse entre ^{44}Ca et ^{42}Ca est à peu près deux fois plus grande ($m_{43} - m_{42} \simeq 2$) que celle entre ^{43}Ca et ^{42}Ca ($m_{43} - m_{42} \simeq 1$). Les valeurs de $\delta^{43/42}Ca$ représentés en fonction de celles de $\delta^{44/42}Ca$ se distribuent donc sur une droite de pente 0.5 environ. Cette droite est appelée droite de fractionnement dépendant de la masse. De la même manière, les valeurs de $\delta^{44/40}Ca$ s'élèveront à environ 2 fois celles de $\delta^{44/42}Ca$.

Les fractionnements d'isotopes stables et non radiogéniques qui s'éloignent d'une telle droite seront

qualifiés d'indépendants de la masse. Cependant, ils sont propres à des effets rares ou d'amplitudes limitées à l'exception de quelques éléments (p.ex. O, S et Hg) et des contextes physico-chimiques particuliers (Dauphas et Schauble 2016). La mesure d'un seul rapport isotopique de l'élément d'intérêt suffit donc pour étudier les fractionnements purement dépendants de la masse.

L'amplitude d'un fractionnement peut être définie par le facteur de fractionnement de la réaction. Le facteur de fractionnement est généralement désigné par le symbole α et est défini ainsi pour une réaction entre des réactifs A et des produits B et pour des rapports de deux isotopes i et j d'un élément X :

$$\alpha_{B-A} = \frac{({}^{i}X/{}^{j}X)_B}{({}^{i}X/{}^{j}X)_A} \tag{1.3}$$

Par définition du α et du δ, on peut noter pour un rapport $({}^{i}X/{}^{j}X)$ la relation suivante :

$$\alpha_{B-A} = \frac{\delta^{i/j}X_B + 1000}{\delta^{i/j}X_A + 1000} \tag{1.4}$$

Cette relation peut être approximée selon la relation :

$$1000\ln(\alpha_{B-A}) \simeq \delta^{i/j}X_B - \delta^{i/j}X_A \tag{1.5}$$

Fractionnements thermodynamiques La plupart des fractionnements thermodynamiques sont causés par la sensibilité des fréquences de vibration des molécules et des phases condensées à l'isotope impliqué dans la liaison. L'énergie d'une liaison entre deux atomes augmente avec la fréquence de vibration, qui elle-même dépend de $1/\sqrt{M}$ où M est la masse atomique de l'isotope impliqué. En conséquence, l'énergie globale du système est minimisée pour des fréquences de vibration basses et donc pour les isotopes les plus lourds de l'élément considéré. Les liaisons les plus rigides ont donc tendance à concentrer les isotopes les plus lourds, à l'équilibre thermodynamique (Bigeleisen et Mayer 1947, Urey 1947, Schauble 2004).

L'amplitude des fractionnements thermodynamiques est déterminée par un certain nombre de caractéristiques.

Les fractionnements isotopiques à l'équilibre décroissent généralement avec la température, et montrent souvent une dépendance en $1/T^2$. Pour de basses températures, les fractionnements à l'équilibre seront généralement plus marqués.

Les fractionnements isotopiques à l'équilibre augmentent approximativement avec la différence de masse relative entre les isotopes considérés, soit avec $\Delta m/m^2$, où Δm se rapporte à la différence des masses atomiques des deux isotopes lourd et léger, et où m est la masse atomique moyenne de l'élément (Schauble 2004). Ainsi, pour des différences de masse identiques entre les deux isotopes considérés, plus les éléments étudiés sont de masses atomiques moyennes élevées, moins les fractionnements seront marqués. La différence de masse relative entre les isotopes analysés de l'oxygène $({}^{18}O/{}^{16}O)$ est de 0.0069 alors que pour

les rapports $^{44}Ca/^{42}Ca$, elle est de 0.0011, soit environ 6 fois moins. D'après la dépendance en masse des fractionnements thermodynamiques, les rapports $^{44}Ca/^{42}Ca$ varieront donc environ 6 fois moins que les rapports $^{18}O/^{16}O$.

A l'équilibre, les isotopes lourds d'un élément sont concentrés dans les substances formant les liaisons les plus rigides. Ces liaisons rigides sont souvent fortes et courtes, retrouvées dans des contextes chimiques, entre autres, où les éléments d'intérêt sont présents sous leur forme la plus oxydée, où les liaisons sont les plus covalentes et où ils présentent des nombres de coordination les plus faibles.

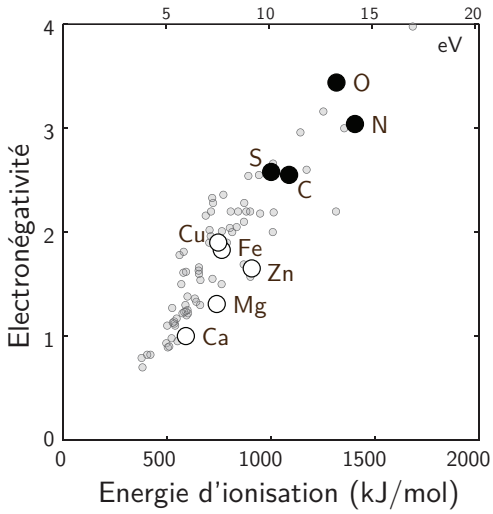

FIGURE 1.12 – **Electronégativité en fonction de l'énergie de première ionisation de métaux et de non-métaux.** La rigidité d'une liaison peut être approximée par la différence entre les électronégativités ou les énergies de première ionisation des atomes impliqués. **Electronegativity as a function of first ionization energy of metals and non-metals.** Stiffness of a bond can be roughly assessed by the differences in electronegativities or first ionization energies of involved elements. (Albarède *et al.* 2017)

Au premier ordre et particulièrement pour les métaux biologiquement utiles, la rigidité d'une liaison peut être rapportée à la tendance de l'atome liant (C, O, N ou S) à attirer à lui les électrons et à la facilité qu'un métal aura à perdre un électron (Albarède *et al.* 2017). Elle peut donc être prédite au premier ordre par la différence des électronégativités des deux atomes impliqués ou par les différences d'énergie de première ionisation de ces mêmes atomes (Fig. 1.12).

En conséquence, les fractionnements thermodynamiques les plus amples ont le plus de chance d'être observés à basse température, et entre des substances avec des états d'oxydation, des ligands, des configurations électroniques ou des nombres de coordination les plus différents (*e.g.* Schauble 2004).

Dans les systèmes biologiques, le Ca ne subit pas de changements d'état d'oxydation et établit principalement des liaisons ioniques. Cette relative homogénéité des états et interactions chimiques ne favorise *a priori* pas les fractionnements à l'équilibre. Bien qu'il existe d'autres causes possibles, les changements de coordinance sont avancés comme possible cause principale de fractionnements thermodynamiques en

biologie, bien qu'ils puissent être en partie occultés par des effets isotopiques cinétiques dans les systèmes biologiques (Schauble 2004, Gussone *et al.* 2005; 2006, Moynier et Fujii 2017).

Le lien entre les énergies de liaisons, les fréquences vibrationnelles et les fractionnements isotopiques a été théorisé par Bigeleisen et Mayer dans les années 1940 (Bigeleisen et Mayer 1947), qui ont démontré que les fractionnements isotopiques à l'équilibre peuvent être prédits par la mécanique quantique statistique. Cela a ouvert la voie à la prédiction des amplitudes des fractionnements à l'équilibre, grâce notamment aux calculs *ab initio* (*e.g.* Schauble 2004, Blanchard *et al.* 2017). Bien que la simulation des interactions entre grosses protéines et les isotopes des métaux étudiés reste compliquée aujourd'hui, il existe des méthodes de mécanique quantique, comme la DFT (Density Functional Theory), qui permettent de prédire les amplitudes des fractionnements à l'équilibre entre certains métaux et de plus petites molécules ou certains minéraux courants dans les contextes biologiques (Seo *et al.* 2007, Domagal-Goldman et Kubicki 2008, Domagal-Goldman *et al.* 2009, Black *et al.* 2011, Fujii et Albarède 2012, Fujii *et al.* 2013; 2014, Sherman 2013), et spécifiquement pour le Ca (Rustad *et al.* 2010, Colla *et al.* 2013, Moynier et Fujii 2017).

Fractionnements cinétiques Les fractionnements cinétiques désignent au sens large les processus physico-chimiques pour lesquels les réactions inverses sont inexistantes ou limitées. Les vitesses de réaction (comme les ruptures de liaison) et les vitesses de transport physique (comme la diffusion ou l'évaporation) dépendent de la masse de l'atome ou de la molécule. Lorsque le produit d'une telle réaction est isolé du réactif, le fractionnement cinétique est conservé (Schauble 2004, Richter *et al.* 2009, Eiler *et al.* 2014, Watkins *et al.* 2017). Les fractionnements cinétiques induits par des réactions de ruptures de liaison sont dues à des différences d'énergie d'activation entre isotopes. Les fractionnements cinétiques provoqués par des processus de transport physique peuvent être expliqués par des différences de vitesses de translation ou de diffusion dans une phase condensée. En général, les isotopes légers sont favorisés au cours d'une réaction dominée par des fractionnements cinétiques. Il est probable que ces effets participent aux fractionnements isotopiques induits biologiquement (Gussone *et al.* 2003) mais cela reste discuté.

III Etat de l'art de la physiologie isotopique du Ca

Les isotopes dits traditionnels (C, H, O, N, S) se distinguent des non-traditionnels (*e.g.* Li, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Ti) principalement pour des raisons analytiques. En effet, les mesures de rapports d'isotopes stables de ces éléments légers ont été développées au début du XXe siècle et sont majoritairement réalisées à l'aide de spectromètres de masse à source gazeuse. Les amplitudes des fractionnements de ces systèmes isotopiques sont importantes, principalement car ce sont des éléments légers et également parce qu'ils peuvent établir des liaisons covalentes contrairement à la plupart des isotopes non-traditionnels (Teng *et al.* 2017). L'étude des rapports d'isotopes traditionnels s'est rapidement démocratisée et répandue dans un grand nombre de domaines de recherche, dont la biologie, la nutrition, la (paléo-)écologie, la (paléo-)climatologie ou la paléontologie.

La plupart des rapports d'isotopes stables dits non-traditionnels (*e.g.* Li, Mg, Cu, Fe, Zn) ont connu une démocratisation importante dans les années 1990 et 2000 avec le développement majeur des spectromètres de masse à plasma à couplage inductif et multicollecteurs (MC-ICP-MS pour Multiple Collectors Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) (Halliday *et al.* 1995, Maréchal *et al.* 1999).

Contrairement à la majorité des isotopes stables non-traditionnels, la mesure des rapports isotopiques du Ca a d'abord été développée sur spectromètre de masse à thermo-ionisation (TIMS pour Thermo-Ionization Mass Spectrometer) (Russell *et al.* 1978) et les premières études des isotopes du Ca chez les vertébrés ont été réalisées par TIMS (Skulan *et al.* 1997, Skulan et DePaolo 1999, Clementz *et al.* 2003). Les mesures de ces rapports par MC-ICP-MS se sont développées dans les années 2000 (Halicz *et al.* 1999, Wieser *et al.* 2004), et ne se sont vraiment démocratisées à l'étude des vertébrés que dans les années 2010 (Chu *et al.* 2006, Hirata *et al.* 2008, Reynard *et al.* 2010; 2011b; 2013, Morgan *et al.* 2011; 2012a, Gordon *et al.* 2014, Channon *et al.* 2015).

La fiabilité des mesures des rapports isotopiques du Ca par MC-ICP-MS dépend d'un certain nombre de paramètres, dont la capacité à limiter les effets des matrices chimiques des échantillons et à s'affranchir des interférences isobares et polyatomiques. Ceci nécessite le développement et l'adaptation de protocoles d'analyse permettant la mesure juste et suffisamment précise des rapports isotopiques du Ca de matériaux aussi chimiquement divers que les carbonates, les phosphates des tissus minéralisés, les fluides corporels et les tissus mous.

A Les débuts

L'intérêt pour les fractionnements biologiques des isotopes du Ca est récent. La publication en 1978 de l'article *Ca isotope fractionation on the Earth and other solar system materials*, par Russell et collaborateurs, jette les bases de la méthode de mesure des compositions isotopiques du Ca par TIMS, adaptée et utilisée depuis (Russell *et al.* 1978). Malgré une première estimation dans cet article de la variabilité naturelle des

abondances isotopiques du Ca, il faut attendre 1997 (Skulan *et al.* 1997) pour que la variabilité induite par les organismes vivants, y compris les vertébrés, soit estimée plus systématiquement. Skulan *et al.* (1997) démontrent que les fractionnements des isotopes du Ca sur terre sont dominés par les effets biologiques. Les compositions des roches volcaniques et sédimentaires analysées n'excèdent pas une variabilité de 0.20 ‰ ($\delta^{44/42}Ca$), exception faite de l'eau de mer, dont la composition est significativement enrichie en isotopes lourds. *A contrario*, les tissus biologiques minéralisés de vertébrés et d'invertébrés analysés varient dans une gamme de 1.5 à 2 ‰ ($\delta^{44/42}Ca$). Cette tendance a été confirmée depuis, et une compilation de données des matériaux terrestres actuels démontre que la variabilité naturelle des tissus végétaux et animaux est deux à trois fois plus marquée que pour les matériaux non biologiques (Figure 1.13). Les auteurs remarquent que les os de vertébrés sont caractérisés par des compositions particulièrement appauvries en isotopes lourds relativement au Ca de l'environnement. Les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des tissus minéralisés d'organismes marins semblent être influencées par la position de l'organisme dans la chaîne trophique (Figure 1.15).

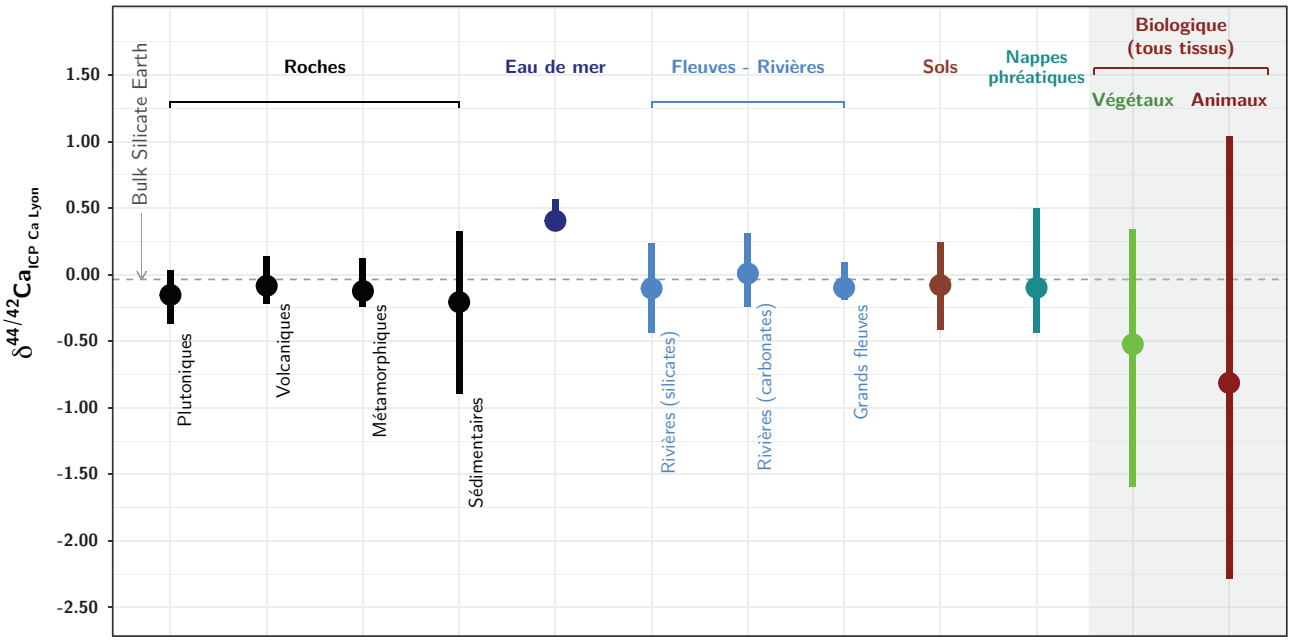

FIGURE 1.13 – **Gammes de variations et moyennes des compositions isotopiques en Ca ($\delta^{44/42}Ca$, en ‰ relativement à l'ICP Ca Lyon) dans les principaux réservoirs de surface et dans les tissus biologiques végétaux et animaux.** *Bulk Silicate Earth* correspond à la composition isotopique moyenne estimée de la terre silicatée (Compilation adaptée de Tipper *et al.* (2016), complétée par des données de Heuser et Eisenhauer (2010), Tacail *et al.* (2017b) et convertie selon la méthode décrite en Chapitre 4). **Ranges of variation and mean Ca isotope compositions ($\delta^{44/42}Ca$, ‰ relatively to ICP Ca Lyon) in main Earth surface reservoirs and in biological materials from plants and animals.** *Bulk Silicate Earth* is indicated with the dotted grey line (Compilation adapted from Tipper *et al.* (2016), completed with data from Heuser et Eisenhauer (2010), Tacail *et al.* (2017b) and converted using method described in Chapter 4).

En 1999, Skulan et DePaolo (1999) publient des analyses de tissus mous, de sang et d'os de 4 vertébrés

de classes et d'écologies diverses : un mammifère continental (*Equus caballus*, cheval), un mammifère marin (*Callorhinus ursinus*, otarie), un oiseau (*Gallus gallus domesticus*, poule) et un poisson téléostéen (sous famille des *Epinephelinae*, "mérou"). Malgré la diversité des classes représentées (mammifères, oiseaux et actinoptérygiens), les auteurs constatent que l'os est systématiquement appauvri en isotopes lourds, avec un écart entre alimentation et os très conservé, de l'ordre de -0.65 ‰ ($\delta^{44/42}Ca$) (Figure 1.14.A.). Les fluides et tissus mous analysés semblent être variables mais systématiquement enrichis en isotopes lourds par rapport à l'os. L'hypothèse est alors faite que l'os acquiert cette composition extrême à l'étape de la minéralisation uniquement, et que les fluides et tissus mous reflètent en moyenne l'alimentation mais que les temps de résidence très courts du Ca dans les fluides et tissus mous sont la cause de la variabilité (Figure 1.14.B.).

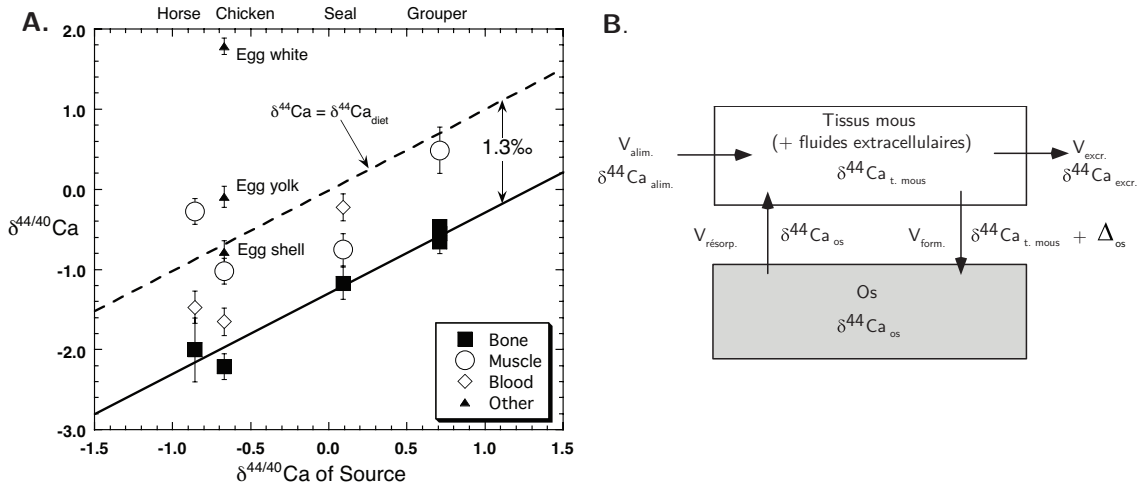

FIGURE 1.14 – **A. Valeurs de $\delta^{44/40}Ca$ de tissus de vertébrés variés en fonction de la valeur estimée de $\delta^{44/40}Ca$ de leur alimentation** (Skulan et DePaolo 1999). Les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sont exprimées relativement au carbonate de Ca standard décrit dans Skulan *et al.* (1997). Les résultats montrent une différence constante de $\delta^{44/40}Ca$ entre l'alimentation et l'os de -1.3 ‰ en moyenne, soit une différence de -0.65 ‰ en $\delta^{44/42}Ca$. **B. Modèle de boîtes proposé par Skulan et DePaolo (1999)**. Les flux V décrivent les transports de Ca alimentaire (alim.), de formation osseuse (form.), de résorption osseuse (résorp.) et d'excrétion (excr.). Les $\delta^{44}Ca$ désignent les compositions isotopiques des différents réservoirs et flux, et le Δ_{os} désigne le fractionnement à la minéralisation (-1.3 ‰ en $\delta^{44/40}Ca$).
A. $\delta^{44/40}Ca$ values of various vertebrate tissues as a fonction of estimated diet $\delta^{44/40}Ca$ (Skulan et DePaolo 1999). $\delta^{44/40}Ca$ values are expressed relatively to the Ca carbonate standard described in Skulan *et al.* (1997). Results display a constant offset between $\delta^{44/40}Ca$ values of diet and bone of -1.3 ‰ in average, corresponding to -0.65 ‰ when expressed using $\delta^{44/42}Ca$. **B. Box model proposed by Skulan et DePaolo (1999).** *V* describe Ca fluxes from diet (alim.), bone formation (form.), bone resorption (résorp.) and excretion (excr.). The $\delta^{44}Ca$ values refer to isotope compositions of reservoirs and fluxes and the Δ_{os} to the fractionation occuring during mineralization (-1.3 ‰ using $\delta^{44/40}Ca$).

De ces deux études sortent deux axes de recherches majeurs que les études publiées depuis se sont attachées à développer.

1. Ils confirment l'existence de processus physiologiques responsables d'un effet isotopique reproduit à travers la chaîne trophique. Ils dégagent alors un axe de recherche fondé sur l'existence d'un effet trophique isotopique (Figure 1.15). Le postulat suivant est alors posé : les mécanismes biologiques responsables des fractionnements isotopiques du Ca sont partagés entre les vertébrés, et les relations trophiques au sein d'un écosystème structurent les compositions isotopiques du Ca de ces organismes.

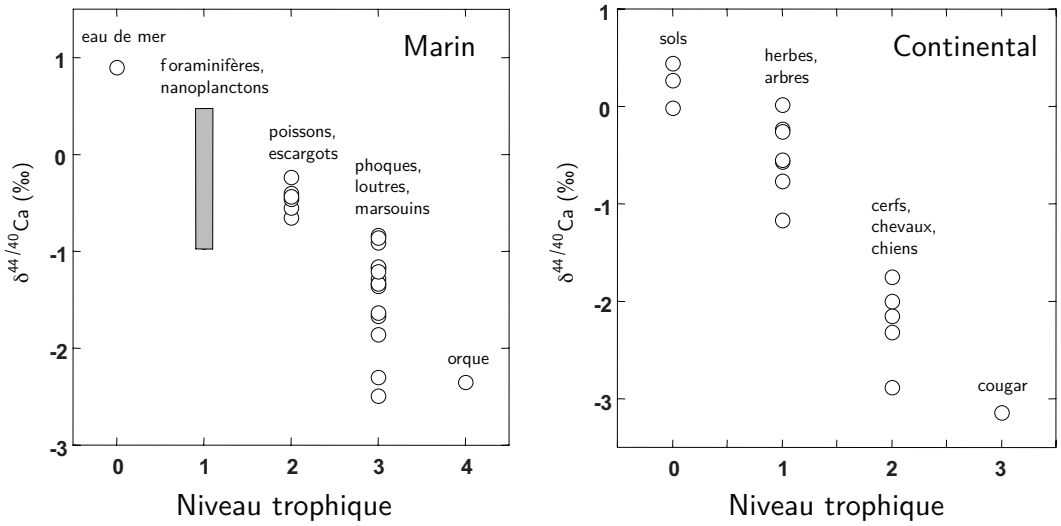

FIGURE 1.15 – **Compositions isotopiques du Ca en fonction du niveau trophique en milieux marins (gauche) et continentaux (droite)** (adapté de DePaolo (2004), données provenant de Skulan *et al.* (1997), Skulan et DePaolo (1999), Skulan (1999)). Les compositions sont données en $\delta^{44/40}Ca$ (‰) relativement au carbonate de Ca standard utilisé par Skulan *et al.* (1997). **Ca isotope compositions as a function of trophic level in marine (left) and continental (right) environments** (adapted from DePaolo (2004), data stem from Skulan *et al.* (1997), Skulan et DePaolo (1999), Skulan (1999)). Isotope compositions are given as $\delta^{44/40}Ca$ values (‰) relatively to Ca carbonate standard described in Skulan *et al.* (1997).

2. La composition particulièrement appauvrie en isotopes lourds de l'os, par opposition à l'alimentation, et par opposition putative aux tissus mous, ouvre la voie à l'étude de la dynamique osseuse : il est proposé, selon le modèle conceptuel et mathématique qu'ils établissent, que les déséquilibres entre les processus de minéralisation et de déminéralisation de l'os (remodelage) influenceraient les compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés et des tissus mous. Ainsi, une minéralisation accrue de l'os, illustrée par la croissance osseuse, induirait une augmentation significative des rapports isotopiques $^{44}Ca/^{42}Ca$ de l'os et des tissus mous, et à l'inverse, une déminéralisation osseuse accrue provoquerait une dérive des $\delta^{44/42}Ca$ vers des valeurs plus négatives. Il est alors proposé que le suivi de l'évolution des compositions en isotopes du Ca des urines ou du sang permettrait d'apprécier la balance calcique de l'organisme, principalement déterminée par le rapport entre perte et gain de masse osseuse. De telles prédictions jettent les fondements d'un axe de recherche ayant donné lieu à plusieurs études depuis.

B Alimentation et consommation de lait

En 2006, Chu *et al.* (2006) démontrent que le lait des mammifères présente une composition isotopique systématiquement appauvrie relativement à l'alimentation de l'organisme, avec une différence de -0.50 à -0.60 ‰ ($\delta^{44/42}Ca$) entre l'alimentation et le lait, chez la brebis, la vache et l'humain. Ainsi, les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ décroissent depuis l'alimentation des herbivores jusqu'à leurs os et leur lait, et diminue encore depuis l'animal jusqu'au lait humain (Figure 1.16). Les auteurs confirment donc dans cette étude que les compositions isotopiques du Ca sont influencées par l'alimentation et ils suggèrent que les isotopes du Ca pourraient constituer un outil permettant d'estimer la proportion de produits laitiers consommés par l'individu dont l'os est analysé.

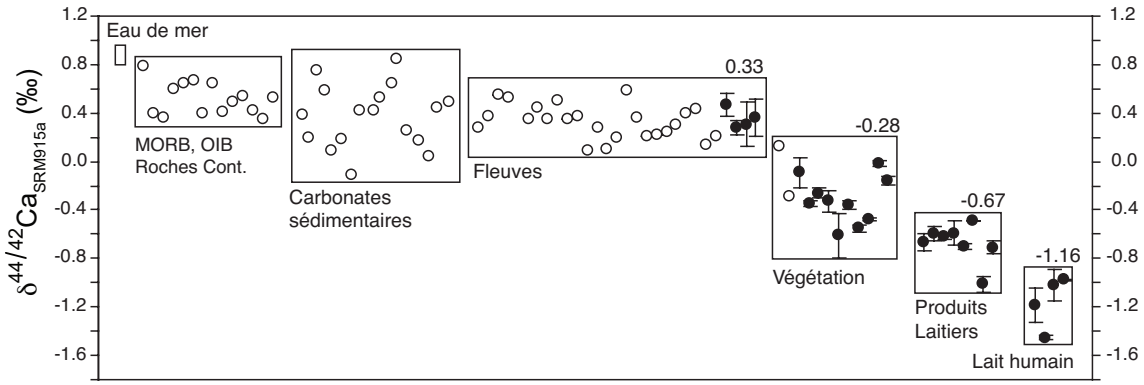

FIGURE 1.16 – **Compilation des données de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *SRM915a*) des réservoirs de surface, de la végétation, des produits laitiers et de laits humains. Compilated $\delta^{44/42}Ca$ values (‰, rel. to *SRM915a*) for surface reservoirs, vegetation, dairy products and human milk.** (adapté de Chu *et al.* (2006))

L'intérêt pour les reconstructions des pratiques alimentaires passées est grand, particulièrement en ce qui concerne l'utilisation croissante de produits animaux pour l'alimentation au cours des périodes de sédentarisation comme au néolithique (*e.g.* Vigne et Helmer 2007, Evershed *et al.* 2008, Salque *et al.* 2012). Ce constat a amené à la publication de trois études visant à estimer l'impact de la consommation de produits laitiers sur la composition isotopique de l'os (Reynard *et al.* 2010; 2011b; 2013).

Ainsi, en analysant les restes osseux d'humains et des faunes associées de plusieurs sites archéologiques (épipaléolithique, mésolithique, néolithique, âge du fer), il a été démontré que les os humains présentent des compositions appauvries en isotopes lourds relativement à la faune dans 4 sites sur les 5 étudiés, avec des différences de l'ordre de -0.20 à -0.40 ‰ (Reynard *et al.* 2010). Ceci validerait l'existence d'un effet trophique, mais les auteurs concluent que ces différences ne peuvent être attribuées à la consommation de produits laitiers animaux, cette observation étant vraie pour des populations prénéolithiques, soit avant la domestication de l'animal. Un dimorphisme sexuel isotopique a été suggéré chez le mouton actuel, les femelles présentant des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ supérieures à celles des mâles, ce qui pourrait été attribué à

la grossesse ou à la lactation (Reynard *et al.* 2010). Enfin, une étude visant à estimer l'influence de la consommation de lait humain a échoué à mettre en évidence un effet significatif sur les os d'individus d'âge croissant provenant d'un site néolithique et d'un site historique des XVIIIème et XIXème siècles (Reynard *et al.* 2013).

Les auteurs de ces études concluent que les rapports isotopiques du Ca ne permettent probablement pas d'estimer la consommation de produits laitiers animaux dans l'os car la variabilité physiologique serait trop importante. Ils estiment également que le potentiel des isotopes du Ca des os comme traceurs de la consommation de lait maternel, et donc comme outil d'étude du sevrage, n'est pas suffisant car probablement trop brouillé par les effets du métabolisme propre de chaque individu.

C Effets trophiques et écologies des vertébrés

L'étude des régimes alimentaires et des relations trophiques entre espèces vivantes est un aspect fondamental de l'écologie des écosystèmes et le niveau trophique est une des premières données récoltées pour ces types d'étude. Les relations trophiques déterminent la structure et la dynamique des écosystèmes et les applications de la compréhension des relations trophiques sont nombreuses (Elton 1927, Polis et Strong 1996, Pauly *et al.* 1998). Par ailleurs, l'estimation du niveau trophique, qui mesure le nombre moyen d'intermédiaires entre espèces basales et les espèces d'intérêt, aide à définir leurs rôles au sein de l'écosystème. C'est pourquoi l'intérêt pour le développement d'outils isotopiques de détermination des positions trophiques est grand – dans les écosystèmes actuels et passés. Les rapports isotopiques de l'azote ($\delta^{15}N$) et du carbone ($\delta^{13}C$) enregistrent des informations trophiques et occupent des places centrales en écologie et en archéologie (Deniro et Epstein 1981) et d'autres systèmes isotopiques semblent être prometteurs : $\delta^{26}Mg$ (Martin *et al.* 2014a;b), $\delta^{88}Sr$ (Knudson *et al.* 2010), ou $\delta^{66}Zn$ (Jaouen *et al.* 2016).

La littérature concernant les composantes trophiques des compositions isotopiques du Ca est limitée. A la suite des premiers travaux (Skulan *et al.* 1997, Skulan et DePaolo 1999), trois études se sont attachées à évaluer le potentiel des isotopes du Ca pour estimer les relations trophiques entre espèces de vertébrés au sein d'écosystèmes actuels et passés, continentaux et marins.

Clementz *et al.* (2003) explorent la relation entre les niveaux trophiques de mammifères marins actuels et fossiles et la composition isotopique du Ca de leurs os. Les auteurs concluent qu'une information trophique est probablement enregistrée par les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ et qu'il est possible de distinguer les mammifères marins herbivores et malacophages (consommateurs de mollusques) des mammifères marins carnivores, de niveaux trophiques supérieurs.

Comme décrit précédemment, Chu *et al.* (2006) démontrent que l'alimentation contrôle en grande partie la composition de l'os, tandis que le contexte géologique et l'environnement importent peu en milieu continental.

Heuser *et al.* (2011) rapportent les résultats d'une étude portant sur les dents et les os de reptiles et d'oiseaux actuels, et de dinosaures de niveaux trophiques variés. Ils suggèrent un effet trophique sur les compositions isotopiques de ces assemblages bien que cet effet soit limité. Ils proposent que le fractionnement marqué chez les carnivores est dû à la consommation d'os, dont une fraction limitée, 1 % d'os dans l'alimentation, suffirait à expliquer un effet trophique isotopique observé significatif, de l'ordre -0.50 ‰.

Enfin, Melin *et al.* (2014) présentent des analyses de $\delta^{44/40}Ca$ de deux assemblages d'os de mammifères continentaux actuels de niveaux trophiques variés. Ils suggèrent que les informations trophiques sont portées par le $\delta^{44/40}Ca$ des carnivores par opposition aux omnivores, insectivores et herbivores. Cependant le $\delta^{44/40}Ca$ ne permettrait pas de discriminer avec précision les groupes autres que carnivores. Les auteurs soulignent alors l'intérêt de combiner les mesures de $\delta^{44/40}Ca$ à celles de $\delta^{13}C$ dont les informations sont complémentaires, notamment en ce qui concerne les types de végétaux dont les espèces dépendent.

D Suivi dynamique de la balance osseuse

D'après les premières études (Skulan et DePaolo 1999), les isotopes du Ca permettraient le suivi dynamique des flux de Ca entrant et sortant de l'os. Les mécanismes physiologiques responsables de déséquilibres osseux sont encore mal compris, l'étiologie et l'épidémiologie des dysfonctionnements et des maladies osseuses comme l'ostéoporose étant encore au cœur de nombreuses études. Il existe par ailleurs un besoin de biomarqueurs permettant de suivre de manière continue la perte osseuse.

Au cours de la quinzaine d'années qui a suivi l'article de Skulan et DePaolo (1999), cinq études ont été publiées visant à estimer le potentiel des isotopes du Ca comme traceurs de la perte osseuse (Skulan *et al.* 2007, Heuser et Eisenhauer 2010, Morgan *et al.* 2012a, Gordon *et al.* 2014, Channon *et al.* 2015).

Parmi ces études, deux ont eu pour principe d'analyser les compositions isotopiques du Ca des urines de sujets humains sains soumis à deux expériences d'alitement de 13 semaines (Skulan *et al.* 2007) et 30 jours (Morgan *et al.* 2012a). Ces études ont permis de démontrer que, conformément à la théorie énoncée par Skulan et DePaolo (1999), la perte osseuse induite par l'alitement prolongé provoque une dérive des rapports isotopiques du Ca des urines vers des valeurs appauvries en isotopes lourds, de l'ordre de - 0.30 ‰ ($\delta^{44/42}Ca$).

Dans le cas de la première étude (Skulan *et al.* 2007), en plus du groupe témoin (n = 4), deux groupes de sujets étaient soumis à des contre-mesures, visant à terme à contrecarrer la perte osseuse au cours des vols spatiaux prolongés. Un des groupes pratiquait des exercices physiques résistifs (n = 3) et le second suivait un traitement d'alendronate, un médicament limitant la résorption osseuse (n = 3). Contrairement au groupe témoin, les urines de ces deux groupes ne présentent pas de déviation significative des compositions isotopiques du Ca vers un appauvrissement en isotopes lourds et le groupe traité par alendronate semble indiquer une hausse des rapports isotopiques du Ca. Les évolutions des rapports isotopiques du Ca sont

alors comparées à la densité minérale osseuse (DMO ou BMD pour Bone Mineral Density) du col fémoral et du rachis lombaire, qui est une méthode de diagnostic de l'équilibre osseux. Il est démontré que les rapports isotopiques tendent à suivre les variations de DMO du col du fémur et du rachis lombaire. Ainsi, le groupe témoin est caractérisé par une baisse des deux DMO mesurées, le groupe traité à l'alendronate est caractérisé par une hausse des DMO mesurées et le groupe ayant pratiqué de l'exercice résistif présente une hausse des DMO mesurées bien que moins marquée que pour l'alendronate.

Les résultats de la seconde étude (Morgan *et al.* 2012a), portant sur les urines de sujets soumis à une expérience d'alitement plus courte (30 jours) et sans contremesures, démontrent également une coïncidence de la perte osseuse et de la dérive des rapports $^{44}Ca/^{42}Ca$ des urines vers des valeurs appauvries (Figure 1.17). Les valeurs des $\delta^{44/42}Ca$ évoluent conjointement avec le biomarqueur de la résorption osseuse qu'est NTx (N-télopeptide), alors que les valeurs de BASP (Bone-specific alkaline phosphatase), biomarqueur de la formation osseuse, ne montrent pas de variations significatives. De plus, la réponse des compositions isotopiques des urines à la perte osseuse provoquée semble précéder celle des NTX. Après avoir discuté d'un modèle mathématique de cette perte osseuse, en prenant en considération les effets isotopiques induits par les reins, les auteurs proposent donc que les isotopes du Ca pourraient constituer un biomarqueur spécifique de la perte osseuse et non-invasif, pouvant être utilisé pour le développement de traitements potentiels des maladies du métabolisme osseux, l'étude fondamentale de la dynamique osseuse rapide, et comme outil de diagnostic et de suivi médical.

La relation entre compostions isotopiques des urines et du sang a été abordée par deux études. Heuser et Eisenhauer (2010) suivent l'évolution normale des $\delta^{44/42}Ca$ d'urines de deux individus de statuts physiologiques très différents durant 4 à 7 jours : un jeune garçon sain de 4 ans et une femme de 63 ans atteinte d'ostéoporose. Ils constatent que les compositions isotopiques du Ca des urines de la femme ostéoporotique sont nettement appauvries en isotopes lourds relativement au garçon, d'environ -0.50 ‰ ($\delta^{44/42}Ca$). L'étude suggère que cette différence est explicable par les différences d'équilibres osseux entre les deux individus. Le jeune garçon possède un squelette osseux en croissance, ce qui participerait à une augmentation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des os et de tissus mous. A l'inverse, la femme ostéoporotique perd de la masse osseuse ce qui induirait une diminution des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de l'os et donc des tissus mous. Les auteurs estiment indirectement que les urines sont enrichies en isotopes lourds d'environ 1 ‰ ($\delta^{44/42}Ca$) relativement au sang sur l'hypothèse que le sang présente une composition identique à l'alimentation. En discutant de la relation entre $\delta^{44/42}Ca$ et concentration en Ca des urines, il est avancé que les urines sont enrichies en isotopes lourds au cours de la réabsorption du Ca des urines primaires dans le néphron, et que le fractionnement résultant est le produit d'une distillation de Rayleigh.

Channon *et al.* (2015) complètent le suivi de la perte osseuse au cours de l'expérience d'alitement de 30 jours (Morgan *et al.* 2012a) par l'analyse du sang des mêmes individus. Malgré un échantillonnage plus disparate dans le temps, le constat est que les compositions du sang dérivent également vers des valeurs

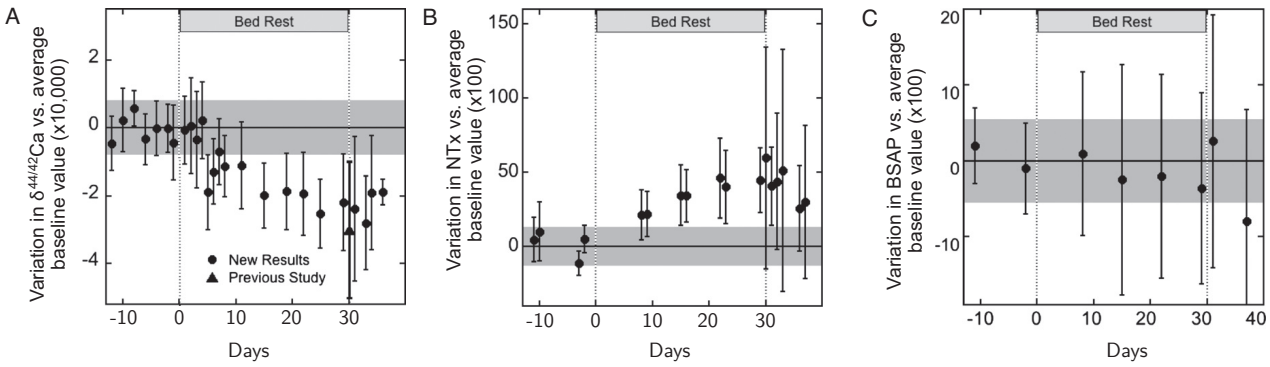

FIGURE 1.17 – **Variations des compositions isotopiques du Ca des urines (A) d'une cohorte de 12 personnes saines, avant, pendant et après la période d'alitement de 30 jours** ($\delta^{44/42}Ca$ exprimé en *partie pour dix mille (ppt)* et non en ‰, relativement au standard interne ICP1 Morgan *et al.* (2011)). Les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sont données conjointement aux variations en pourcent des concentrations de NTx des urines (B) et de BASP du sérum (C). Pour les trois grandeurs mesurées, les variations correspondent à la différence entre la valeur mesurée et la moyenne de la baseline, mesurée avant le début de l'alitement. **Variations in Ca isotope compositions of urines (A) of 12 healthy individuals, before, during and after the 30 days bedrest period** ($\delta^{44/42}Ca$ are expressed in *part per ten thousand (ppt)* and not ‰, relatively to ICP1 standard described in Morgan *et al.* (2011)). $\delta^{44/42}Ca$ values are presented together with relative variations (in %) in urine NTx (B) and serum BASP (C) concentrations. For all three variables, variations correspond to the difference between measured value and baseline average, estimated before beginning of bedrest experiment. (adapté de Morgan *et al.* (2012a))

appauvries en isotopes lourds, avec une dérive de l'ordre de -0.20 ‰, et que les urines sont enrichies en isotopes lourds par rapport au sang d'une moyenne de +1.2 ‰ tout au long de l'expérience. Il en est conclu que les compositions des urines en isotopes du Ca reflètent celles du sang, ce qui favoriserait l'utilisation des compositions isotopiques des urines pour suivre de manière non-invasive l'évolution de l'équilibre osseux.

Cette observation est d'importance car ce fractionnement rénal des isotopes du Ca pourrait contribuer aux variations observées dans les urines et le sang au cours de ces expériences, et est discutée dans ces publications.

Enfin, dans l'optique de tester le potentiel des isotopes du Ca pour détecter les pertes osseuses dans des cas pathologiques, une étude publiée en 2014 (Gordon *et al.* 2014) présente les mesures de compositions isotopiques du Ca du sérum sanguin d'individus atteints de myélomes multiples, un cancer hématologique caractérisé par des atteintes osseuses, sous sa forme active et non active. Ils démontrent qu'il existe une différence statistiquement significative entre les deux groupes, les individus atteints de la maladie sous sa forme active présentant des valeurs appauvries relativement aux individus pour lesquels la maladie n'est pas active. Ceci indiquerait une résorption osseuse plus importante chez les patients atteints de la maladie sous sa forme active, ce qui libérerait du calcium appauvris en isotopes lourds dans le sang. Cependant la différence entre les deux groupes est ténue et n'est pas observable au cours de l'activation de la maladie pour les patiens suivis au cours du temps.

L'ensemble de ces études porte donc sur l'évaluation du potentiel des isotopes du Ca comme traceurs dynamiques des déséquilibres du remodelage osseux, avec pour espoir avoué de proposer un nouveau biomarqueur permettant le diagnostic spécifique et sensible de la perte osseuse. Deux brevets ont d'ailleurs été déposés en ce sens en 2011 et 2014 [1].

IV Problématique et plan de thèse

En somme, les études portant sur les isotopes du Ca chez les vertébrés ont dégagé des axes de recherche fondés sur leur potentiel pour étudier les sources du Ca de l'alimentation dans les écosystèmes naturels et les sociétés humaines, ainsi que pour étudier la balance osseuse dans des contextes pathologiques et physiologiques extrêmes. Cependant, ces applications espérées sont fondamentalement dépendantes de la compréhension des causes de la variabilité des compositions en isotopes du Ca de l'organisme. La recherche a permis de dégager deux causes primaires de variabilité : la source de Ca et la physiologie de l'organisme. Mais les mécanismes identifiés jusqu'ici ne sont que partiellement expliqués et les modèles conceptuels et mathématiques utilisés pour discuter de ces applications sont lacunaires, hérités des premières observations (Skulan et DePaolo 1999) et ont peu évolué depuis (Morgan *et al.* 2012a). Mis à part le fractionnement rénal et un fractionnement à la minéralisation supposé, les relations entre les réservoirs prises en compte lors de la construction des modèles précédents ne sont pas toutes fondées sur des observations confirmées.

De ce fait, des interrogations demeurent quant à l'utilité de l'étude des isotopes du Ca aux fins évoquées ci-dessus :

- *A quel point l'alimentation détermine-t-elle la composition de l'organisme et quelle est la composition moyenne de l'alimentation humaine ?*
- *La consommation de produit laitiers et de lait maternel influence-t-elle significativement la composition de l'organisme et en particulier des tissus minéralisés, notamment de l'émail dentaire pour lequel la structure histologique est incrémentée ?*
- *Quels sont les mécanismes responsables de la différence moyenne de -0.65‰ entre alimentation et tissus minéralisés ? Le fractionnement à la minéralisation est-il effectif et explique-t-il à lui seul la distribution à l'état stationnaire des isotopes du Ca dans l'organisme ?*
- *Quelles sont les relations entre les autres réservoirs et quelles conséquences peuvent-elles avoir si elles sont prises en compte dans les modèles ?*
- *Est-il possible d'expliquer mathématiquement cette distribution à l'échelle de l'organisme ?*

Le but de ces travaux de thèse est donc d'identifier les facteurs principaux de ces variabilités inter- et intraindividuelles induits par la source puis par la physiologie propre de l'organisme, mais avant tout de

1. "Isotopic biomarkers for rapid assessment of bone mineral balance in biomedical applications" (US Application PCT/US2011/039780 ; AzTE reference number M10-102L) et "Application of Ca isotope analysis to the early detection of metastatic cancer" (AzTE reference number M13-117)

développer des méthodes d'analyse permettant la mesure des compositions des rapports isotopiques du Ca, et spécifiquement sur des matériaux biologiques.

La première partie de ces travaux thèse a eu pour but de **développer des méthodes** de mesure des rapports isotopiques du Ca en particulier dans les tissus biologiques, minéralisés, mous et les fluides corporels. Ainsi, dans un premier temps, je rendrai compte du développement de la méthode de mesure des compositions isotopiques du Ca adaptée à l'étude des tissus minéralisés et des fluides et tissus mous principaux (Tacail *et al.* 2014). Je présenterai ensuite les travaux de compilation des données de standards analysés et de la littérature, permettant d'estimer la qualité de l'ensemble des données produites au Laboratoire de Géologie de Lyon et de comparer les jeux de données issus de la littérature et produits au cours de ces travaux de thèse. Enfin, une dernière partie s'attachera à décrire le développement de méthodes permettant l'analyse de ces compositions à une résolution spatiale accrue, dans les tissus minéralisés, et plus spécifiquement l'émail dentaire. Deux techniques ont ainsi été évaluées : l'ablation laser et l'échantillonnage par microfraisage (Tacail *et al.* 2016).

Dans un second temps, je m'attacherai à réévaluer l'importance des **sources** de Ca de l'alimentation sur la composition isotopique des tissus minéralisés de l'organisme. Je discuterai d'abord brièvement des résultats de trois études portant sur des vertébrés d'écosystèmes continentaux et marins, actuels et fossiles (Martin *et al.* 2015; 2017a;b). Je réaliserai et discuterai ensuite une estimation des compositions isotopiques de l'alimentation humaine et de leur variabilité. Enfin, je présenterai une étude de l'effet d'un changement de source de Ca sur la composition de l'organisme à travers l'étude des transitions nutritionnelles précoces chez l'homme, *i.e.* le développement in utero, l'allaitement et le sevrage (Tacail *et al.* 2017b).

Dans une troisième partie, je m'appliquerai à explorer les **causes de la variabilité** induite par la physiologie propre de l'organisme. Pour ce faire, je présenterai les résultats de l'exploration de la variabilité isotopique à l'état sain dans les principaux réservoirs de l'organisme chez l'humain et des modèles ovins et murins ainsi qu'en compilant les données de la littérature. Je discuterai des relations entre réservoirs et des mécanismes à la source des fractionnements isotopiques et réviserai le modèle conceptuel synthétisant les relations entre réservoirs et les flux d'isotopes du Ca. Je testerai la justesse de ce modèle en développant un modèle mathématique dont les prédictions seront discutées pour l'état sain et les déséquilibres osseux.

Première partie

Méthodes d'analyse

Chapitre 2

Principe général de l'analyse des compositions isotopiques du Ca par MC-ICP-MS

Sommaire

I Mesures de rapports d'isotopes stables par MC-ICP-MS 42

A Spectrométrie de masse à torche plasma et multicollection 42

B Mesure de $\delta^{44/42}Ca$ 42

C Contraintes analytiques du MC-ICP-MS et de l'analyse du Ca 45

D Préparation des échantillons 48

E Justesse et précision 48

II Analyses élémentaires par ICP-AES et ICP-MS 48

III Conclusion et développement de méthodes analytiques de la thèse 49

I Mesures de rapports d'isotopes stables par MC-ICP-MS

A Spectrométrie de masse à torche plasma et multicollection

La spectrométrie de masse à torche plasma et multi-collection a pour principe de séparer et de "compter" simultanément les particules de masses différentes, ionisées lors de leur introduction dans un plasma d'argon (Ar) à une température de l'ordre de 8 000 K (Halliday *et al.* 1995, Maréchal *et al.* 1999, Albarède et Beard 2004).

En bref, l'échantillon est traditionnellement introduit en solution, souvent en milieu nitrique (HNO_3 0.05 N) dans un nébuliseur (Figure 2.1.D.). L'aérosol formé est transporté par un gaz porteur, généralement Ar, et introduit dans le plasma d'argon d'une torche à plasma induit par une bobine RF. L'aérosol est alors désolvaté, les molécules sont atomisées et les atomes ionisés. Les ions sont ensuite introduits dans un vide partiel à l'aide d'une interface faite de deux cônes successifs permettant l'échantillonnage d'une partie des ions du plasma à pression ambiante. Les cations y sont accélérés à l'aide d'une différence de potentiel appliquée entre les cônes et une lentille d'extraction. Les ions sont ensuite focalisés et accélérés grâce à l'action d'une série de lentilles électrostatiques.

Le MC-ICP-MS est un spectromètre de masse à double focalisation. Le faisceau d'ions passe dans un premier temps dans un secteur électrostatique (ESA pour *Electrostatic Analyzer*) permettant leur tri en énergie cinétique, grâce à une différence de potentiel appliquée entre deux plaques incurvées. Dans un second temps, les ions sont triés dans le champs magnétique d'un électroaimant. Ils y sont soumis à un champ magnétique courbant les trajectoires des ions. Le rayon de courbure est une fonction du rapport de la masse de l'ion (m) sur sa charge (q) et permet donc de décomposer le faisceau :

$$r = \frac{\sqrt{2Vm}}{B\sqrt{q}} \tag{2.1}$$

où r correspond au rayon de la courbure, V la différence de potentiel d'accélération de l'ion, m la masse atomique de l'ion, q sa charge et B la norme du champ magnétique. Des faisceaux discrets sont alors émis en sortie de secteur magnétique et peuvent être collectés dans des cages de Faraday contigues, permettant la mesure de plusieurs courants simultanément. Des résistors de résistances élevées (10^{10}, 10^{11} ou $10^{12}\,\Omega$) permettent enfin la conversion du courant en une différence de potentiels (en V), dont l'intensité dépendra de l'abondance de l'ion d'un rapport *m/q* donné et permettant les calculs de rapports isotopiques.

B Mesure de $\delta^{44/42}Ca$

La mesure par MC-ICP-MS de rapports d'abondances d'isotopes stables absolus ou vrais, c'est à dire tels qu'ils sont dans l'échantillon, n'est ni aisée, ni nécessaire. L'ensemble du trajet des isotopes, depuis l'échantillon en solution jusqu'aux collecteurs, induit un fractionnement isotopique, également appelé frac-

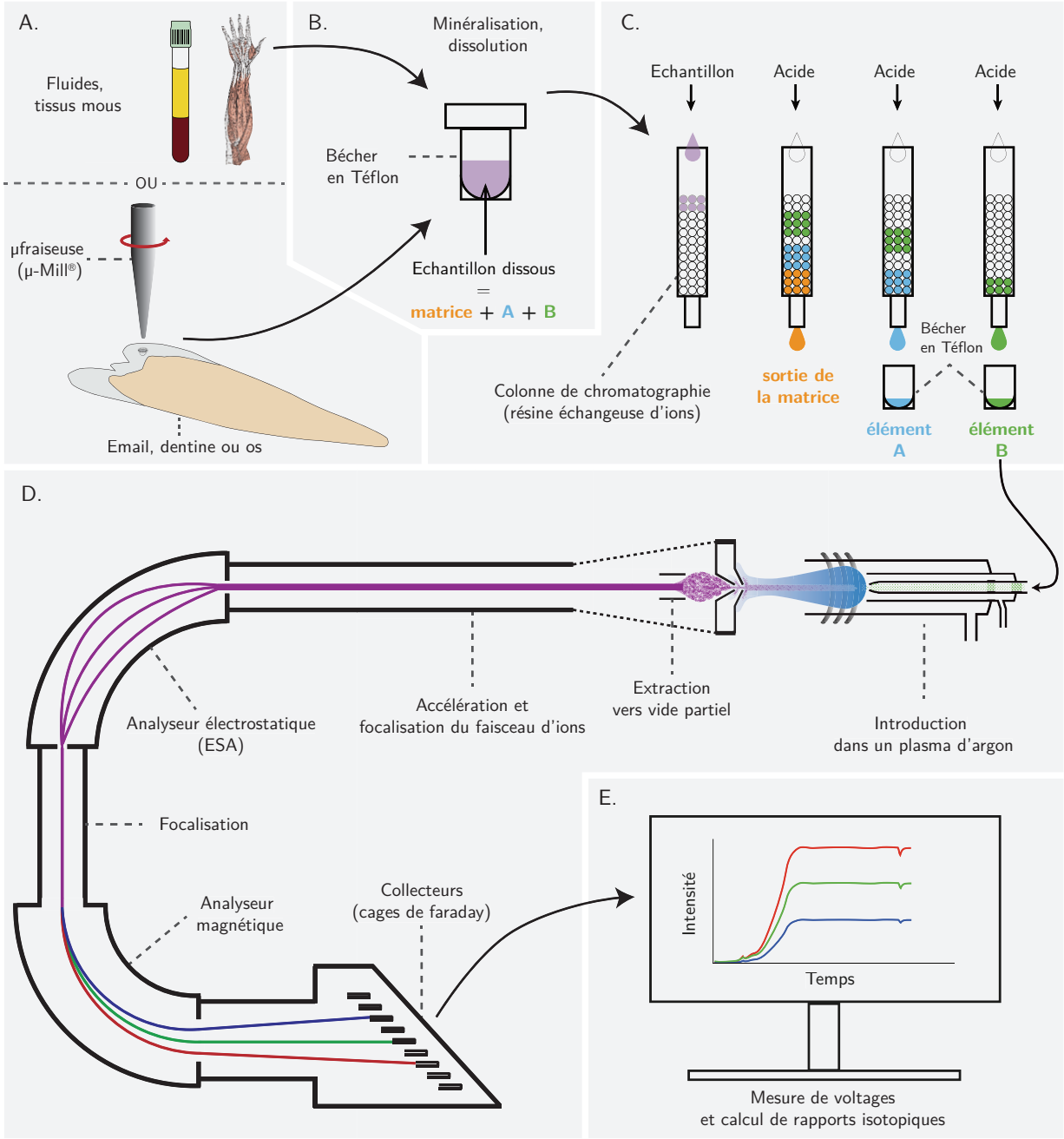

FIGURE 2.1 – **Etapes principales de l'analyse de compositions isotopiques par MC-ICP-MS.** (**A**) L'échantillon est d'abord prélevé, (**B**) puis minéralisé (digestion des molécules organiques) et dissous, (**C**) et enfin purifié par chromatographie échangeuse d'ions. Après récupération de la fraction pure contenant l'élément d'intérêt, (**D**) celui-ci est introduit par nébulisation dans la torche à plasma d'argon d'un spectromètre de masse à torche plasma et multicollecteurs. Les courants produits par la collecte des faisceaux d'ions sont mesurés (**E**) et permettant le calcul des rapports isotopiques. **Main steps in measurement of isotope compositions using MC-ICP-MS.** (**A**) Sampling is performed, (**B**) organic phase of sample is then digested and dissolved, (**C**) and finally purified using ion exchange resins. After recovery of pure fraction containing element of interest, (**D** it is injected as an aerosol in Ar plasma torch of a Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer. The currents that are generated by collection of ion beams are measured (**E**) allowing calculation of isotope ratios. (adapté de Martin *et al.* (2017a))

tionnement induit par l'instrument. Ce fractionnement modifie les rapports isotopiques vrais des échantillons et peut être décrit par la loi dite exponentielle des fractionnements dépendants de la masse (Maréchal *et al.* 1999). Ainsi pour les rapports mesurés (R_{mes}) et vrais (R_{vr}) des abondances de deux isotopes *i* sur *j* d'un élément *X*, la loi exponentielle des fractionnements dépendants de la masse, également appelée "modèle de Russell" (Russell *et al.* 1978), donne :

$$R_{mes} = R_{vr} \left(\frac{M_i}{M_j} \right)^f \tag{2.2}$$

où M_i et M_j sont les masses atomiques des isotopes i et j respectivement, et f le coefficient de fractionnement, ou biais de masse (*mass bias*), un coefficient indépendant des deux isotopes considérés. La valeur de *f* sera la même pour les différents rapports isotopiques mesurés, dans le cas où plus de deux isotopes sont analysés.

Ce fractionnement induit par l'instrument peut également varier légèrement au cours du temps, selon une multitude de facteurs difficilement maîtrisables dans leur totalité. Il est donc nécessaire de réaliser les mesures dans les conditions les plus stables possibles mais également de s'affranchir au mieux des variations ou dérives de ce fractionnement.

La méthode utilisée ici, dite du *standard-sample-standard bracketing*, est celle de l'encadrement de la mesure d'un échantillon par deux mesures d'un standard de référence. La mesure du rapport isotopique d'un standard de référence, de composition isotopique connue, est réalisée avant et après chaque analyse d'échantillon, si bien qu'il est possible de calculer une valeur de $\delta^{44/42}Ca$ selon la relation :

$$\delta^{44/42}Ca = \left(\frac{(^{44}Ca/^{42}Ca)_{\text{éch.}}}{0.5 \times (^{44}Ca/^{42}Ca)^{i}_{std} + 0.5 \times (^{44}Ca/^{42}Ca)^{i+1}_{std}} - 1 \right) \times 1\,000 \tag{2.3}$$

où i et $i+1$ désignent les mesures de rapports du standard précédant et suivant la mesure de l'échantillon. On suppose alors que les rapports isotopiques du standard et de l'échantillon sont affectés par des fractionnements instrumentaux d'ampleurs similaires et que la dérive locale des rapports isotopiques du standard et de l'échantillon est linéaire, ce qui nous autorise à estimer le rapport isotopique du standard de référence au moment de l'analyse de l'échantillon en calculant une moyenne pondérée des mesures encadrant celle de l'échantillon.

Enfin il est possible de contrôler la qualité de la mesure des $\delta^{44/42}Ca$ des échantillons en mesurant et calculant conjointement les valeurs de $\delta^{43/42}Ca$. La dépendance en masse des fractionnements prédit une relation affine entre $\delta^{43/42}Ca$ et $\delta^{44/42}Ca$ avec un coefficient directeur de l'ordre de *0.5*. Selon les causes des fractionnements, il existe cependant plusieurs approximations linéaires des fractionnements de masse prédisant des coefficients directeurs légèrement différents des équations de droites de dépendance en masse. Les trois principales sont les lois exponentielle, puissance et inverse (Maréchal *et al.* 1999).

La loi exponentielle des fractionnements de masse décrit les fractionnements induits au cours de la transmission des isotopes dans le spectromètre, qu'il s'agisse d'un MC-ICP-MS (Maréchal *et al.* 1999) ou d'un TIMS (Russell *et al.* 1978). Elle prédit, par exemple pour le Ca, une pente s de la droite des $\ln(^{43}Ca/^{42}Ca)$ représentés en fonction des $\ln(^{44}Ca/^{42}Ca)$ de :

$$s = \frac{\ln(M_{43}/M_{42})}{\ln(M_{44}/M_{42})} \simeq 0.507 \tag{2.4}$$

où M_{44}, M_{43} et M_{42} sont les masses atomiques des isotopes du ^{44}Ca, ^{43}Ca et ^{42}Ca.

Toujours dans le cas du Ca, **la loi puissance** prédit une pente de :

$$s = \frac{M_{43} - M_{42}}{M_{44} - M_{42}} \simeq 0.501 \tag{2.5}$$

Et enfin, **la loi inverse** prédit une pente de :

$$s = \frac{1/M_{43} - 1/M_{42}}{1/M_{44} - 1/M_{42}} \simeq 0.512 \tag{2.6}$$

Pour des gammes restreintes de variation des compositions isotopiques du Ca, il est possible de faire l'approximation que les pentes des droites représentant $\ln(^{43}Ca/^{42}Ca)$ en fonction de $\ln(^{44}Ca/^{42}Ca)$ sont égales à celles de $\delta^{43/42}Ca$ en fonction de $\delta^{44/42}Ca$[1].

Selon les types de fractionnement, qu'ils soient dominés par des effets thermodynamiques ou des effets cinétiques, il est probable que les lois de fractionnement ne soient pas les mêmes. Bien que ce soit encore discuté, les fractionnements à l'équilibre thermodynamique induiraient des fractionnements s'approchant de lois inverses et les fractionnements cinétiques s'approchant de lois exponentielles (Young *et al.* 2002).

La qualité des analyses sera donc contrôlée en estimant les pentes des droites représentant $\delta^{43/42}Ca$ en fonction de $\delta^{44/42}Ca$, devant s'approcher des valeurs théoriques variant entre 0.501 et 0.512.

C Contraintes analytiques du MC-ICP-MS et de l'analyse du Ca

L'analyse par MC-ICP-MS des compositions d'isotopes stables est caractérisée par un ensemble de contraintes qu'il est nécessaire d'éliminer ou de corriger.

Interférences et résolution Les isotopes d'intérêt peuvent présenter des rapports *m/q* proches de certains isotopes d'autres éléments ou certains composés polyatomiques, souvent formés par interactions entre les gaz de l'atmosphère, l'eau de l'échantillon et les gaz d'introduction. Si ces particules sont effectivement collectées avec les isotopes d'intérêt, elles conduisent à des interférences et sont appelées isobares.

La capacité d'un spectromètre de masse à discriminer les différentes masses peut être mesurée par sa

1. L'approximation est acceptable pour des variations de $\delta^{44/42}Ca$ comprises entre $+10$ et -10 ‰

résolution, dont une définition est donnée par Weyer et Schwieters (2003) pour un profil d'intensité (en V), également appelé pic, en fonction de la masse d'un ion donné :

$$R_{pouv.}(5,95\%) = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m}{m_{5\%} - m_{95\%}} \tag{2.7}$$

où $R_{pouv.}$ est le pouvoir de résolution, m la masse atomique de l'ion, $m_{5\%}$ est la masse atomique à 5 % de la hauteur du pic et $m_{95\%}$ celle à 95 %. Les pouvoirs de résolution pouvant être atteints avec le Neptune *plus* utilisé au cours de ces travaux de thèse varient entre 4 000 et 9 000 selon les modes.

Les principales espèces susceptibles d'interférer avec les analyses des isotopes du Ca sont présentées en figure 2.2.

Les espèces isobares les plus contraignantes pour les mesures des rapports isotopiques du Ca, du fait de leurs abondances ou de la proximité de leurs masses avec les isotopes du Ca, sont :

— ^{40}**Ar**$^{+}$ **:** sa masse atomique est trop proche de ^{40}Ca^{+} pour que ce dernier puisse être mesuré en conditions normales par MC-ICP-MS du fait de l'utilisation de Ar pour l'introduction et la formation du plasma (Halicz *et al.* 1999, Wieser *et al.* 2004, Fietzke *et al.* 2004). Pour résoudre l'interférence de l'Ar, il serait nécessaire de dépasser un pouvoir de résolution de l'ordre de 193 000.

— ^{46}**Ti**$^{+}$ **et** ^{48}**Ti**$^{+}$ sont deux isotopes isobares de ^{46}Ca^{+} et ^{48}Ca^{+}. Ils sont en abondances élevées relativement aux abondances faibles de ^{46}Ca^{+} et ^{48}Ca^{+}. Pour résoudre les interférences de ^{46}Ti^{+} et ^{48}Ti^{+}, il serait nécessaire de dépasser des pouvoirs de résolution de 43 500 et 10 500 respectivement.

— ^{84}**Sr,** ^{86}**Sr et** ^{88}**Sr** sont trois isotopes dont les ions doublement chargés présentent des rapports *m/q* très proches de ^{42}Ca^{+}, ^{43}Ca^{+} et ^{44}Ca^{+}. Pour résoudre les interférences de ^{84}Sr^{2+}, ^{86}Sr^{2+}, ^{88}Sr^{2+}, il serait nécessaire de dépasser des pouvoirs de résolution de 22 000, 10 400 et 16 500 respectivement.

— ^{40}**Ar**^{1}**H**$_2^{+}$ est un ion polyatomique formé à partir de l'argon du plasma et l'hydrogène de l'eau et qui interfère avec ^{42}Ca^{+}. Cette espèce nécessite de dépasser un pouvoir de résolution supérieur à 2 200 ce qui peut être réalisé avec les spectromètres de masse actuels (Neptune *plus* inclus).

En somme, ^{40}Ca ne peut être mesuré par MC-ICP-MS en conditions normales ; ^{46}Ca et ^{48}Ca sont fortement interférés par les isotopes de Ti ce qui requerrait une purification poussée ; les isotopes ^{42}Ca, ^{43}Ca et ^{44}Ca peuvent être analysés à condition de séparer suffisamment le Ca des éléments de la matrice, dont Sr ainsi que les éléments majeurs des tissus biologiques que sont Na, K, Mg et S. La résolution de l'interférence due à ^{40}Ar^{1}H$_2^{+}$ est possible à condition d'atteindre une résolution suffisante, supérieure à environ 5 000 c'est-à-dire plus de deux fois le pouvoir de résolution requis (voir Figure 2.2, Tacail *et al.* (2014) et Annexe A).

FIGURE 2.2 – **Principales espèces interférentes des isotopes du Ca.** Les abondances des isotopes formant les espèces interférentes, y compris polyatomiques, sont données en % dans l'ordre de la formule associée. Δm se rapporte à la différence des masses atomiques de l'espèce interférente et de l'isotope du Ca. La résolution correspond à la résolution calculée selon la définition des 5 et 95 % du plateau (Weyer et Schwieters 2003). Adapté de Heuser *et al.* (2016b) et complété.

Isotope du Ca	Interférence	Abondances (%)	Δm	Résolution requise	Isotope du Ca	Interférence	Abondances (%)	Δm	Résolution requise
^{40}Ca	$^{80}Kr^{++}$	2.3	-0.0044	9076	**^{44}Ca**	$^{88}Sr^{++}$	82.6	-0.0027	16448
	$^{80}Se^{++}$	49.6	-0.0043	9228		$^{43}CaH^{+}$	0.135 - 99.98	0.0111	3956
	$^{40}Ar^{+}$	99.6	-0.0002	193149		$^{28}Si^{16}O^{+}$	92.2 - 99.8	0.0164	2687
	$^{40}K^{+}$	0.01	0.0014	28378		$^{32}S^{12}C^{+}$	95.02 - 98.9	0.0166	2650
	$^{39}KH^{+}$	93.3 - 99.98	0.0089	4469		$^{30}Si^{14}N^{+}$	3.1 - 99.6	0.0214	2058
	$^{24}Mg^{16}O^{+}$	79 - 99.8	0.0174	2301		$^{26}Mg^{18}O^{+}$	11 - 0.2	0.0263	1673
	$^{20}Ne_2^{+}$	90.5	0.0223	1793		$^{27}Al^{16}OH^{+}$	100 - 99.8 - 99.98	0.0288	1526
	$^{23}Na^{16}OH^{+}$	100 - 99.8 - 99.98	0.0299	1336		$^{12}C^{16}O_2^{+}$	98.9 - 99.8	0.0343	1280
						$^{14}N_2^{16}O^{+}$	99.6 - 99.8	0.0456	964
^{42}Ca	$^{84}Kr^{++}$	57	-0.0029	14627					
	$^{84}Sr^{++}$	0.6	-0.0019	21993					
	$^{41}KH^{+}$	6.7 - 99.98	0.011	3805	**^{46}Ca**	$^{92}Zr^{++}$	17.15	-0.0012	39297
	$^{30}Si^{12}C^{+}$	3.1 - 98.9	0.0151	2770		$^{46}Ti^{+}$	7.5	-0.0011	43504
	$^{26}Mg^{16}O^{+}$	11 - 99.8	0.0189	2221		$^{92}Mo^{++}$	14.8	-0.0003	161524
	$^{40}ArH_2^{+}$	99.6 - 99.98	0.0194	2161		$^{30}Si^{16}O^{+}$	3.1 - 99.8	0.015	3064
	$^{40}CaH_2^{+}$	97 - 99.98	0.0196	2139		$^{32}S^{14}N^{+}$	95 - 99.6	0.0215	2142
	$^{28}Si^{14}N^{+}$	92.2 - 99.6	0.0214	1962		$^{29}Si^{16}OH^{+}$	4.7 - 99.8 - 99.98	0.0255	1799
	$^{24}Mg^{18}O^{+}$	79 - 0.2	0.0256	1640		$^{14}N^{16}O_2^{+}$	99.6 - 99.8	0.0392	1172
	$^{25}Mg^{16}OH^{+}$	10 - 99.8	0.03	1401					
	$^{14}N_3^{+}$	99.6	0.0506	829	**^{48}Ca**	$^{48}Ti^{+}$	73.7	-0.0046	10458
						$^{96}Mo^{++}$	16.7	-0.0002	246860
^{43}Ca	$^{86}Sr^{++}$	9.9	-0.0041	10392		$^{96}Ru^{++}$	5.5	0.0013	37877
	$^{86}Kr^{++}$	17.3	-0.0035	12404		$^{96}Zr^{++}$	2.8	0.0016	29896
	$^{42}CaH^{+}$	0.65 - 99.98	0.0077	5596		$^{32}S^{16}O^{+}$	95 - 99.8	0.0145	3317
	$^{27}Al^{16}O^{+}$	100 - 99.8	0.0177	2429		$^{36}Ar^{12}C^{+}$	0.3 - 98.9	0.015	3194
	$^{31}P^{12}C^{+}$	100 - 98.9	0.015	2865		$^{24}Mg_2^{+}$	79	0.0176	2731
	$^{26}Mg^{16}OH^{+}$	11 - 99.8	0.0266	1617		$^{34}S^{14}N^{+}$	4.2 - 99.6	0.0184	2605
	$^{14}N_3H^{+}$	99.6 - 99.98	0.0583	737		$^{31}P^{16}OH^{+}$	100 - 99.8 - 99.98	0.024	2000
						$^{16}O_3^{+}$	99.8	0.0322	1489

Effets de matrice La relative stabilité des fractionnements instrumentaux est primordiale pour la réalisation de mesures précises des rapports isotopiques. Cette stabilité peut cependant être mise à mal par la présence d'éléments et de molécules organiques dans l'échantillon en solution. Cette matrice chimique peut ainsi déstabiliser les conditions d'ionisation et de parcours des isotopes, en modifiant la température du plasma ou en complexant le Ca par exemple.

D Préparation des échantillons

Toutes ces contraintes poussent à préparer l'échantillon de telle sorte que les effets de matrice soient évités et les éléments responsables d'interférences soient éliminés. Ceci requiert donc l'élimination des molécules organiques par minéralisation et la purification du Ca de la matrice chimique par chromatographie échangeuse d'ions.

La minéralisation se fait par digestion acide et oxydative à température élevée (Figure 2.1.A.). Les chromatographies échangeuses d'ions (Figure 2.1.B.) ont pour principe de séparer les ions selon leur affinité pour une résine, variable selon le milieu d'élution : nature de l'acide, pH, potentiel d'oxydoréduction (Trémillon 1965).

Toutes les préparations chimiques se font en environnement propre (salle blanche) dans des vaisselles en téflon (savillex) et avec de l'eau et des réactifs très purs (H_2O milliQ ; acides HCl et HNO3 distillés ; eau oxygénée ultrapure à 30 %) afin de minimiser les contaminations par du Ca de l'environnement et des réactifs.

E Justesse et précision

La justesse et la précision de la mesure des $\delta^{44/42}Ca$ sont des critères fondamentaux pour la mesure fiable de variations des compositions isotopiques et pour la comparaison des données entre laboratoires.

La justesse est estimée par la mesure de standards secondaires, de compositions isotopiques connues relativement au standard de bracketing. Ces standards sont présentés dans les deux chapitres suivants (Chapitres 3 et 4). La précision est estimée par l'analyse répétée de nombreuses fois de ces mêmes standards, au cours d'une session d'analyse et d'une session d'analyse à une autre. La vérification de la dépendance en masse est une autre condition nécessaire et passe principalement par la représentation graphique des valeurs de $\delta^{43/42}Ca$ en fonction $\delta^{44/42}Ca$ comme décrit précédemment.

II Analyses élémentaires par ICP-AES et ICP-MS

Les analyses élémentaires présentées et utilisées dans ces travaux de thèse ont été réalisées selon des méthodes de routine au LGLTPE par spectroscopie d'émission atomique à torche plasma (ICP-AES pour *Inductiveley Coupled plasma Atomic Emission Spectroscopy*) ainsi que par spectrométrie de masse à torche plasma et quadripôles (ICP-(Q)MS pour *Inductiveley Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometers*).

Les mesures de concentrations et de quantités de matière par ICP-AES (iCAP 6000 Series Thermo Electron Corporation) ont principalement été réalisées pour les éléments majeurs, dont Na, K, Mg, Ca, Sr, Fe, Zn, Mn, P, S. L'échantillon est introduit en solution (HNO_3 0.5 N) avec Sc pour standard interne à 1 ou 10mg/L permettant la correction des dérives. La solution est nébulisée et introduite dans le plasma où

les électrolytes sont ionisés et excités. La désexcitation induit l'émission de photons de longueurs d'ondes spécifiques. L'analyse de la lumière permet, après calibration à l'aide de solutions standards, de déterminer la concentration dans l'échantillon. Les limites de détection et de quantification sont systématiquement estimées par des analyses répétées de blancs (solutions pures de HNO3 0.5 N et Sc à 1 ou 10 mg.L^{-1}). La justesse des mesures est également estimée par l'analyse de standards de concentrations proches de celles observées dans les échantillons. Les gammes de concentrations mesurables dépendent de l'élément analysé mais varient entre quelques μg.L^{-1} à plus d'une centaine de mg.L^{-1}.

Les mesures de concentrations et de quantités de matière par ICP-QMS (7500CX, Agilent Technologies) ont été réalisées pour les éléments mineurs et traces ainsi que certains éléments majeurs, par exemple Rb, Mg, Sr, Ba, Ti, Zr, Cr, Fe, Cu, Zn, Mn (...) ainsi que les terres rares le cas échéant. Les échantillons sont introduits en solution de HNO3 0.5 N et 2 ppb d'In (μg.L^{-1}) pour standard interne. La solution est introduite dans un plasma d'argon, où les électrolytes sont ionisés puis analysés en masse (rapports m/q) à l'aide d'un quadripôle. Nous mesurons donc des signaux isotopiques ramenés à l'élément dans son ensemble grâce aux abondances isotopiques moyennes. La calibration est réalisée à l'aide de solutions de concentrations croissantes en éléments d'intérêt. Les gammes de concentrations pouvant être analysées dépendent également de l'élément et de l'isotope mais varient usuellement entre le ppt (ng.L^{-1}) et quelques dizaines de ppb (μg.L^{-1}).

III Conclusion et développement de méthodes analytiques de la thèse

L'objectif de cette thèse étant d'explorer les causes de variations des compositions isotopiques du Ca chez les mammifères et l'humain, dans les tissus minéralisés comme dans les fluides et les tissus mous, il a été nécessaire de développer des protocoles d'analyse adaptés à ces contextes. Les échantillons biologiques sont caractérisés par des concentrations en Ca variables et des rapports entre les éléments de la matrice et le Ca d'ordres de grandeur également variables. Ceci a fait l'objet du développement d'une méthode présentée dans un article (Chapitre 3).

Depuis les premières études, les standards de référence utilisés pour exprimer les valeurs de δ ont été nombreux. Ceci est en principalement dû à l'absence de standard officiel remplissant les principales conditions requises : homogénéité de la composition isotopique, pureté du Ca (ne nécessitant pas de préparation chimique particulière), facilité d'accès et grande quantité permettant son utilisation sur le long terme. Le premier standard à avoir été relativement accepté par les communautés est le SRM915a mais est aujourd'hui épuisé. L'eau de mer en est un autre mais une purification poussée est nécessaire en amont de son utilisation. Ces travaux de thèse ont donc été l'occasion de compiler les compositions des standards utilisés jusqu'ici, de calibrer le standard utilisé à Lyon (*ICP Ca Lyon*) relativement aux standards pré-existants et enfin de proposer de nouveaux standards, de matrices chimiques biologiques notamment.

Ces travaux sont présentés dans le Chapitre 4.

Enfin, un autre but de la thèse a été d'explorer la variabilité spatiale des compositions en isotopes du Ca des tissus minéralisés, et plus précisément l'émail dentaire humain afin d'étudier les transitions nutritionnelles précoces, potentiellement enregistrées au cours de la croissance de la couronne d'émail. Les variations attendues sont ténues et les résolutions spatiales qu'il est nécessaire d'atteindre sont inférieures au millimètre. Il a donc été nécessaire de développer une méthode d'analyse permettant des mesures hautement résolues spatialement, justes et précises, des variations des compositions isotopiques du Ca au sein de tissus minéralisés supposés hétérogènes et porteurs d'information. Le but connexe est de pouvoir réaliser les analyses sur des échantillons petits, n'impliquant le prélèvement que de peu de matière, ce qui est préféré dans le cas d'études de matériels rares ou précieux. Ces développements sont présentés dans un article (Chapitre 5).

Chapitre 3

Protocole d'analyse des compositions isotopiques du Ca des tissus biologiques

Sommaire

I Introduction 52
II Article "*A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples*" . . . 52

I Introduction

Dans le but d'étudier les distributions des isotopes du Ca à travers l'ensemble des réservoirs de Ca de l'organisme, il a été nécessaire de développer une stratégie de préparation des échantillons et de mesure des compositions isotopiques du Ca. Il existait dans la littérature une méthode ayant été utilisée pour les urines humaines (Morgan *et al.* 2011) faisant appel à des étapes de purification chimique impliquant des acides dangereux (HBr et HF). Par ailleurs, les analyses des compositions isotopiques du Ca sur le MC-ICP-MS Neptune *plus* (Thermo Scientific, Bremen, Germany) n'étaient pas développées en routine au LGLTPE. Le développement d'une méthode de mesure fiable et moins dangereuse des compositions isotopiques du Ca des matériaux biologiques végétaux et animaux a fait l'objet d'une étude publiée dans le *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. La discussion des distributions des isotopes du Ca au sein de l'organisme du mouton sera intégrée et poursuivie dans la Partie III.

II Article "*A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples*"

Résumé *Nous décrivons un protocole de séparation chimique du Ca de matériaux biologiques pour les analyses de compositions isotopiques du Ca par spectrométrie de masse à torche plasma et multi-collection (MC-ICP-MS). La méthode a été développée à l'aide de profils d'élutions réalisés avec les acides chlorhydriques et nitriques uniquement, pour l'urine humaine, le sérum et les globules rouges de mouton, l'eau de mer et des plantes herbacées. Cette méthode permet l'élimination des espèces interférentes (dont K, Sr, Mg) et de la matrice chimique (dont Fe, P, Na et S) au delà des niveaux de pureté requis. Afin de tester ce protocole et de mieux comprendre les distributions des isotopes du Ca des fluides et organes de mammifères, nous avons purifié et analysé une variété de tissus et fluides de moutons : des échantillons de sérum, globules rouges, muscles, foies, reins, émail, os, urines et excréments. Les données présentent une grande variabilité, exprimée en notation δ, de plus de 1 ‰ par unité de masse atomique, avec une précision inférieur ou égale à 0.1 ‰. Ces variations couvrent une grande partie de la variabilité naturelle connue jusqu'alors. Les globules rouges apparaissent être enrichis en isotopes lourds d'environ 0.3 ‰ par unité de masse atomique, relativement au sérum. Cette différence de compositions isotopiques entre le sérum et les globules rouges n'était pas prise en considération dans les études préalables et permet de mieux contraindre le cycle isotopique du Ca dans l'organisme. Les compositions isotopiques du Ca des autres organes sont corrélées avec les concentrations en Ca, l'os et les globules rouges constituant les deux pôles. L'os est riche en Ca et appauvri en isotopes lourds et les globules rouges sont pauvres en Ca et enrichis en isotopes lourds. Cette tendance est compatible avec un processus de distillation, au cours duquel le Ca est extrudé des cellules et les isotopes sont triés par un fractionnement cinétique favorisant les isotopes légers.* [1]

1. Les suppléments à cet article sont présentés en Annexe A.

http://doi.org/10.1039/C3JA50337B

Chapitre 4

Justesse des analyses, compilation et conversion des données de la littérature

Sommaire

I Compilation des standards de la littérature 56

A Description du travail de compilation 56

B Compilation des principaux standards 59

II Compilation des analyses de standards des travaux de thèse 61

III Conversion des données de la littérature 65

A Composition du SRM915a, justesse et principe de conversion 65

B Création d'une base de données de la littérature 68

I Compilation des standards de la littérature

A Description du travail de compilation

1 Standards de référence et standards secondaires

Les standards de référence sont ceux utilisés pour mesurer ou calculer la valeur du δ d'un échantillon. Ce standard doit présenter une composition isotopique la plus homogène possible, être prêt à être analysé sans avoir à réaliser de préparation pouvant modifier sa composition isotopique, et enfin, il doit être disponible en quantités suffisantes pour une longue durée et pour l'ensemble des laboratoires souhaitant réaliser des mesures isotopiques de l'élément considéré.

Les standards de référence utilisés pour le Ca sont nombreux et ce pour plusieurs raisons (Tableau 4.1). En effet, la mesure des compositions isotopiques du Ca ne s'est normalisée que récemment. Par ailleurs, la quasi-totalité des matériaux disponibles contenant du Ca sont des solides (carbonate de Ca, fluorures, *etc.*) souvent impurs (contenant du Sr à des concentrations de plus de 100 μg.g^{-1}.). Le SRM915a est un carbonate de Ca ayant été beaucoup utilisé jusqu'à aujourd'hui (Tableau 4.2), cependant ses stocks se sont épuisés et il ne peut donc plus être employé comme standard de référence. Par ailleurs, l'eau de mer et notamment l'eau de mer standard IAPSO (Tableau 4.1) ont également été très utilisées comme standards de référence mais requièrent des purifications poussées du fait de leurs fortes concentrations en éléments dont Sr. Il reste aujourd'hui SRM915b, un carbonate de Ca contenant environ 150 μg.g^{-1} de Sr, dont la purification est nécessaire. Aucun standard pur et prêt à être analysé n'est donc disponible à grande échelle aujourd'hui.

Comme décrit dans le chapitre précédent, le standard utilisé au LGLTPE est donc l'*ICP Ca Lyon*, solution standard Specpure de calibration pour ICP-MS (10 000 μg.ml^{-1} de Ca) de chez Alfa aesar (Tacail *et al.* 2014). Elle ne nécessite qu'une purification par chromatographie sur résine spécifique au Sr (Sr-Spec, Triskem) du fait de la présence de Sr à hauteur de 150 μg.ml^{-1} environ.

TABLEAU 4.1 – **Description des principaux standards de référence et secondaires utilisés dans la littérature et au cours de cette thèse. Description of main reference and secondary standards employed in literature and in the course of this thesis. IRMM** : *Institute for Reference Material and Measurements* (EU), **NIST** : *National Institute of Standards and Technology* (USA), **Purif.** : nécessite purification du Ca ou non (requires Ca purification or not)

Standard	Usage	Description	Fournisseur/Réf.	Statut	Purif.
SRM915a	Référence *& Secondaire*	Standard carbonate de Ca (clinical grade)	NIST	Standard Reference Material Non-certifié pour isotopes du Ca Épuisé	*OUI*
SRM915b	Référence *& Secondaire*	Standard carbonate de Ca (clinical grade)	NIST	Standard Reference Material Non-certifié pour isotopes du Ca Disponible	*OUI*
CaCO3	Référence	Carbonate de Ca	Skulan et DePaolo (1997)	Standard interne au laboratoire	*OUI*
CaF2	Référence	Fluorure de Ca	Laboratoire GEOMAR (Heuser et al., 2002)	Standard interne au laboratoire	*OUI*
ICP1	Référence	Solution acide de Ca pure Standard de calibration des concentrations	NIST	Standard interne au laboratoire Morgan et al., 2011	*NON*
Seawater	Référence *& Secondaire*	Eau de mer	Echantillonnage libre	Disponible	*OUI*
IAPSO Seawater	Référence *& Secondaire*	Eau de mer - Standard de salinité (Océan Atlantique)	OSIL	Standard de salinité, Disponible	*OUI*
BSE	Référence	Bulk Silicate Earth Composition moyenne de la terre silicatée	-	Concept défini mathématiquement *e.g.* Nielsen et al., 2012	-
SRM1486	Secondaire	Bone Meal Farine d'os de vache (Avec phase organique)	NIST	Standard Reference Material Non-certifié pour isotopes du Ca Disponible	*OUI*
SRM1400	Secondaire	Bone Ash Farine d'os de vache, calciné (Sans phase organique)	NIST	Standard Reference Material Non-certifié pour isotopes du Ca Disponible	*OUI*
BCR380-R	Secondaire	Whole Milk Powder Lait de vache entier Lyophilisé	IRMM	Certified Reference Material Non-certifié pour isotopes du Ca Disponible	*OUI*
CBE	Secondaire	Cave Bear Enamel Email d'ours des cavernes	Tacail et al., 2014	Standard interne au laboratoire	*OUI*

Les standards secondaires sont de compositions isotopiques connues relativement au standard de référence utilisé. Ils sont analysés en tant qu'échantillon ce qui permet la vérification de la justesse des mesures ainsi que les comparaisons entre laboratoires. Dans un laboratoire, les standards de référence d'autres laboratoires peuvent être utilisés en tant que standards secondaires afin de comparer les données produites à celles des autres laboratoires. Les principaux standards de références et secondaires utilisés pour le Ca sont présentés en Tableau 4.1.

Dans le but de s'assurer que les analyses faites au LGLTPE sont justes ainsi que de pouvoir comparer à grande échelle les données produites avec les données de la littérature, je présente ici une compilation des données de la littérature pour les principaux standards de référence et secondaires. Je ferai le bilan

TABLEAU 4.2 – **Bilan des standards de référence utilisés dans les publications compilées**. **Std** : Standard de référence, **n** : nombre de publications, **Réf.** : Référence de la publication, **Année** : Année de publication **Summary of reference standards employed in compiled publications**. **Std** : Reference Standard, **n** : number of publications, **Réf.** : Publication reference, **Année** : Year of publication

Std	n	Réf.	Année	Std	n	Réf.	Année
BSE	6	Ewing *et al.* (2008)	2008	**SRM915a**	36	Halicz *et al.* (1999)	1999
		Simon et DePaolo (2010)	2010			Hippler *et al.* (2003)	2003
		Nielsen *et al.* (2012)	2012			Chang *et al.* (2004)	2004
		Nielsen et DePaolo (2013)	2013			Fietzke *et al.* (2004)	2004
		Melin *et al.* (2014)	2014			Wieser *et al.* (2004)	2004
		Fantle (2015)	2015			Heuser *et al.* (2005)	2005
						Böhm *et al.* (2006)	2006
						Chu *et al.* (2006)	2006
CaCO3	2	Skulan *et al.* (1997)	1997			Farkaš *et al.* (2007b)	2007
		Skulan et DePaolo (1999)	1999			Farkaš *et al.* (2007a)	2007
						Amini *et al.* (2008)	2008
CaF2	3	Heuser *et al.* (2002)	2002			Heuser et Eisenhauer (2008)	2008
		Gussone *et al.* (2003)	2003			Kasemann *et al.* (2008)	2008
		Hippler *et al.* (2003)	2003			Amini *et al.* (2009)	2009
						Schmitt *et al.* (2009)	2009
ICP1	3	Morgan *et al.* (2011)	2011			Teichert *et al.* (2009)	2009
		Morgan *et al.* (2012a)	2012			Huang *et al.* (2010)	2010
		Channon *et al.* (2015)	2015			Tipper *et al.* (2010)	2010
						Cobert *et al.* (2011)	2011
Seawater	17	Hippler *et al.* (2003)	2003			Farkaš *et al.* (2011)	2011
		Schmitt *et al.* (2003b)	2003			Heuser *et al.* (2011)	2011
		Wieser *et al.* (2004)	2004			Hindshaw *et al.* (2011)	2011
		Perakis *et al.* (2006)	2006			Müller *et al.* (2011)	2011
		Steuber et Buhl (2006)	2006			Reynard *et al.* (2011a)	2011
		Farkaš *et al.* (2007b)	2007			Holmden *et al.* (2012)	2012
		Skulan *et al.* (2007)	2007			Huang *et al.* (2012)	2012
		Page *et al.* (2008)	2008			Colla *et al.* (2013)	2013
		Jacobson et Holmden (2008)	2008			Harouaka *et al.* (2014)	2014
		Holmden et Bélanger (2010)	2010			Hindshaw *et al.* (2013a)	2013
		Blättler *et al.* (2015)	2015			Ockert *et al.* (2013)	2013
		Husson *et al.* (2015)	2015			Schmitt *et al.* (2013)	2013
		Lehn et Jacobson (2015)	2015			Li *et al.* (2016)	2015
		Jackson *et al.* (2015)	2015			Romaniello *et al.* (2015)	2015
		Du Vivier *et al.* (2015)	2015			Zhu *et al.* (2015)	2015
		Hippler *et al.* (2013)	2013			Feng *et al.* (2016)	2016
		Melin *et al.* (2014)	2014			Heuser *et al.* (2016a)	2016
SRM915b		Heuser et Eisenhauer (2008)	2008				
		Wombacher *et al.* (2009)	2009				
		Schiller *et al.* (2012)	2012				

de l'ensemble des analyses faites sur des standards au LGLTPE au cours de cette thèse permettant de discuter de la conversion de valeurs de delta de la littérature exprimées relativement à d'autres standards de référence que *ICP Ca Lyon*.

Sauf indication contraire, l'ensemble des données présentées au sein de ce manuscrit sont exprimées relativement à l'*ICP Ca Lyon*.

2 Principe de la compilation

Les analyses publiées dans les références citées en Tableau 4.2 ont été compilées. Ceci comprend les descriptions des standards de référence utilisés ainsi que des standards secondaires, les valeurs moyennes des $\delta^{44/40}Ca$ ou $\delta^{44/42}Ca$, les intervalles de confiance ou les précisions associées, les nombres d'analyses et les types de spectromètres utilisés.

Les analyses de compositions isotopiques du Ca par TIMS permettent les mesures de rapports $^{44}Ca/^{40}Ca$ et donc l'expression de $\delta^{44/40}Ca$. En effet, l'absence de l'Ar, utilisé pour l'introduction en MC-ICP-MS, permet la mesure de $^{40}Ca^{+}$. Afin de convertir en $\delta^{44/42}Ca$ les données publiées en $\delta^{44/40}Ca$, j'utilise la loi exponentielle des fractionnements dépendants de la masse, qui prédit la relation suivante entre ces deux grandeurs :

$$\delta^{44/40}Ca \simeq \frac{\ln(M_{44}/M_{40})}{\ln(M_{44}/M_{42})} \times \delta^{44/42}Ca \simeq 2.048 \times \delta^{44/42}Ca \tag{4.1}$$

où M se rapporte à la masse atomique de l'isotope du Ca considéré.

Je choisis cette loi car elle décrit les fractionnements induits par le TIMS et le MC-ICP-MS. Elle est par ailleurs celle régulièrement utilisée pour décrire les fractionnements cinétiques, fréquents en biologie (Young *et al.* 2002). Il est également possible d'utiliser la loi inverse, qui prédit un facteur de 2.099. Cependant ce choix porte peu à conséquence car pour les variations observées, inférieures 3 ‰, les différences entre les valeurs converties selon l'une ou l'autre des lois seraient inférieures à 0.03 ‰ en $\delta^{44/42}Ca$, ce qui est en deçà des précisions de mesure.

B Compilation des principaux standards

Le SRM915a ayant été très utilisé, je compile à l'aide du logiciel R [1] les compositions des autres standards de référence relativement au SRM915a. Les principaux standards, de référence ou secondaires, ayant été analysés ou publiés relativement à SRM915a sont l'eau de mer (Seawater), le SRM915b, le SRM1486, BSE (dont les valeurs sont des concepts) et CaF2. Le bilan de la compilation de ces standards est présenté en Tableau 4.3, en Figure 4.1 et le détail des références est donné en Annexe B.

1. R Core Team (2016)

TABLEAU 4.3 – **Bilan de la compilation des compositions isotopiques des principaux standards.** $\delta^{44/42}Ca_{moy}$ (‰) se réfère à la valeur moyenne, 2SD à l'écart type, 2SE à l'erreur type (intervalle de confiance à 95 % du test t de Student), *Méd.* à la médiane, $Q_{25\%}$ au quartile des 25 % et $Q_{75\%}$ des 75 %. **Summary of isotope composition compilation of main standards.** $\delta^{44/42}Ca_{moy}$ (‰) refers to average value, 2SD is twice the standard deviation, 2SE is twice the standard error (95 % confidence interval from the Student's t-test), *Méd.* refers to median, $Q_{25\%}$ and $Q_{75\%}$ to the 25 % and 75 % percentiles, respectively.

Std. de réf.	**Std. exprimé**	*n réf.*	$\delta^{44/42}Ca_{moy}$	*2SD*	*2SE*	*Méd.*	$Q_{25\%}$	$Q_{75\%}$
SRM915a	**Seawater**	*39*	**0.92**	0.06	0.01	*0.92*	*0.90*	*0.93*
SRM915a	**SRM915b**	*7*	**0.37**	0.07	0.03	*0.35*	*0.35*	*0.39*
SRM915a	**SRM1486**	*5*	**-0.49**	0.04	0.03	*-0.50*	*-0.50*	*-0.49*
SRM915a	**BSE**	*5*	**0.48**	0.02	0.01	*0.49*	*0.47*	*0.49*
SRM915a	**CaF2** (GEOMAR)	*13*	**0.70**	0.04	0.01	*0.70*	*0.69*	*0.71*
Seawater	**$CaCO_3$** (Skulan *et al.* 1997)	*2*	**-0.43**	0.04	-	-	-	-

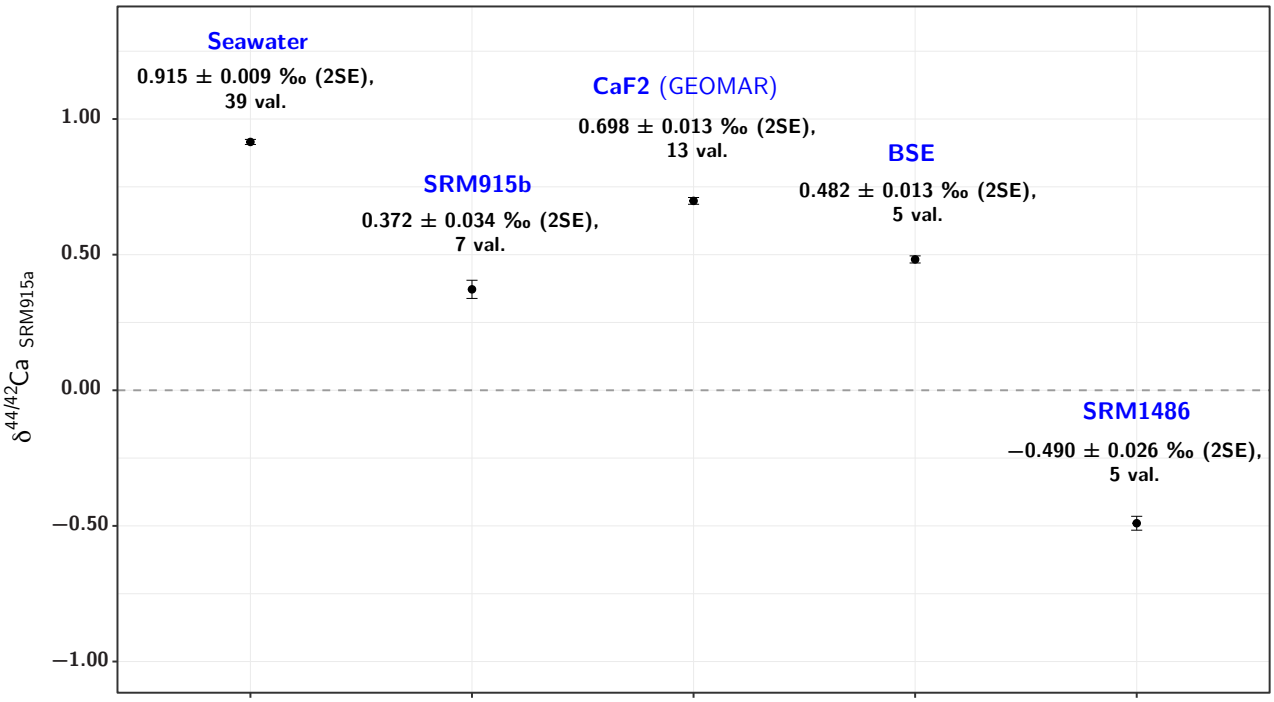

FIGURE 4.1 – **Valeurs moyennes des $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *SRM915a*) de la littérature pour les principaux standards.** Les barres d'erreur sont les 2SE (intervalle de confiance à 95 %, test t de Student). Chaque point est associé à sa valeur moyenne, son 2SE, et le nombre de valeurs de la littérature utilisées pour le calcul de la moyenne. **Average values of $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. to *SRM915a*)** of main literature standards. Error bars are the 2SE (95 % confidence interval from the Student's t-test). Each point is presented together with average value, 2SE and number of values from literature used for estimation.

II Compilation des analyses de standards des travaux de thèse

Huit standards différents ont été analysés au cours de ces travaux de thèse. Ce sont les SRM915a et 915b, les SRM1400 et 1486, l'eau de mer (IAPSO et prélevée), CBE, BCR380-R et ICP1. Tous ont nécessité des purifications sur résine cationique (AG50-WX12) et sur résine strontium spécifique (Sr-Spec) selon le protocole décrit au chapitre précédent, à l'exception de SRM915a et ICP1 fournis déjà purifiés par l'équipe du Professeur A. Anbar, ASU, USA (Morgan *et al.* 2011; 2012a, Channon *et al.* 2015). Les compositions isotopiques de ces standards sont variées et permettent de vérifier la dépendance en masse de ces mesures en les représentant dans un diagramme à trois isotopes ($\delta^{43/42}Ca$ en fonction de $\delta^{44/42}Ca$) présenté en Figure 4.2.

Les compositions mesurées se répartissent sur une droite dont la régression linéaire donne une pente proche de 0.5 et une enveloppe de confiance à 95 % ne permettant pas de dire si une loi de fractionnement prédomine, entre loi exponentielle, inverse et puissance (Figure 4.2). En revanche, la composition du SRM1486 (404 analyses) se trouve sur la droite de la loi exponentielle (agrandissement sur Figure 4.2) et les intervalles de confiance ne semblent pas recouper les droites prédites par les lois inverse et puissance. Le fait que la composition isotopique d'un os de mammifère (vache) soit fractionnée selon une loi exponentielle pourrait suggérer un fractionnement dominé par les effets isotopiques cinétiques (Young *et al.* 2002). Ceci irait dans le sens de fractionnements biologiques des isotopes du Ca dominés par les effets cinétiques, cependant cette discussion dépasse le propos de ces travaux de thèse et nécessiterait une étude dédiée.

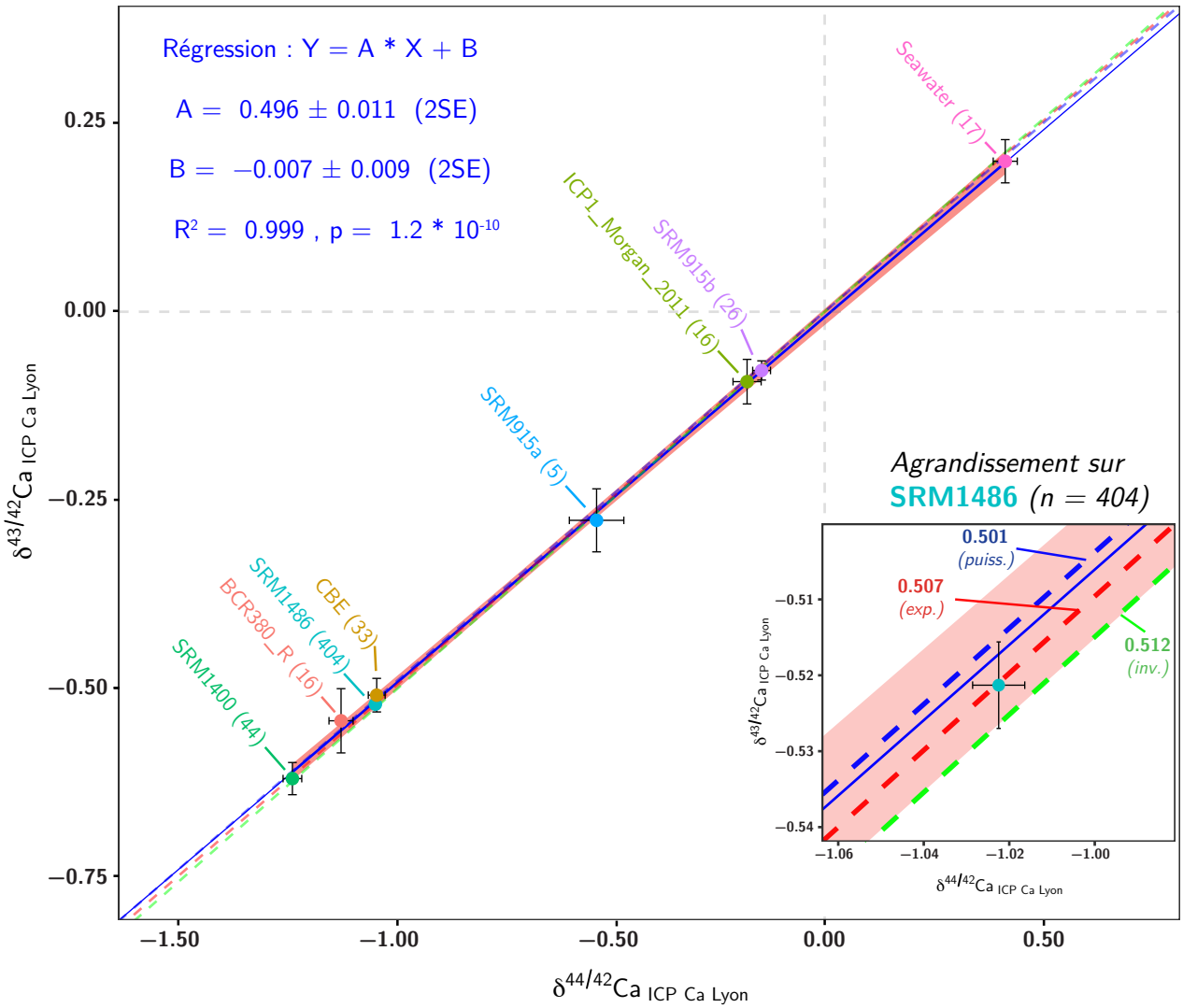

FIGURE 4.2 – **Diagramme à trois isotopes : $\delta^{43/42}$Ca en fonction de $\delta^{44/42}$Ca** (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) pour l'ensemble des standards analysés à Lyon. Les barres d'erreur sont les 2SE (intervalle de confiance à 95 %, test t de Student). La droite bleue est la droite de régression linéaire dont l'équation est donnée en bleu. Les droites pointillées correspondent aux droites de fractionnement de la masse suivant une loi puissance (bleu), exponentielle (rouge) et inverse (vert). Les valeurs des pentes de ces droites sont données dans la figure d'agrandissement sur SRM1486. L'enveloppe rouge délimite l'intervalle de confiance à 95% sur la régression linéaire. Le nombre de mesures est donné entre parenthèses avec chaque nom de standard. **Three isotope diagram : $\delta^{43/42}$Ca as a function of $\delta^{44/42}$Ca** (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) for all standards measured in Lyon. Error bars are 2SE (95 % confidence interval from the Student's t-test). Blue line represents the linear regression, for which equation is given in blue. Dotted lines correspond to mass fractionation lines for power (blue), exponential (red) and inverse (green) laws. Values of the slopes of these lines are given in graph zooming on SRM1486. Red envelopped delimits 95 % confidence interval of linear regression. Number of analyses is given in parenthesis together with name of each standard.

Le SRM1486 a été utilisé comme standard secondaire systématique au cours de la plupart des sessions analytiques. En tout, plus de 400 mesures ont été réalisées. Analysé en tant qu'échantillon, en moyenne tous les 6 échantillons, il permet de contrôler la justesse des mesures sur le long terme, selon la session ou selon la série de purifications par chromatographie. Les moyennes des mesures réalisées sur le SRM1486 pour chaque session analytique sont présentées en fonction de la session d'analyse en figure 4.3.

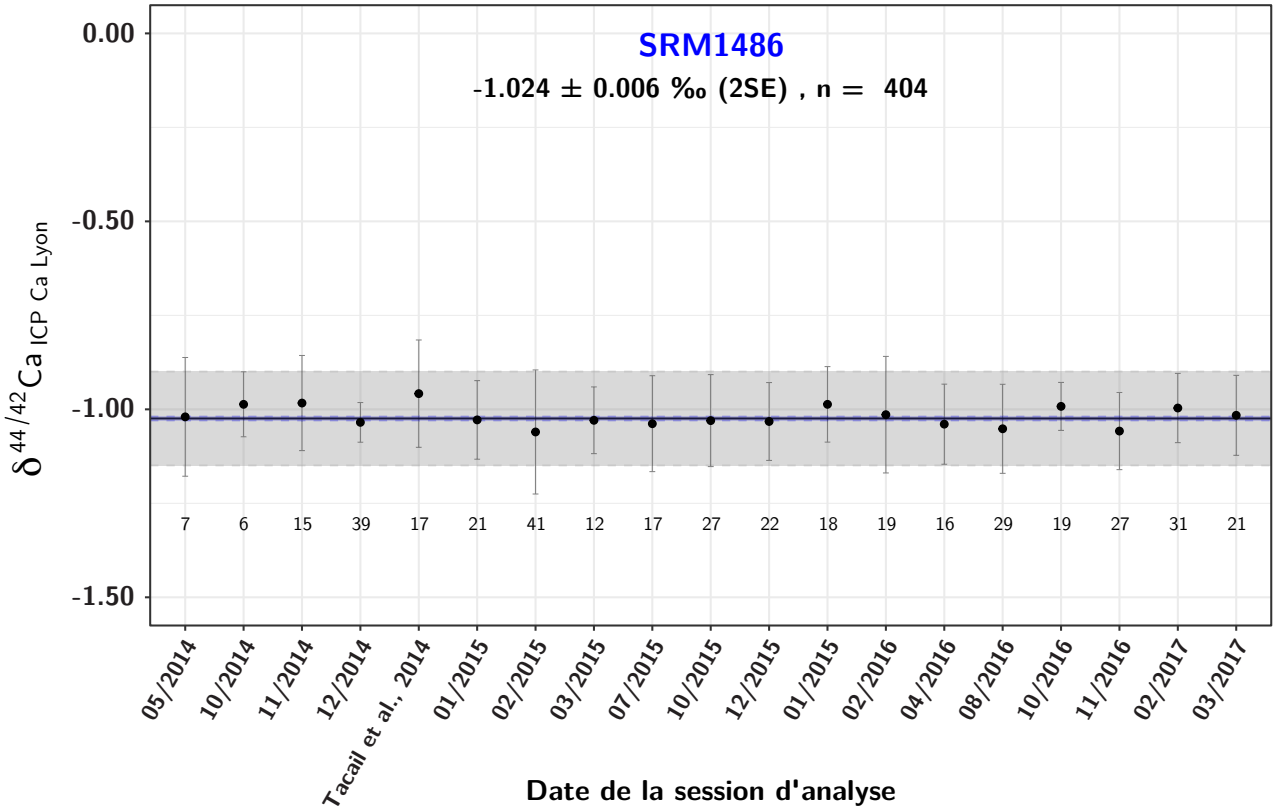

FIGURE 4.3 – **$\delta^{44/42}$Ca (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) du SRM1486 au cours des sessions analytiques de 2014 à 2017**. Chaque point est une moyenne sur n analyses (nombre associé), les barres d'erreur sont les 2SD. La droite noire est la moyenne des 404 analyses, la zone grisée délimite le double de l'écart-type, la zone bleutée délimite l'intervalle de confiance à 95% donné par le test t de Student.
$\delta^{44/42}$Ca (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) for SRM1486 along analytical sessions from 2014 to 2017. Each point is a mean over n analyses (associated number), error bars are 2SD. The black line is the average over the 404 analyses, greyish area delimits 2SD, bluish delimits 2SE (95 % confidence interval from the Student's t-test).

La précision externe sur le long terme (2SD) est de 0.13 ‰ d'après les 404 analyses de SRM1486. L'ensemble des compositions des 8 standards analysés est présenté en tableau 4.4 et figure 4.4.

TABLEAU 4.4 – **Bilan des compositions mesurées des standards** (‰, rel. *ICP Ca Lyon*). ***n*** se rapporte au nombre d'analyses, *2SD* au double de l'écart-type et *2SE* à l'intervalle de confiance à 95 % d'après le test t de Student.
Summary of measured standards isotope compositions (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*). ***n*** refers to number of analyses, *2SD* is twice the standard deviation and *2SE* (95 % confidence interval from the Student's t-test).

Std de Réf.	Std exprimé	*n*	$\delta^{44/42}$Ca	*2SD*	*2SE*
ICP Ca Lyon	**SRM915b**	26	**-0.14**	0.10	0.02
ICP Ca Lyon	**SRM915a**	5	**-0.52**	0.10	0.06
ICP Ca Lyon	**SRM1400**	44	**-1.21**	0.14	0.02
ICP Ca Lyon	**SRM1486**	404	**-1.02**	0.13	0.01
ICP Ca Lyon	**Seawater**	17	**0.41**	0.11	0.03
ICP Ca Lyon	**CBE**	33	**-1.02**	0.11	0.02
ICP Ca Lyon	**BCR380-R**	16	**-1.10**	0.10	0.03
ICP Ca Lyon	**ICP1 Morgan 2011**	16	**-0.18**	0.12	0.03

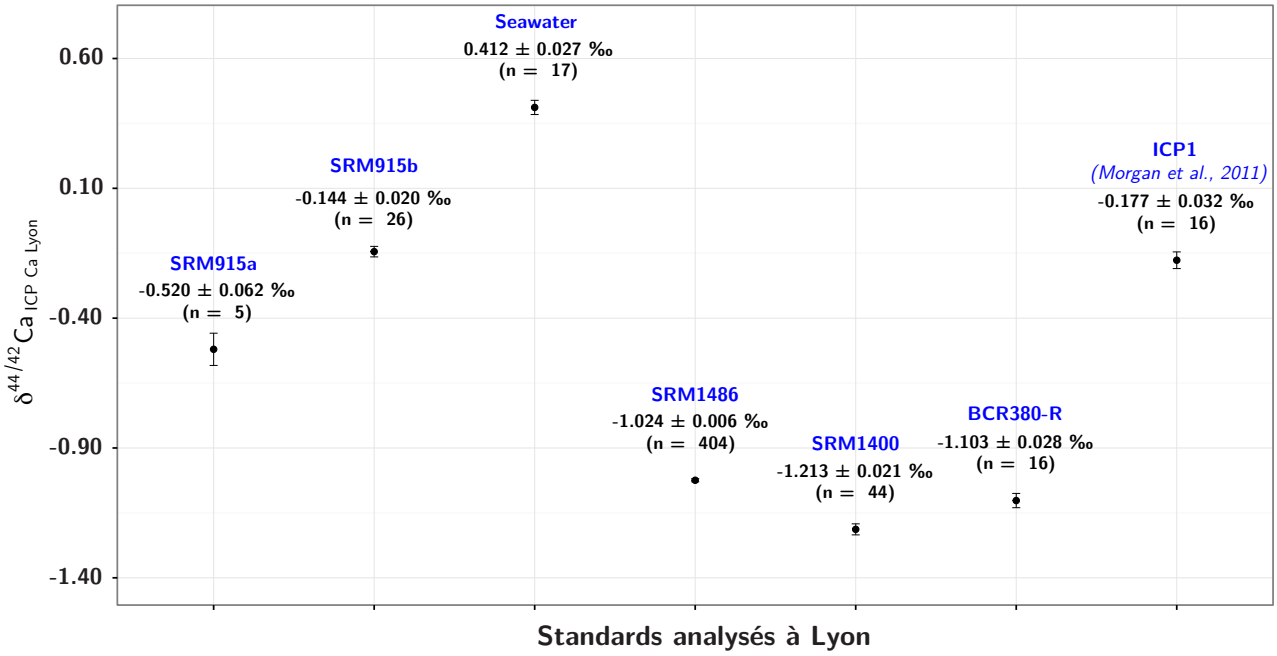

FIGURE 4.4 – **$\delta^{44/42}$Ca (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) de l'ensemble des standards de compositions isotopiques du Ca analysés à Lyon.** Chaque point est une moyenne sur n analyses (nombre associé), les barres d'erreur sont les 2SE (intervalle de confiance à 95% du test t de Student).
$\delta^{44/42}$Ca (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) of all standards isotope compositions measured in Lyon. Each point is an average over the n analyses (associated number), error bars are 2SE (95 % confidence interval from the Student's t-test).

III Conversion des données de la littérature

A Composition du SRM915a, justesse et principe de conversion

SRM915a et justesse des mesures : La représentation graphique de quatre standards dont des compositions ont été publiées et acceptées, avec SRM915a pour standard de référence, en fonction des compositions de ces mêmes standards analysés relativement à *ICP Ca Lyon*, est donnée en figure 4.5.

Les quatre standards s'alignent sur une droite parallèle à la droite identité et dont l'écart moyen à l'identité est de 0.518 ± 0.025 ‰ (2SD). Cette valeur permet d'estimer la composition de SRM915a à -0.518 ± 0.025 ‰. La justesse des mesures réalisées au cours de ces travaux peut donc être confirmée car les relations entre standards internationaux sont conservées.

Conversions depuis SRM915a : Les conversions de données exprimées relativement à SRM915a sont donc réalisées en leur additionnant -0.518 ‰. La conversion par soustraction est une approximation acceptable tant que la valeur absolue du produit de la valeur à convertir par celle de conversion reste inférieur à 10 ‰ en valeur absolue (Heuser *et al.* 2016b), ce qui est le cas pour les données de $\delta^{44/42}Ca$, dont la variabilité naturelle observée est contenue entre -3 et $+3$ ‰ en $\delta^{44/42}Ca$ (Figure 1.13).

Ainsi pour convertir la valeur d'un matériau *X* exprimée relativement à SRM915a ($\delta^{44/42}Ca^{X}_{SRM915a}$), je calculerai :

$$\delta^{44/42}Ca^{X}_{ICP\,Ca\,Lyon} = \delta^{44/42}Ca^{X}_{SRM915a} + \delta^{44/42}Ca^{SRM915a}_{ICP\,Ca\,Lyon} = \delta^{44/42}Ca^{X}_{SRM915a} - 0.518 \qquad (4.2)$$

où les indices *ICP Ca Lyon* et *SRM915a* se rapportent au standard de référence utilisé dans la valeur de δ associée, et les exposant aux matériaux dont la valeur est exprimée.

Conversion du $CaCO_3$ (Skulan *et al.* 1997) : Trois publications font état de données exprimées relativement à un carbonate de Ca (Skulan *et al.* 1997, Skulan et DePaolo 1999, DePaolo 2004). Deux de ces publications présentent des compositions de l'eau de mer (Skulan *et al.* 1997, Skulan et DePaolo 1999) permettant de réaliser la conversion suivante.

$$\delta^{44/42}Ca^{CaCO_3}_{ICP\,Ca\,Lyon} = \delta^{44/42}Ca^{CaCO_3}_{Seawater} + \delta^{44/42}Ca^{Seawater}_{ICP\,Ca\,Lyon} = -0.43 + 0.41 \simeq -0.02\,‰ \qquad (4.3)$$

Ainsi, l'ensemble des compositions de standards publiées et exprimées relativement à SRM915a est converti relativement à *ICP Ca Lyon* de cette manière et présenté en Tableau 4.5.

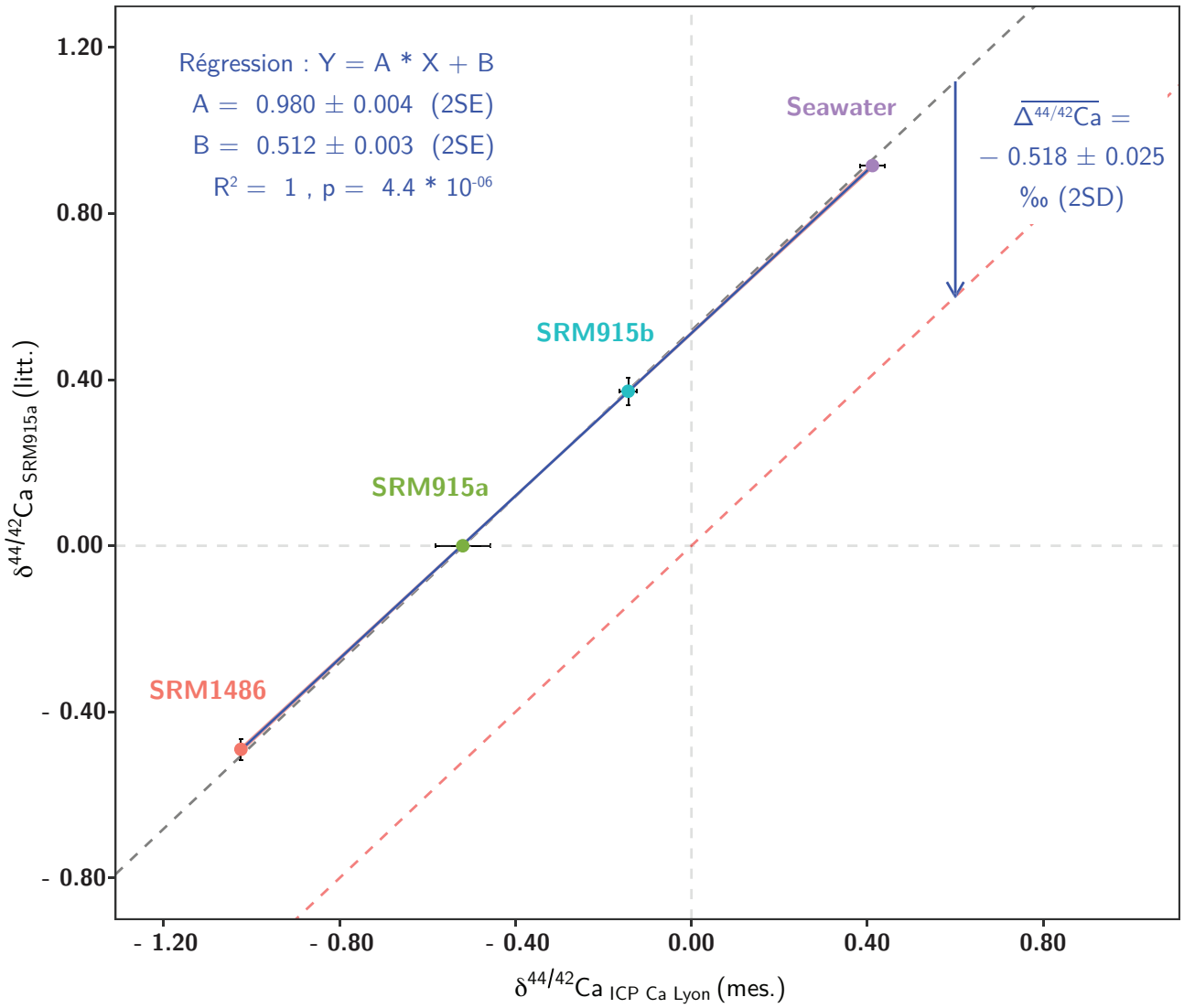

FIGURE 4.5 – **$\delta^{44/42}$Ca de la littérature (‰, rel. *SRM915a*) en fonction de $\delta^{44/42}$Ca mesurés (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) pour 4 standards internationaux.** La droite bleue est la droite de régression linéaire, dont l'équation associée est présentée en bleu ; la droite en pointillés rouges est la droite $y = x$, la droite en pointillés gris est la droite de pente 1 et d'ordonnée égale à 0.518 ‰. La valeur de **0.518**‰ est la valeur utilisée pour les conversions de jeux de données exprimés relativement au SRM915a. Les barres d'erreur sont les 2SE (intervalle de confiance à 95 %, test t de Student).

Literature $\delta^{44/42}$Ca average values (‰, rel. to *SRM915a*) as a function of measured $\delta^{44/42}$Ca values (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) for 4 international standards. The blue line is regression line, for which equation is given in blue ; the dotted red line is the identity line ($y = x$), dotted grey line is the line with a slope 1 and y-intercept of 0.518 ‰. The **0.518**‰ value is the one used for conversions of datasets initially expressed relatively to SRM915a. Error bars are 2SE (95 % confidence interval from the Student's t-test)

TABLEAU 4.5 – **Bilan des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) des standards mesurés ou convertis vers *ICP Ca Lyon*.** *Mes* : Mesuré, *Conv.* : Converti, ***n*** : nombre de mesures ou de valeurs de la littérature, ***2SD*** : double de l'écart type, ***2SE*** : double de l'erreur type (intervalle de confiance à 95 %, test t de Student), **Std. de conv.** : Standard utilisé pour réaliser la conversion, **Val. de conv.** : Valeur (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) utilisée pour réaliser la conversion. Les valeurs en bleu sont celles utilisées dans le reste de la thèse pour convertir les données de la littérature exprimées relativement au standard considéré. **Summary of $\delta^{44/42}Ca$ values (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) of measured standards or converted to *ICP Ca Lyon*.** *Mes* : Measured, *Conv.* : Converted, ***n*** : number of analyses or literature values, ***2SD*** : two times standard deviation, ***2SE*** : twice the standard error (95 % confidence interval from the Student's t-test), **Std. de conv.** : Standard used for conversion, **Val. de conv.** : $\delta^{44/42}Ca$ value (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) used for conversion. Values in blue are the ones used to convert all literature datasets in the whole thesis. [a] : Heuser *et al.* (2002) ; [b] : Skulan *et al.* (1997) ; [c] : Morgan *et al.* (2011)

Standard	Méthode	*n*	$\delta^{44/42}Ca_{Lyon}$	*2SD*	*2SE*	Std. de conv.	val. de conv.
SRM915a	Mes.	*5*	**-0.520**	0.100	0.062	-	-0.518
	Conv.	-	**-0.518**	-	-	SRM915a	-0.518
Seawater	Mes.	*17*	**0.412**	0.107	0.027	-	-0.518
	Conv.	*39*	**0.397**	0.057	0.009	SRM915a	-0.518
SRM915b	Mes.	*26*	**-0.144**	0.101	0.020	-	-0.518
	Conv.	*7*	**-0.146**	0.073	0.034	SRM915a	-0.518
SRM1486	Mes.	*404*	**-1.024**	0.125	0.006	-	-0.518
	Conv.	*5*	**-1.009**	0.041	0.026	SRM915a	-0.518
SRM1400	Mes.	*44*	**-1.213**	0.140	0.021	-	-0.518
CaF_2[a]	Conv.	*13*	**0.180**	0.041	0.013	SRM915a	-0.518
$CaCO_3$[b]	Conv.	*2*	**-0.023**	0.041	-	Seawater	0.412
BSE	Conv.	*5*	**-0.036**	0.021	0.013	SRM915a	-0.518
ICP1[c]	Mes.	*16*	**-0.177**	0.120	0.032	-	-0.518
CBE	Mes.	*33*	**-1.021**	0.109	0.019	-	-0.518
BCR380-R	Mes.	*16*	**-1.103**	0.103	0.028	-	-0.518

B Création d'une base de données de la littérature

Afin de manipuler au mieux les données de la littérature et de faciliter leur conversion, j'ai constitué une base de plus de 1800 données de la littérature référençant des compositions isotopiques de matériaux issus de systèmes et sous-systèmes géologiques et biologiques.

Pour chaque composition isotopique compilée, les informations suivantes ont été renseignées :

— **Standard de référence** et sa description

— **Année et référence** de la publication

— **Type et marque** de spectromètre de masse utilisé

— **Rapport isotopique** mesuré ($^{44}Ca/^{40}Ca$ ou $^{44}Ca/^{42}Ca$)

— **Valeur** de $\delta^{44/40}Ca$ ou $\delta^{44/42}Ca$, incertitudes et nombres de mesures

— **Catégorie du matériau** (biologique ou minéral)

— **Système** duquel le matériau est issu, *i.e.* nom de l'espèce animale ou végétale, de l'assemblage géologique *etc.*

— **Type de matériau**, *i.e.* type de tissu biologique, nature de lithologie *etc.*

— **Sexe, âge et catégorie d'âge** des individus lorsque cela était disponible

— **Période ou âge** géologique ou historique de laquelle la matériau date, *i.e.* actuel, ère géologique ou âges historique ou préhistorique *etc.*

— **Environnement** continental ou marin

— **Localité**, pays ou région de provenance

— Ainsi que toutes informations ou grandeurs complémentaires pouvant être discutées par la suite

Cette base de données a été construite en vue d'être utilisée et traitée grâce au logiciel R (R Core Team 2016). Un code informatique a pour l'occasion été développé permettant les calculs automatiques des valeurs de conversion des standards à partir du jeu de données de standards décrit précédemment, ainsi que les conversions automatiques des compositions isotopiques compilées dans cette présente base de données.

En conclusion, j'ai converti les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de standards de la littérature vers *ICP Ca Lyon*. Quand les données sont disponibles, les standards présentent des valeurs converties et mesurées qui ne peuvent être distinguées. Ceci démontre la justesse des mesures de $\delta^{44/42}Ca$ réalisées au cours de ces travaux dans la limite des incertitudes.

Je propose par ailleurs l'utilisation des standards de matrices minérale et biologique que sont SRM1400 (os calciné) et BCR380-R (lait en poudre) pour lesquels je mesure des compositions proches de -1 ‰, en accord respectif avec les valeurs d'os de vache préalablement mesurés (*e.g.* SRM1486) et les valeurs de laits de vache analysés préalablement ($\delta^{44/42}Ca$ variant entre et -1.0 et -1.2 ‰, rel. *ICP Ca Lyon*, d'après Chu *et al.* (2006)).

On constate également que *ICP Ca Lyon* présente une composition isotopique très proche de *Bulk Silicate Earth* (BSE, environ -0.04 ‰), ce qui facilite la réflexion en terme de fractionnements relatifs à la composition moyenne du Ca de l'environnement (non biologique), dont la composition sera proche de 0 ‰ au premier ordre.

Enfin, ce travail permet également de dégager des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ exprimées par rapport à *ICP Ca Lyon* de standards de référence utilisés fréquemment dans la littérature. Ces valeurs (en bleu dans le tableau 4.5) seront donc utilisées pour l'ensemble des conversions des valeurs de la littérature discutées dans ces travaux de thèse.

Le principe général de la conversion des données de la littérature est donc :

$$\delta^{44/42}Ca^{\text{éch.}}_{ICP\,Ca\,Lyon} = \delta^{44/42}Ca^{\text{éch.}}_{Std_x} + \delta^{44/42}Ca^{Std_x}_{ICP\,Ca\,Lyon} \tag{4.4}$$

où *éch.* se rapporte à l'échantillon provenant de la littérature et Std_x au standard de référence utilisé dans l'article considéré.

Chapitre 5

Résolution spatiale des analyses de tissus minéralisés

Sommaire

I Introduction 72

II Article « *Precise analysis of Ca stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MCICPMS* » 74

I Introduction

Les tissus minéralisés des mammifères sont majoritairement constitués de bioapatite. Par ailleurs, l'émail et la dentine des dents présentent des structures incrémentées, héritées de la croissance dentaire. Ces tissus se forment au cours de la croissance de l'individu dès le développement *in utero* pour certaines dents, comme les dents temporaires (ou de lait) jusqu'à l'âge adulte comme les troisièmes molaires, ou dents de sagesse chez l'humain (*e.g.* AlQahtani *et al.* 2010). Ce mode de croissance permet l'enregistrement chronologique d'informations propres à la physiologie et à l'environnement de l'individu. Ces informations peuvent être décelées dans la microstructure des tissus ou dans leurs compositions chimiques ou isotopiques (*e.g.* Sr, Ba, $\delta^{15}N$ ou $\delta^{13}C$).

L'étude du cycle des isotopes du Ca chez l'humain bénéficierait donc de l'étude des variations spatiales des rapports isotopiques au sein de ces tissus incrémentés. Une question centrale dans l'étude de la physiologie isotopique du Ca concerne les transitions nutritionnelles vécues par le nouveau-né, à la naissance puis au sevrage du lait maternel. Ces transitions impliquent des changements drastiques de mode d'alimentation et de nature des sources de Ca.

Afin d'étudier ces variations, il a préalablement été nécessaire de développer la méthode permettant la mesure des variations de $\delta^{44/42}Ca$ de ces tissus. Le Ca de l'émail dentaire est abondant, plus de 36 % en masse contre 27 % dans la dentine (LeGeros et Legeros 1984), ce qui permet l'échantillonnage de quantités réduites de matière. Par ailleurs, l'absence de matière organique facilite les mesures par MC-ICP-MS car les macromolécules, comme le collagène de la dentine, provoquent des effets de matrice déstabilisant les conditions d'analyse. Enfin, dans les contextes fossiles ou archéologiques, l'émail est un matériau de choix car il est peu affecté par les processus diagénétiques. Cependant l'émail dentaire humain présente des dimensions qui requièrent des échantillonnages de résolution spatiale poussée, avec des hauteurs de couronne variant entre quelques millimètres et un centimètre ou plus et des épaisseurs de la surface jusqu'à la jonction émail-dentine variant entre quelques dizaines de microns à un peu plus de deux millimètres.

Deux méthodes ont été envisagées et testées au cours de cette thèse. J'ai développé une méthode d'analyse *in situ* par ablation laser couplée au MC-ICP-MS permettant la mesure des $\delta^{44/42}Ca$ de l'émail dentaire sans chimie préalable. En parallèle, j'ai également réalisé ces mêmes mesures par prélèvement mécanique de microéchantillons (moins de 100 μg) pour lesquelles les compositions isotopiques du Ca ont été mesurées en configuration classique, c'est-à-dire en solution.

L'ablation laser consiste à tirer de manière répétée avec un faisceau laser focalisé sur la surface d'un échantillon solide (Figure 5.1). L'impact de la lumière induit la fusion et la vaporisation locale de la matière puis la formation d'un plasma et enfin la formation de particules après condensation de la matière vaporisée. Les particules sont transportées par un flux de gaz porteur (Ar ou He par exemple) jusqu'à la torche plasma

du spectromètre de masse où les particules seront en partie atomisées et ionisées et où l'ensemble des éléments ionisés positivement sera accéléré vers le tube de vol du spectromètre.

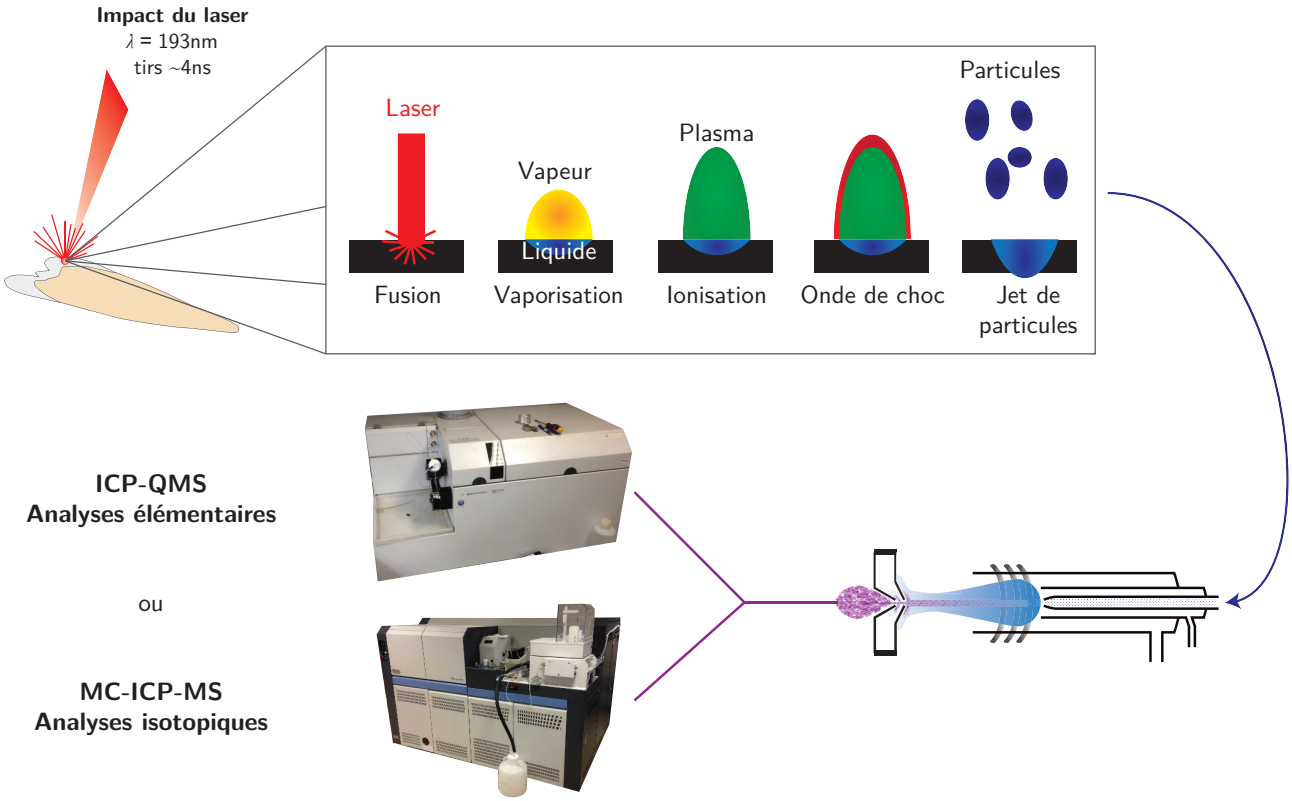

FIGURE 5.1 – **Principe de l'ablation laser couplée à des spectromètres à torche plasma et quadripôle ou multi-collection**. **Principle of laser ablation coupled to quadripole or multi-collector ICP-MS.** Adapté de Russo (2014).

Il est possible de coupler les lasers d'ablation à des spectromètres de masse à quadripôles afin de réaliser des analyses élémentaires *in situ* d'échantillons solides. Ceci permet de construire des profils de distributions spatiales d'éléments traces ou mineurs dans l'émail et a fait l'objet d'une étude pour les dents temporaires et permanentes (Tacail *et al.* 2017a, en Annexe C).

Il est également possible de réaliser des mesures de compositions isotopiques d'échantillons solides en couplant le laser à un MC-ICP-MS. Ce montage permet la mesure de compositions en isotopes radiogéniques ou de fractionnements isotopiques dépendants de la masse. Cependant la mesure de rapports isotopiques par ablation laser est complexe car l'absence de purification chimique conduit à des interférences et des effets de matrice ne pouvant être évités. Le Sr de la dent est par exemple introduit dans le plasma au même titre que le Ca et les isotopes doublement chargés interfèrent avec les isotopes du Ca mesurés. Les conditions d'analyse, et notamment les fractionnements instrumentaux, sont donc moins stables qu'en solution ce qui altère la justesse et/ou la précision des mesures.

Les mesures de rapports d'isotopes radiogéniques, comme les rapports $^{87}Sr/^{86}Sr$, sont possibles et relativement aisées car les normalisations, visant à éliminer la composante dépendante de la masse des

fractionnements, permettent de s'affranchir des fractionnements instrumentaux. En revanche, les mesures de compositions en isotopes stables sont plus complexes car cette normalisation n'est pas possible et il est nécessaire de développer d'autres méthodes permettant de stabiliser et de corriger le fractionnement instrumental.

Le microéchantillonnage par microfraisage est l'autre méthode ayant été évaluée. Une microfraiseuse (Micro-Drill) a été utilisée pour réaliser des fraisages de l'ordre de 350 à 400 μm de diamètre et d'autant de profondeur. La poudre récoltée représente 80 à 100 μg de matière soit environ 20 à 40 μg de Ca. L'échantillon est traité selon le protocole décrit préalablement et analysé en solution sur le MC-ICP-MS.

Les deux méthodes ont été développées et comparées dans l'article présenté dans ce chapitre.

II Article « *Precise analysis of Ca stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MCICPMS* »

Résumé *L'ablation laser (LA) est une technique présentant un possible intérêt pour la mesure des variations naturelles des compositions en isotopes du Ca ($\delta^{44/42}Ca$) au sein de minéraux riches en Ca. En effet, cette technique permet d'augmenter la résolution spatiale et évite le microéchantillonnage et la chimie humide qui s'en suit. Nous avons développé une méthode de normalisation avec des standards et des échantillons de matrices identiques. Nous avons utilisé un système d'ablation laser Excite 193 nm Photon Machines couplé à un MC-ICP-MS Neptune plus afin de mesurer les variations de $\delta^{44/42}Ca$ dans l'apatite de l'émail. Dans un premier temps, des analyses de haute précision des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ ont été réalisées en mode solution (SOL) sur un ensemble de 5 apatites ignées et 6 échantillons d'émail de dents modernes, après microéchantillonnage par l'utilisation d'un appareil Micro-Mill. Les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ s'étalent régulièrement entre -0.60 et +0.60 ‰ (par unité de masse atomique, u.m.a.). Dans un second temps, nous avons fritté un standard d'os calciné (SRM1400) ainsi que deux apatites synthétiques, enrichies ou non en Sr, au moyen de la technique de frittage dite de Spark Plasma sintering ou SPS. Les compositions en isotopes du Ca ont été analysées dans les échantillons par ablation laser en mode raster le long de profils de 600 par 85 μm. Les analyses d'échantillons étaient encadrées par des mesures du standard SRM1400. Nous obtenons un très bon accord entre les mesures réalisées en mode SOL et LA, c'est-à-dire que les $\delta^{44/42}Ca_{LA}$ représentées en fonction de $\delta^{44/42}Ca_{SOL}$ s'alignent sur une droite de pente 0.960±0.091 (2SE, $R^2 = 0.971$) et d'ordonnée à l'origine nulle (0.012±0.084 ‰, 2SE). Les résidus de la droite identité de l'ensemble des analyses sont inférieurs ou égaux à 0.1 ‰ par uma. Cependant, une différence constante et inexpliquée d'environ +0.13 ‰ marquait les valeurs de $\delta^{43/42}Ca_{LA}$, ce qui suggère une interférence isobare non corrigée sur l'isotope ^{43}Ca en mode LA. Nous avons également remarqué que les corrections des interférences dues au strontium (Sr) doublement chargé sont d'une importance cruciale pour la réalisation de mesures en*

accord entre les modes LA et SOL. En mode SOL, le Sr est éliminé par chromatographie échangeuse d'ions ce qui permet d'atteindre des rapports mesurés $^{87}Sr^{2+}/^{44}Ca$ *de l'ordre de* 10^{-5} *et* 10^{-6}*. En mode LA, ce rapport dépasse* 10^{-3}*. Nous montrons que la valeur du rapport* $^{87}Sr/^{86}Sr$ *utilisée pour la correction de ces interférences est importante pour la justesse et que les résidus optimisés de la droite identité sont obtenus pour une correction des interférences du Sr qui prend en compte un facteur de fractionnement de masse pour le Sr doublement chargé distinct de celui du Ca. Nous trouvons que l'émail des dents de lait est appauvri en isotopes lourds d'environ -0.35 à 0.40 ‰ (par u.m.a.) en comparaison avec l'émail de dents de sagesse. Cette différence est compatible avec les transitions d'une alimentation fondée sur la consommation de lait maternel vers une alimentation composée de végétaux et de viandes.*[1]

http://doi.org/10.1039/C5JA00239G

1. Les suppléments à cet article sont présentés en Annexe D.

Conclusion de la Partie I

Les échantillons de fluides et de tissus mous et minéralisés sont traités (digérés, purifiés et analysés) selon le protocole décrit dans le chapitre 3. Cette méthode est adaptée à ces matériaux et permet l'exploration des distributions des isotopes du Ca à travers les réservoirs de l'organisme. Les conditions d'analyse sur le MC-ICP-MS ainsi que l'absence de contaminations externes permet d'analyser des échantillons de l'ordre de 10 μg à 20 μg de Ca au minimum.

L'étude des variations spatiales des compositions en isotopes stables des tissus minéralisés et de l'émail dentaire en particulier, est rendue possible par la méthode d'ablation laser développée, ainsi que par le microéchantillonnage couplé à l'analyse en solution. Les résolutions spatiales de ces deux méthodes, de 300 à 500 μm, sont comparables. Cependant, l'ablation laser s'avère être fastidieuse et particulièrement dépendante de l'état des instruments (Laser d'ablation et MC-ICP-MS). L'ablation laser est en principe possible mais nécessitera probablement des modifications techniques voire des évolutions technologiques, permettant d'ee simplifier l'usage et d'en améliorer ses performances (précision, justesse, résolution). Le microéchantillonnage a donc été préféré pour la suite de ces travaux, notamment pour le chapitre 8.

Deuxième partie

Les sources de Ca, de l'écosystème à l'individu

Introduction à la Partie II

Dans cette partie, je m'attacherai à discuter des causes majeures des variabilités isotopiques imputables à l'alimentation.

Dans un premier chapitre (Chapitre 6), je commencerai par faire une revue de la littérature permettant de mieux apprécier la relation entre la composition isotopique de l'os et celle de la source chez les vertébrés. Puis je ferai brièvement état des résultats de trois études (Martin *et al.* 2015; 2017a;b) auxquelles j'ai participé et qui portent sur l'exploration et l'utilisation de l'effet trophique sur les compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés de vertébrés marins et continentaux.

Je réaliserai ensuite (Chapitre 7) un examen de la variabilité de l'alimentation humaine et des principaux facteurs qui en influencent la composition isotopique sur la base des données de la littérature.

Dans un troisième chapitre (Chapitre 8), je présenterai une étude de l'influence des transitions nutritionnelles précoces (naissance et sevrage) chez l'humain à travers le suivi des compositions isotopiques du Ca de l'émail dentaire de dents de lait d'individus d'histoires alimentaires connues.

Chapitre 6

$\delta^{44/42}Ca$ des tissus minéralisés et utilisation du Ca au sein des écosystèmes

Sommaire

I Relation entre alimentation et os 82

II Milieu marin 84

III Milieu continental terrestre 85

IV Sources primaires de Ca environnemental des vertébrés 86

I Relation entre alimentation et os

Le Ca des vertébrés provient majoritairement de l'alimentation à l'exception de certains groupes, comme les actinoptérygiens (poissons à nageoires rayonnées) ou les chondrichtyens (poissons cartilagineux), dont les homéostasies calciques impliquent également des échanges avec l'eau environnante à travers les branchies (*e.g.* Flik *et al.* 1995).

Il a été initialement proposé, puis confirmé depuis, que la composition isotopique de la source alimentaire détermine celle de l'organisme. En effet, pour les organismes dont les tissus osseux ont été analysés conjointement à leur alimentation (poulet, cheval, otarie, cerf élaphe, cochon nain de Göttingen et mouton), les os sont systématiquement appauvris en isotopes lourds relativement à la source (Figure 6.1). L'amplitude de la différence entre l'os et la source ($\Delta^{44/42}Ca_{os-source}$) a été initialement estimée à -0.65 voire -0.75 ‰ (Skulan et DePaolo 1999) mais celle-ci se limitait à 4 taxons dont un actinoptérygien, le mérou. L'étude des distributions isotopiques du Ca d'autres vertébrés a permis d'affiner l'estimation de la différence entre l'os et la source de Ca à -0.57±0.10 ‰ (Figure 6.1). Le mérou est exclu de cette discussion car seule l'eau de mer était prise en compte dans l'estimation de la composition de la source de Ca (Skulan et DePaolo 1999), ce qui ne permet pas de proposer une estimation de la composition moyenne de son alimentation. Par ailleurs, la physiologie des actinoptérygiens implique des sources de Ca alimentaire mais également de l'eau de mer, par le biais des branchies, ce qui n'est pas comparable à la situation des autres vertébrés considérés.

De ce constat est née l'hypothèse que les isotopes du Ca permettraient de reconstruire les niveaux trophiques des vertébrés (Skulan *et al.* 1997, Skulan et DePaolo 1999). Le niveau trophique est un index décrivant la position des espèces au sein d'un réseau trophique (Elton 1927). Il est obtenu par le calcul de la moyenne pondérée du nombre d'intermédiaires qu'il y a entre l'espèce étudiée et les producteurs primaires de niveau trophique égal à 1, auquel est ajoutée une unité (Elton 1927, Polis et Strong 1996). Depuis les producteurs primaires jusqu'aux superprédateurs, les niveaux trophiques s'étendent entre 1 et plus de 5 pour certaines espèces (Pauly *et al.* 1998). Ces index permettent de synthétiser les régimes alimentaires des espèces, de décrire les voies énergétiques ainsi que les dynamiques des réseaux trophiques et des écosystèmes.

Ainsi, selon l'hypothèse énoncée, à chaque niveau trophique, la physiologie de l'organisme serait à l'origine d'une baisse de sa valeur moyenne de $\delta^{44/42}Ca$ de l'ordre de -0.60 ‰ et le consommateur de niveau trophique supérieur consommerait ce Ca en appauvrissant à son tour la valeur de $\delta^{44/42}Ca$ de son organisme, et ainsi de suite.

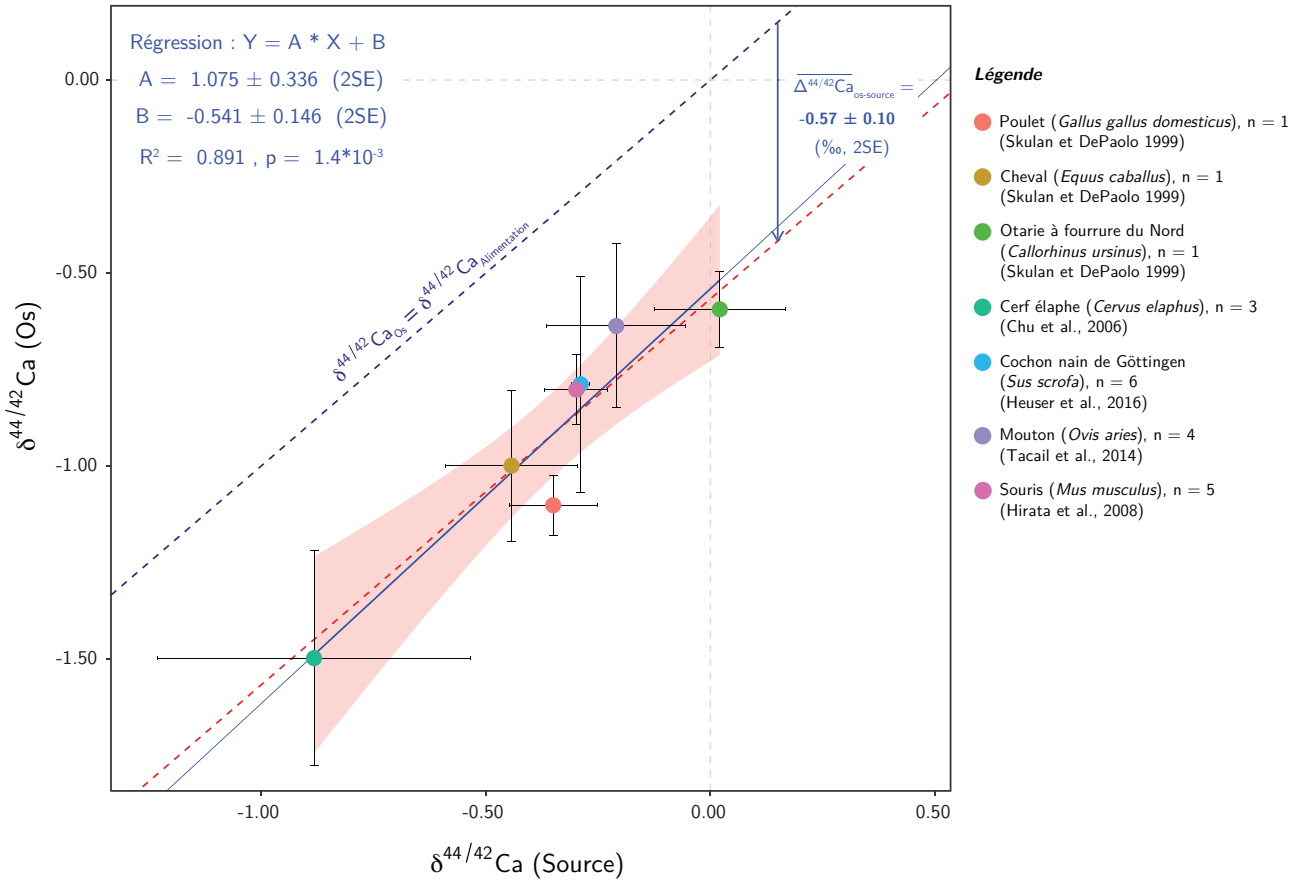

FIGURE 6.1 – **Valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de l'os en fonction de celles du Ca alimentaire (‰, rel. *ICP Ca Lyon*)**. La droite en pointillés bleus est la droite identité, la droite bleue en trait plein correspond à la droite de régression linéaire dont l'équation est donnée en bleu, la droite en pointillés rouges est la droite y = x - 0.57 (Skulan et DePaolo 1999, Chu *et al.* 2006, Hirata *et al.* 2008, Tacail *et al.* 2014, Heuser *et al.* 2016a). L'aire rosée correspond à l'intervalle de confiance à 95 % de la droite de régression. Chaque taxon est associé au nombre d'individus analysés et représentés par leur moyenne (point) et le double de l'écartype (barre d'erreur). **$\delta^{44/42}Ca$ of bone as a function of $\delta^{44/42}Ca$ values of dietary Ca (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*).** The blue dotted line is identity line, the full blue line corresponds to the regression for which equation is given in blue, le red dotted line is the y = x - 0.57 (Skulan et DePaolo 1999, Chu *et al.* 2006, Hirata *et al.* 2008, Tacail *et al.* 2014, Heuser *et al.* 2016a). The red shaded area delimits the 95 % confidence interval of the regression line. Each taxon is associated to the number of analyzed individuals and presented with their average composition (point) and the double of the standard deviation (error bar).

La définition de niveau trophique ne prend cependant en compte que les apports en énergie apportée principalement par l'alimentation solide. Les apports en minéraux d'autres sources mineures en termes énergétiques, comme les eaux de boisson ou les minéraux consommés intentionnellement, ne sont pas comptés. Une espèce de niveau trophique donné peut donc présenter des comportements alimentaires propres à son niveau trophique moyen, mais impliquant des sources de Ca variées voire complémentaires, qui pourraient ne pas refléter les sources d'énergie qui définissent son niveau trophique. Ainsi la clarté du signal trophique isotopique dépend probablement de l'adéquation ou non entre les sources d'énergie et la nature, la quantité relative et la composition isotopique de chaque source de Ca.

Les premières études montrent des résultats contrastés (Clementz *et al.* 2003, Melin *et al.* 2014, Heuser *et al.* 2011) et appellent à des explorations plus poussées, notamment du fait d'échantillonnages limités à peu d'individus par taxon. Par conséquent, il convient de tester systématiquement les relations entre les écologies documentées d'espèces d'un écosystème et les compositions isotopiques de leurs tissus minéralisés.

Trois études en milieux marins et continentaux ont été réalisées sur des faunes actuelles et fossiles afin de tester l'existence d'effets trophiques isotopiques. Celles-ci sont présentées en Annexes E (Martin *et al.* 2015), F (Martin *et al.* 2017b) et G (Martin *et al.* 2017a).

II Milieu marin

Brièvement, la première étude, présentée en Annexe E (Martin *et al.* 2015), avait pour but d'étudier les relations entre les compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés et les niveaux trophiques d'élasmobranches actuels d'écologies diverses (*e.g.* requins et raies), ainsi que de quelques mammifères marins. Les résultats, présentés en Figure 2 de l'article, permettent de confirmer l'existence chez les élasmobranches d'une diminution des rapports isotopiques moyens de l'émailloïde de groupes de niveaux trophiques croissants, *i.e.* zooplanctivores, piscivores primaires, secondaires et tertiaires. Les compositions isotopiques de l'émailloïde varient entre -0.27 et -0.78 ‰. La différence d'un niveau trophique au suivant est de l'ordre de -0.14 ‰ ce qui est bien inférieur à la différence entre la source et la composition isotopique de l'os observée chez les mammifères, d'environ -0.60 ‰. Plusieurs raisons sont avancées pour expliquer cet effet relativement systématique mais limité. Les élasmobranches obtiennent une partie de leur Ca à travers les branchies qui filtrent l'eau de mer en permanence (Flik *et al.* 1995). Cette source de Ca, en plus du Ca de l'alimentation, est de composition isotopique constante et particulièrement enrichie en isotopes lourds, ce qui pourrait « tamponner » les compositions isotopiques des organismes à branchies. Par ailleurs, les élasmobranches sont caractérisés par des squelettes cartilagineux et ont une physiologie du Ca différente des autres vertébrés à squelettes minéralisés comme les mammifères.

La confirmation de l'existence d'un effet trophique relativement marqué chez les élasmobranches a conduit à l'exploration de la structure d'un écosystème fossile datant de la fin du Crétacé, dans une étude

présentée en Annexe F (Martin *et al.* 2017b). Des échantillons d'émail et d'émailloïde de dents fossiles de poissons téléostéens, d'élasmobranches et de reptiles marins ont été analysés. Cette étude a permis de discuter de l'écologie des grands reptiles marins que sont les mosasauridés et les plésiosaures vivant dans une zone d'upwelling peu avant leur extinction lors de la crise crétacé tertiaire. Les résultats indiquent que les compositions isotopiques dépendent des niveaux trophiques mais que les grands reptiles marins présentent des compositions relativement homogènes malgré une diversité phénotypique prononcée, interprétée comme le signe d'une forte diversité d'écologies. Cette étude indiquerait que la grande abondance de nutriments, et donc d'organismes de niveaux trophiques intermédiaires peu diversifiés, aurait favorisé le développement d'une faune diversifiée de grands reptiles marins de niveaux trophiques supérieurs mais identiques. Cette structure d'écosystème, contrôlée par l'abondance d'organismes intermédiaires, est qualifiée de *wasp-waist*, en taille de guêpe, illustrant le contrôle qu'une faible diversité de nourriture abondante exerce sur des espèces du haut de la chaîne alimentaire, diversifiées, mais vulnérables car dépendantes de la constance de ces ressources.

III Milieu continental terrestre

L'étude de deux assemblages de restes de faunes quaternaires des grottes de Jaurens, en France (entre 30 et 33 ka BP) et de Scladina, à Sclayn en Belgique (entre 36 et 40 ka BP) a permis de discuter de la relation entre écologie et composition isotopique du Ca des os et des dents de mammifères continentaux terrestres (étude présentée en Annexe G, Martin *et al.* (2017a)). En bref, ces assemblages permettent de constater que les compositions isotopiques d'individus des mêmes espèces sont relativement groupées et que les carnivores tendent à présenter des compositions isotopiques appauvries en isotopes lourds relativement aux herbivores, malgré un certain recouvrement et des compositions variables entre herbivores. Cette observation tend à corroborer le lien entre niveau trophique et $\delta^{44/42}Ca$ malgré une variabilité certaine entre groupes d'herbivores et des recouvrements avec les carnivores. Les hyènes (*Crocuta crocuta*) présentent des compositions très appauvries en isotopes lourds ce qui peut être expliqué par leur consommation d'os, constituant une grande partie de leur alimentation et dont la composition isotopique est appauvrie en isotopes lourds (Heuser *et al.* 2011).

En conclusion, les structures des écosystèmes influencent les compositions isotopiques des organismes qui le constituent. Cependant le niveau trophique à lui seul ne semble pas déterminer la composition de l'organisme, et particulièrement chez les mammifères marins ou continentaux terrestres. Le croisement des compositions isotopiques du Ca avec d'autres systèmes isotopiques ($\delta^{15}N$ ou $\delta^{13}N$) semble être primordial (Melin *et al.* 2014, Martin *et al.* 2017a). Des hétérogénéités dans les sources de Ca selon les niches écologiques ou encore des effets physiologiques propres pourraient expliquer la variabilité observée chez les mammifères.

IV Sources primaires de Ca environnemental des vertébrés

Le Ca de l'environnement utilisé par les vertébrés est marqué par l'hétérogénéité des compositions isotopiques, qu'il soit issu des réservoirs géologiques de surface ou des producteurs primaires.

Le Ca des principaux réservoirs de surface est enrichi en isotopes lourds relativement aux tissus minéralisés des vertébrés et varie entre -0.75 et +0.41 ‰ environ (Figure 1.13).

L'eau de mer, dans laquelle le Ca présente une concentration moyenne d'environ 420 mg.L^{-1} (*e.g.* Elderfield et Schultz 1996), est de composition isotopique particulièrement enrichie en isotopes lourds en comparaison aux principaux apports des fleuves et des fluides hydrothermaux (Tipper *et al.* 2016). Ceci est en partie dû à l'utilisation préférentielle du Ca isotopiquement léger par les organismes calcifiants (*e.g.* Farkaš *et al.* 2007a). L'eau de mer est caractérisée par une grande homogénéité de sa composition isotopique, ce qui est dû au long temps de résidence du Ca dans les océans, d'environ 1 Ma (Zhu et Macdougall 1998, De La Rocha et DePaolo 2000, Schmitt *et al.* 2001, Hippler *et al.* 2003). L'homogénéité de cette source primaire de Ca pour les organismes marins explique probablement en partie l'existence d'effets trophiques clairs en milieu marin, à l'exception des mammifères (Martin *et al.* 2015).

Les eaux de boisson des vertébrés continentaux (rivières et nappes phréatiques) présentent des compositions isotopiques moyennes de 0 ‰ mais plus variables que l'eau de mer, avec des valeurs comprises entre -0.43 et +0.50 ‰ (Figure 1.13 et Tipper *et al.* (2016)). Elles présentent des concentrations en Ca variant entre quelques dizaines et quelques centaines de milligrammes par litres et participent aux apports en Ca des vertébrés continentaux terrestres. Chez l'humain, le Ca ingéré provenant de l'eau représente une proportion moyenne de l'ordre de 10 % pour l'adulte en France (Leblanc et Sirot 2011).

Les compositions isotopiques des principaux végétaux terrestres varient selon les tissus considérés et selon qu'ils soient mono- ou dicotylédones (Figure 6.2). Une part de variabilité est également imputable à la variabilité des compositions isotopiques des sols, d'où les plantes tirent leur Ca, avec une amplitude de variations de l'ordre de 1 ‰.

Chez les dicotylédones et les pinophytes, des études ont démontré que les isotopes du Ca sont fractionnés au cours du transport du Ca depuis la solution nutritive du sol jusqu'aux appareils foliaires. Les racines prélèvent préférentiellement les isotopes légers du Ca, puis un fractionnement d'amplitude variable tend à enrichir le Ca de la tige ou du tronc en isotopes lourds (*e.g.* Cenki-Tok *et al.* 2009, Holmden et Bélanger 2010). Enfin, les feuilles sont marquées par des compositions isotopiques enrichies en isotopes lourds relativement à la tige. L'amplitude totale de variation au sein d'un individu depuis ses racines jusqu'aux feuilles atteint généralement +0.40 ‰ indépendamment de l'espèce (Schmitt 2016). Ces fractionnements sont imputés à des variations de la spéciation du Ca dans le végétal, mettant en jeu notamment les oxalates dont la présence pourrait favoriser la fixation des isotopes lourds du Ca (Schmitt 2016, Moynier et Fujii 2017).

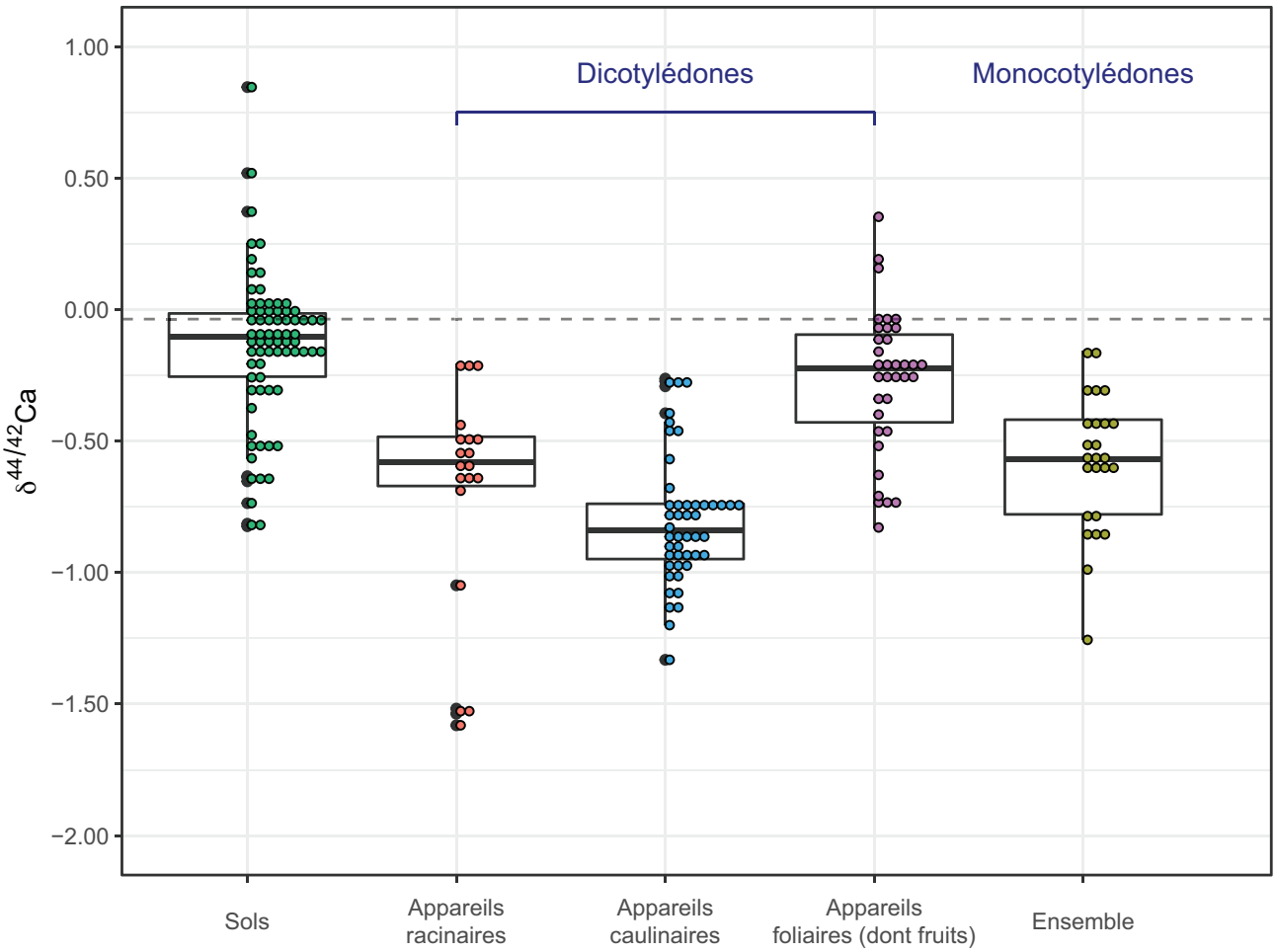

FIGURE 6.2 – **Distributions des compositions isotopiques connues des sols, des organes de plantes dicotylédones et des fruits et feuilles de monocotylédones (‰, rel. *ICP Ca Lyon*). Distributions of known isotope compositions of soils, organs of dicot plants and fruits and leaves of monocots (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*).** Compilation réalisée à partir des données issues de Skulan et DePaolo (1999), Schmitt *et al.* (2003a), Wiegand *et al.* (2005), Chu *et al.* (2006), Page *et al.* (2008), Holmden et Bélanger (2010), Farkaš *et al.* (2011), Bagard *et al.* (2013), Moore *et al.* (2013), Hindshaw *et al.* (2013b), Tacail *et al.* (2014), Gussone et Heuser (2016), Heuser *et al.* (2016a)

Les compositions isotopiques en Ca des monocotylédones ont été moins étudiées. Elles présentent des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ variant entre -1.25 et -0.20 ‰ et incluent notamment les poacées (ou graminées).

La différence de plus de 0.30 ‰ entre la médiane des feuilles et fruits de monocotylédones et celle des feuilles de dicotylédones pourrait être à l'origine de variations dans les compositions isotopiques du Ca alimentaire de vertébrés se nourrissant préférentiellement de feuilles d'arbres (*browsing* ou broutage voire phyllophagie) ou d'herbes comme les graminées (*grazing* ou pâturage). Cependant le manque de données de compositions isotopiques du Ca des monocotylédones, et spécifiquement des graminées, empêche toute conclusion et des recherches seraient nécessaires pour en discuter.

En conclusion, la variabilité des sources primaires de Ca peut expliquer une partie des variabilités intraspécifiques ainsi que les distributions interspécifiques observées dans les écosystèmes et chez les mammifères terrestres en particulier. La relation entre le niveau trophique et la composition isotopique du Ca n'est alors probablement pas évidente car la variabilité des compositions des producteurs primaires participerait à augmenter la diversité des compositions isotopiques des consommateurs primaires (herbivores), selon leur écologie et leur comportement alimentaire. Les végétaux présentent notamment une grande variabilité selon les organes ou les espèces et des consommations spécialisées de certaines espèces ou de certains organes pourraient expliquer des différences marquées de l'ordre de plusieurs dixièmes de pour mille au sein des vertébrés de même niveau trophique *a priori*.

Chapitre 7

Estimation des compositions en isotopes du Ca de l'alimentation humaine

Sommaire

I Principe de l'étude 90

II Méthodes 91

A Estimation des distributions des $\delta^{44/42}Ca$ des différents groupes d'aliments 91

B Modèle mathématique 94

III Résultats et discussion 97

IV Perspectives préhistoriques et historiques 99

I Principe de l'étude

Le préalable à l'étude de la physiologie isotopique humaine est l'estimation de la composition moyenne de son alimentation et l'identification des traits principaux pouvant expliquer sa variabilité.

L'humain moderne est omnivore et présente un niveau trophique intermédiaire, estimé à 2.2 en moyenne en 2013 d'après Bonhommeau *et al.* (2013). Ceci signe l'utilisation de ressources variées, issues principalement de producteurs primaires (*e.g.* végétaux) et de consommateurs primaires (*e.g.* herbivores). Cependant, les répartitions des sources d'énergie et des sources de Ca de l'alimentation ne sont pas en adéquation. Ainsi, les produits laitiers, caractérisés par des rapports isotopiques parmi les plus bas, représentent jusqu'à 70 % des apports en Ca de l'alimentation occidentale moderne tout en représentant 9 à 12 % de l'énergie moyenne consommée (*e.g.* Del Valle *et al.* 2011, Guéguen et Pointillart 2000, Leblanc et Sirot 2011, Bonjour 2011). Par ailleurs, la biodisponibilité du Ca est variable selon les aliments et notamment selon la spéciation de ce dernier (Guéguen et Pointillart 2000, Buchowski 2016). Ceci peut participer à l'absorption et l'assimilation préférentielle de Ca de certains aliments de compositions isotopiques distinctes du chyme total. Ainsi la composition isotopique moyenne du Ca effectivement absorbé pourrait-elle différer de celle du Ca ingéré et les produits laitiers jouent probablement un rôle important dans la détermination des compositions de l'alimentation (Chu *et al.* 2006).

Dans cette section, je m'attacherai donc à développer un modèle mathématique de mélange prenant en compte l'ensemble des données disponibles de compositions isotopiques des sources primaires de Ca. Le but est de discuter de la variabilité isotopique propre à l'alimentation et de l'influence de la source majeure de Ca que sont les produits laitiers, très appauvris en isotopes lourds, sur la composition de l'organisme.

Afin d'estimer les gammes de variation des compositions isotopiques de l'alimentation humaine, j'adopte une approche similaire à celle développée par Heuser (2016), dont le principe est de calculer la composition isotopique du mélange des différents constituants de l'alimentation occidentale moyenne. Cependant, cet auteur fonde son modèle sur des compositions isotopiques et des valeurs de proportions des différentes sources de l'alimentation réduites à des moyennes choisies et issues de jeux de données restreints. Afin d'enrichir ce modèle de premier ordre, je choisis d'utiliser l'ensemble des données disponibles de la littérature de façon à estimer les distributions des compositions isotopiques de chaque source de Ca de l'alimentation. Les distributions isotopiques estimées sont ensuite associées aux quantités et proportions moyennes de Ca apportées par les différents composants de l'alimentation française actuelle chez l'enfant de 3 à 14 ans et l'adulte de plus de 15 ans, d'après les données de l'enquête nationale « Etude de l'alimentation Totale Française » menée par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Leblanc et Sirot 2011). Enfin, les compositions isotopiques de l'alimentation sont calculées par un modèle de mélange pour les différents quantiles des distributions isotopiques des aliments, tout en faisant varier entre 0 et près de 100 % la proportion de Ca apporté par les produits laitiers.

Le choix de l'étude de Leblanc et Sirot (2011) est justifié par l'exhaustivité de la description de l'alimentation. Cependant, les pratiques alimentaires sont intrinsèquement variables et les estimations de la diversité des apports en Ca sont contrastées. En effet, selon les groupes ou les sociétés, les apports en Ca par les produits laitiers peuvent varier entre 0 (régimes végétaliens) et 70 % (Guéguen et Pointillart 2000, Del Valle *et al.* 2011, Leblanc et Sirot 2011, Rozenberg *et al.* 2016). L'approche choisie permet avant tout de discuter des principaux traits de l'alimentation occidentale et n'a pas pour ambition de prédire de valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ alimentaires définitives.

II Méthodes

A Estimation des distributions des $\delta^{44/42}Ca$ des différents groupes d'aliments

Les estimations des distributions des compositions isotopiques du Ca des sources primaires de Ca alimentaire sont présentées en Figure 7.1 et synthétisées en Tableau 7.2 à la fin de ce chapitre. La qualité de ces estimations est variable car les données de la littérature sont lacunaires. C'est pourquoi certaines distributions sont estimées à partir de compositions de matériaux assimilés aux aliments d'intérêt ou bien à l'aide de jeux de données limités. Ces limitations appelleront ce modèle à être révisé à mesure que les compositions des différents aliments seront décrites plus systématiquement. Chaque distribution est synthétisée par le calcul des quantiles à 5, 25, 50, 75 et 95 %, représentés par les boîtes à moustache de la figure 7.1.

La distribution des compositions isotopiques des eaux de boisson est tirée de celle des nappes phréatiques (Tipper *et al.* 2016) et recouvre les compositions des rivières et fleuves (Figure 1.13).

Les distributions des compositions des crustacés et mollusques ainsi que des poissons sont estimées à partir de celles de quelques tissus mous et de tissus minéralisés d'espèces de crustacés et de mollusques (moule, calmar, étoile de mer, escargots de mer, bernique) et de poissons (anchois, sardines, barracuda, mérou, raie manta). Leurs valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sont proches de 0 ‰, donc relativement enrichies en isotopes lourds car le Ca de l'eau de mer, source primaire en milieu marin, présente une valeur de $\delta^{44/42}Ca$ particulièrement positive d'environ +0.40 ‰ (Tableau 4.5).

Les fractions organiques des œufs de volaille (poule et caille) sont marquées par des compositions isotopiques hétérogènes mais globalement positives d'après des données de la littérature (Skulan et DePaolo 1999) et non publiées (Bechon *et al.* 2015). Il est possible d'estimer une distribution moyenne des compositions du mélange entre le Ca très enrichi en isotopes lourds de l'albumen (blanc) et moins enrichi du jaune (Figure 7.2 et Tableau 7.2). Ces compositions sont interprétées comme étant héritées de fractionnements biologiques propres à la formation de la coquille d'œuf (Skulan et DePaolo 1999).

Les fruits et légumes regroupent des espèces et des organes très diversifiés : racines, tiges, feuilles,

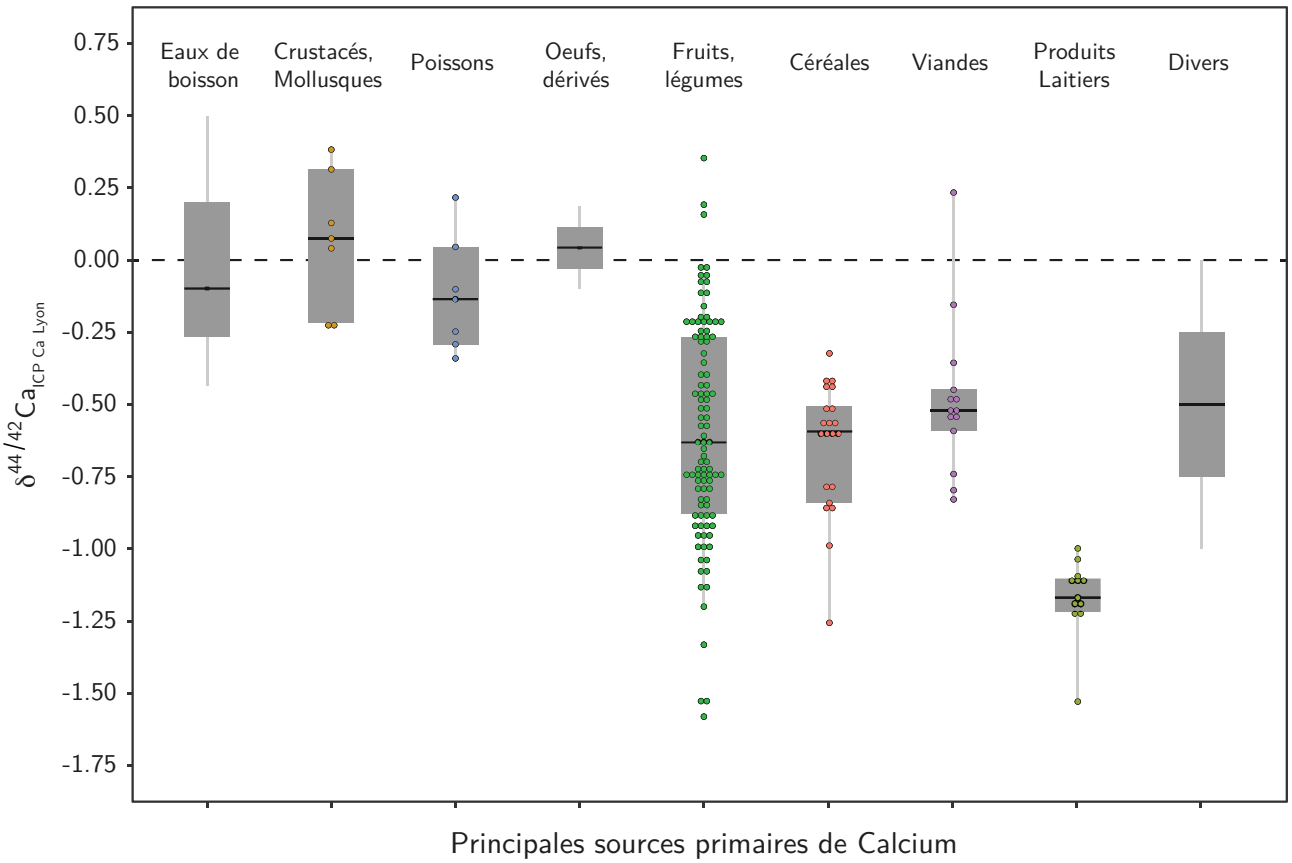

FIGURE 7.1 – **Distribution des compositions connues ou estimées des sources primaires de Ca alimentaire (‰, rel. *ICP Ca Lyon*)**, pour les eaux de boisson (Tipper *et al.* 2016), les crustacés, mollusques et poissons (Skulan *et al.* 1997, Skulan et DePaolo 1999), les oeufs (Skulan et DePaolo 1999, données non publiées), les fruits et légumes (Schmitt *et al.* 2003a, Wiegand *et al.* 2005, Chu *et al.* 2006, Page *et al.* 2008, Holmden et Bélanger 2010, Farkaš *et al.* 2011, Bagard *et al.* 2013, Hindshaw *et al.* 2013b), les céréales (Skulan et DePaolo 1999, Chu *et al.* 2006, Moore *et al.* 2013, Hindshaw *et al.* 2013b, Gussone et Heuser 2016, Heuser 2016), les viandes (Skulan et DePaolo 1999, Morgan *et al.* 2012a, Tacail *et al.* 2014, Heuser *et al.* 2016a) et les produits laitiers (Chu *et al.* 2006, Gussone et Heuser 2016, Heuser 2016, Tacail *et al.* 2017b). Les boîtes à moustaches délimitent les quantiles à 5, 25, 50, 75 et 95 %.
Distributions of known or estimated isotope compositions of primary Ca dietary sources (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*), for drinking water (Tipper *et al.* 2016), shellfishes, molluscs and fishes (Skulan *et al.* 1997, Skulan et DePaolo 1999), eggs (Skulan et DePaolo 1999, unpublished data), fruits and vegetables (Schmitt *et al.* 2003a, Wiegand *et al.* 2005, Chu *et al.* 2006, Page *et al.* 2008, Holmden et Bélanger 2010, Farkaš *et al.* 2011, Bagard *et al.* 2013, Hindshaw *et al.* 2013b), cereals (Skulan et DePaolo 1999, Chu *et al.* 2006, Moore *et al.* 2013, Hindshaw *et al.* 2013b, Gussone et Heuser 2016, Heuser 2016), meat (Skulan et DePaolo 1999, Morgan *et al.* 2012a, Tacail *et al.* 2014, Heuser *et al.* 2016a) and dairy products (Chu *et al.* 2006, Gussone et Heuser 2016, Heuser 2016, Tacail *et al.* 2017b). Boxplots delimit 5, 25, 50, 75 and 95 % percentiles.

organes de stockage et appareils reproducteurs de mono- et de dicotylédones. Il n'est donc pas possible de distinguer les différentes sous-catégories sans disposer de compositions mesurées spécifiquement à partir des principaux légumes consommés. Leur variabilité totale est donc estimée par la compilation de l'ensemble

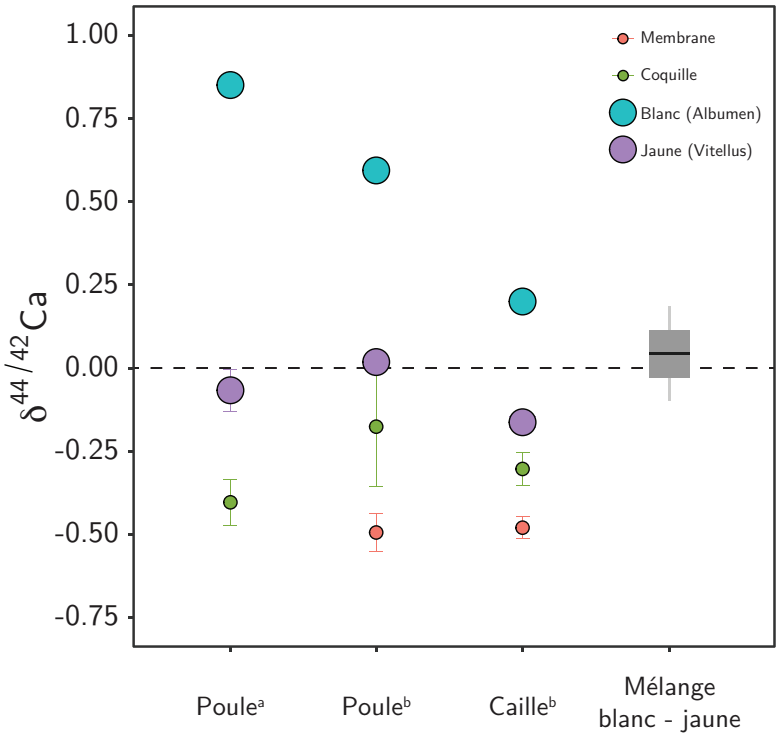

FIGURE 7.2 – **Compositions des diffférentes fractions d'œufs de poules et de caille ($\delta^{44/42}Ca$, ‰, rel. *ICP Ca Lyon*).** [a]Skulan et DePaolo (1999) ; [b]Bechon *et al.* (2015). Les compositions isotopiques du blanc et du jaune ont été utilisées pour calculer une estimation de la distribution de l'ensemble, selon les proportions différentes de Ca apportées par le blanc et le jaune, environ 8 et 92 % respectivement (Tableau 7.2). $\delta^{44/42}Ca$ **compositions of various egg fractions from hen anq quail (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*)** [a]Skulan et DePaolo (1999) ; [b]Bechon *et al.* (2015). The isotope compositions of white and yolk have been used to estimate average distribution of the mix of both, according to the different proportions of Ca brought by white and yolk, namely around 8 and 92 % respectively (Tableau 7.2).

des compositions isotopiques des végétaux, tous tissus confondus, à l'exclusion des céréales.

Les céréales sont assimilées aux compositions des poacées disponibles (ou graminées), parmi lesquelles seules trois compositions de grains ou de leurs farines (riz, blé et maïs) sont publiées (Gussone et Heuser 2016) et dont les $\delta^{44/42}Ca$ s'étalent de -1.26 à -0.32 ‰.

La distribution des compositions isotopiques des viandes est estimée à partir de la compilation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de muscles et de sang d'animaux consommés (mouton, poulet, cheval, cochon). Aucune donnée de composition isotopique de muscles et de sang de bovins n'est cependant disponible aujourd'hui. Ces compositions varient significativement, entre environ -0.80 et +0.25 ‰, mais ne constituent pas une source majeure de Ca dans l'alimentation humaine actuelle (moins de 2 % des apports moyens en Ca chez l'adulte et l'enfant en France d'après Leblanc et Sirot (2011)).

Les produits laitiers ont des compositions isotopiques particulièrement appauvries en isotopes lourds et varient autour de -1.16 ‰ (médiane). La distribution de leurs compositions isotopiques est estimée à partir de données de lait de vache et de leurs dérivés fermentés (fromages, yaourts *etc.*) dont les compositions

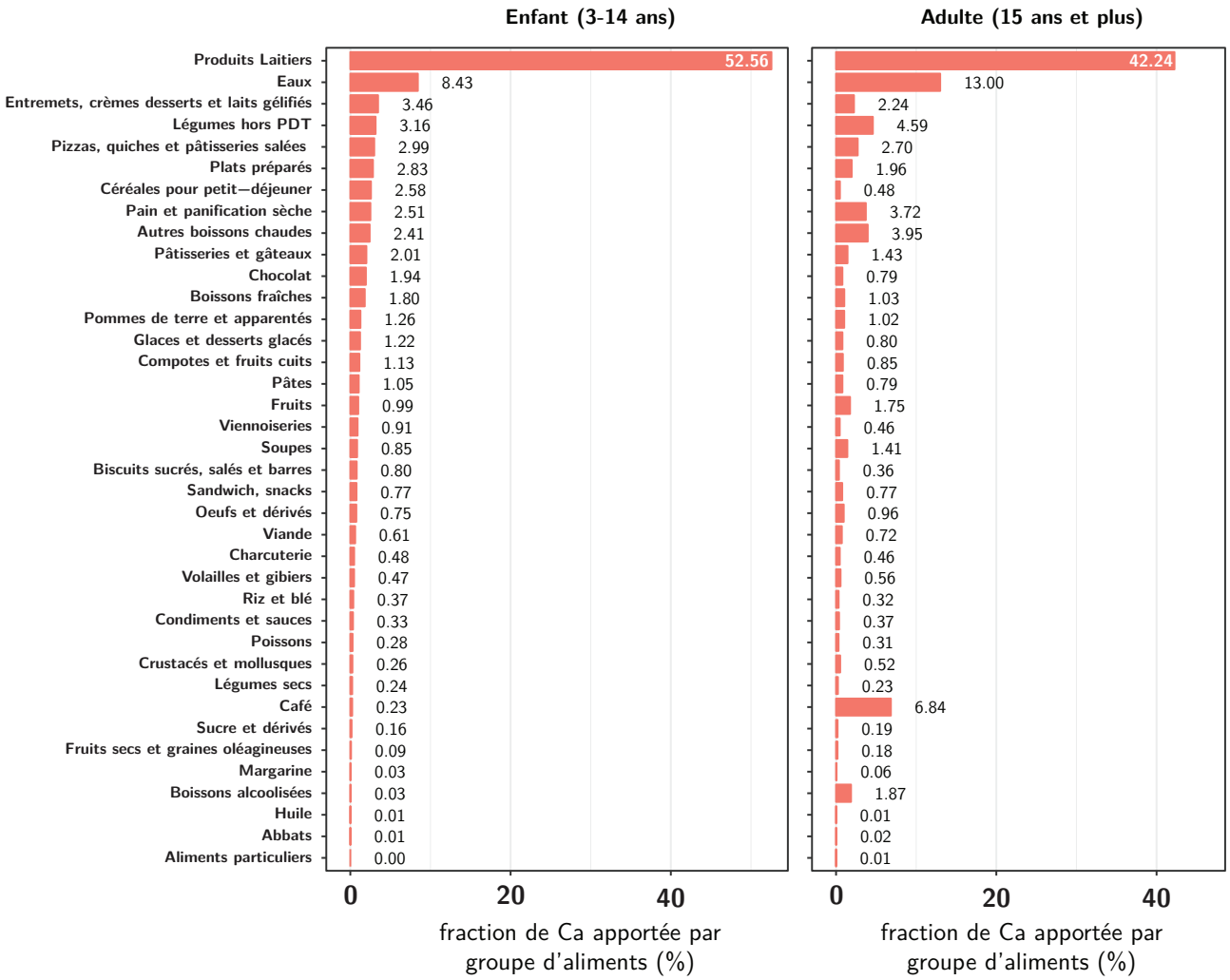

FIGURE 7.3 – **Apports moyens de Ca (%) des différents groupes d'aliments dans la population française** d'après Leblanc et Sirot (2011). **Average Ca intake proportions (%) from various food groups in French population** after Leblanc et Sirot (2011).

ne sont pas modifiées par les différentes techniques de coagulation, fermentation ou affinage (Chu *et al.* 2006, Gussone et Heuser 2016, Tacail *et al.* 2017b). Deux compositions de lait de chèvre ont été également intégrées (-1.2 et -1.5 ‰ d'après Chu *et al.* (2006)).

Enfin, certains aliments composites sont de compositions isotopiques indéterminées, incluant les plats préparés, les condiments et les sauces. Ces sources représentent moins de 3 % des apports moyens en Ca. Ces groupes d'aliments ont été regroupés sous la dénomination « Divers » et associés à une large distribution de valeurs de $\delta^{44/42}Ca$, représentant un mélange de Ca d'origine végétale et animale, variant entre -1 et 0 ‰.

B Modèle mathématique

L'étude de l'alimentation totale des Français (Leblanc et Sirot 2011) distingue les apports en Ca d'une série de groupes d'aliments (Figure 7.3 et Tableau 7.2). Chaque aliment a été associé à une ou plusieurs

sources primaires de Ca. Une distribution des compositions isotopiques pour chaque groupe d'aliments (en quantiles à 5, 25, 50, 75 et 95 %) a été calculée sur la base du mélange des différentes sources primaires de Ca.

La distribution des $\delta^{44/42}Ca$ de l'alimentation totale a été calculée à l'aide des équations de mélange pour les rapports isotopiques présentées ci-dessous et pour des proportions variables des produits laitiers principaux (Lait, Produits Laitiers Ultra-Frais de type Yaourts, Fromages, Beurre) dont les apports moyens sont estimés par Leblanc et Sirot (2011).

Calcul de la composition isotopique d'un mélange

Ces équations sont dérivées de Albarède (1995).

On considère :

- un système constitué d'un mélange de *n* composants ou réservoirs *j*
- i_1 et i_2 deux isotopes d'un élément *X*

La conservation de la masse pour le composé i_2 donne :

$$C_{mix}^{i_2} = \sum_j f_j C_j^{i_2} \tag{7.1}$$

où

- C^{i_2} est la concentration de i_2 dans le mélange (mix) et dans le réservoir j.
- f_j est la fraction massique du composant ou réservoir j du mélange avec
  $f_j = \dfrac{M_j}{M_{mix}}$
  et
  $\sum_j f_j = 1$

On divise par $C_{mix}^{i_1}$:

$$\left(\frac{C^{i_2}}{C^{i_1}}\right)_{mix} = \frac{\sum_{j=1}^{n} f_j C_j^{i_2}}{C_{mix}^{i_1}} = \sum_{j=1}^{n} \left(\frac{C^{i_2}}{C^{i_1}}\right)_j \times \frac{C_j^{i_1}}{C_{mix}^{i_1}} f_j \tag{7.2}$$

On pose :

$$\varphi_j^{i_1} = \frac{C_j^{i_1}}{C_{mix}^{i_1}} f_j$$

$\varphi_j^{i_1}$ correspond à la proportion du composé i_1 apportée par le composant *j* dans le mélange.

On a alors, pour un mélange *mix* :

$$\left(\frac{C^{i_2}}{C^{i_1}}\right)_{mix} = \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} \left(\frac{C^{i_2}}{C^{i_1}}\right)_j \tag{7.3}$$

Calcul de $\delta^{44/42}Ca_{mix}$

Par définition :

$$\delta^{i_2/i_1}X_{éch} = \left(\frac{R_{éch}}{R_{std}} - 1\right) \times 1000$$

où R est le rapport d'abondances des isotopes i_2 et i_1 de l'élément X (équivalent à $\left(\frac{C^{i_2}}{C^{i_1}}\right)$).

On a donc :

$$R_{éch} = \left(\frac{\delta^{i_2/i_1}X_{éch}}{1000} + 1\right) \times R_{std}$$

Par ailleurs, on a d'après l'équation 7.3 :

$$R_{mix} = \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} R_j \tag{7.4}$$

D'où :

$$\left(\frac{\delta^{i_2/i_1}X_{mix}}{1000} + 1\right) \times R_{std} = \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} \left(\frac{\delta^{i_2/i_1}X_j}{1000} + 1\right) \times R_{std} \tag{7.5}$$

$$\frac{\delta^{i_2/i_1}X_{mix}}{1000} + 1 = \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} \frac{\delta^{i_2/i_1}X_j}{1000} + \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} \tag{7.6}$$

Or $\sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} = 1$ par définition, d'où :

$$\frac{\delta^{i_2/i_1}X_{mix}}{1000} + 1 = 1 + \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} \frac{\delta^{i_2/i_1}X_j}{1000} \tag{7.7}$$

L'équation 7.7 peut ensuite être simplifiée :

$$\delta^{i_2/i_1}X_{mix} = \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{i_1} \times \delta^{i_2/i_1}X_j \tag{7.8}$$

En considérant les rapports isotopiques $^{44}Ca/^{42}Ca$, on obtient enfin :

$$\delta^{44/42}Ca_{mix} = \sum_{j=1}^{n} \varphi_j^{^{42}Ca} \times \delta^{44/42}Ca_j = \sum_{j=1}^{n} \frac{\left[^{42}Ca\right]_j}{\left[^{42}Ca\right]_{mix}} f_j \times \delta^{44/42}Ca_j \tag{7.9}$$

où $\left[^{42}Ca\right]$ est la concentration en ^{42}Ca. Le rapport $\frac{\left[^{42}Ca\right]_j}{\left[^{42}Ca\right]_{mix}}$ peut être approximé par $\frac{[Ca]_j}{[Ca]_{mix}}$, d'où :

$$\delta^{44/42}Ca_{mix} \simeq \sum_{j=1}^{n} \frac{[Ca]_j}{[Ca]_{mix}} f_j \times \delta^{44/42}Ca_j \tag{7.10}$$

L'équation 7.10 est utilisée dans le programme développé sous R (R Core Team 2016) afin d'estimer les compositions isotopiques de l'alimentation humaine, considérée comme un mélange de composants de concentrations et de compositions isotopiques en Ca contrastées.

III Résultats et discussion

Les résultats sont présentés en Figure 7.4. Cette figure décrit pour l'enfant et l'adulte les variations de la distribution des valeurs $\delta^{44/42}Ca$ de l'alimentation prédites par le modèle (quantiles à 5, 25, 50, 75 et 95 %) pour des proportions variables de produits laitiers consommés (Figure 7.4. B. et D.) et donc pour des proportions variables de Ca apporté par les produits laitiers (Figure 7.4. A. et C.).

Les produits laitiers, dont les compositions isotopiques sont significativement appauvries relativement aux autres sources de Ca, font significativement varier les distributions des compositions isotopiques du Ca. A mesure que la proportion de produits laitiers augmente, les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ tendent vers une asymptote plus négative, correspondant au pôle du mélange « produits laitiers ».

La différence entre les prédictions pour l'enfant et l'adulte est ténue au premier ordre. D'après Leblanc et Sirot (2011), la proportion moyenne de Ca provenant des produits laitiers chez l'enfant est d'environ 52 % ce qui prédit des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de l'alimentation distribuées entre -0.95 et -0.72 ‰ pour 50 % des valeurs (quantiles à 25 et 75 %) et entre -1.24 et -0.56 ‰ pour 90 % des valeurs (quantiles à 5 et 95 %). Chez l'adulte, la proportion moyenne de Ca provenant des produits laitiers est estimée à 42 % dans cette étude, ce qui prédirait une alimentation distribuée entre -0.83 et -0.54 ‰ pour 50 % des valeurs (quantiles à 25 et 75 %) et entre -1.10 et -0.35 ‰ pour 90 % des valeurs (quantiles à 5 et 95 %). Il semble donc y avoir un recouvrement important et les alimentations des adultes et des enfants de 3-14 ans ne seraient pas différentes de plus de 0.10 ‰ d'après ce modèle.

Cependant, les pratiques alimentaires sont variables et la proportion de Ca apporté par les produits laitiers peut fortement varier d'un individu à un autre, d'un groupe à un autre et d'une culture à une autre. Selon les estimations, les produits laitiers apportent entre 40 et 75 % du Ca consommé dans les populations occidentales moyennes (*e.g.* Guéguen et Pointillart 2000, Del Valle *et al.* 2011, Leblanc et Sirot 2011, Rozenberg *et al.* 2016). Une telle gamme de variation étend la variabilité des $\delta^{44/42}Ca$ et prédit chez l'adulte une composition isotopique de l'alimentation variant entre -1.05 et -0.52 ‰ pour 50% des valeurs du modèle (quantiles 25 et 75%). Une telle variabilité, de l'ordre de 0.50 ‰, devrait participer à la variabilité des compositions des tissus et notamment des os des populations étudiées.

De plus, des différences de pratiques de consommation des produits laitiers, d'un groupe à un autre ou

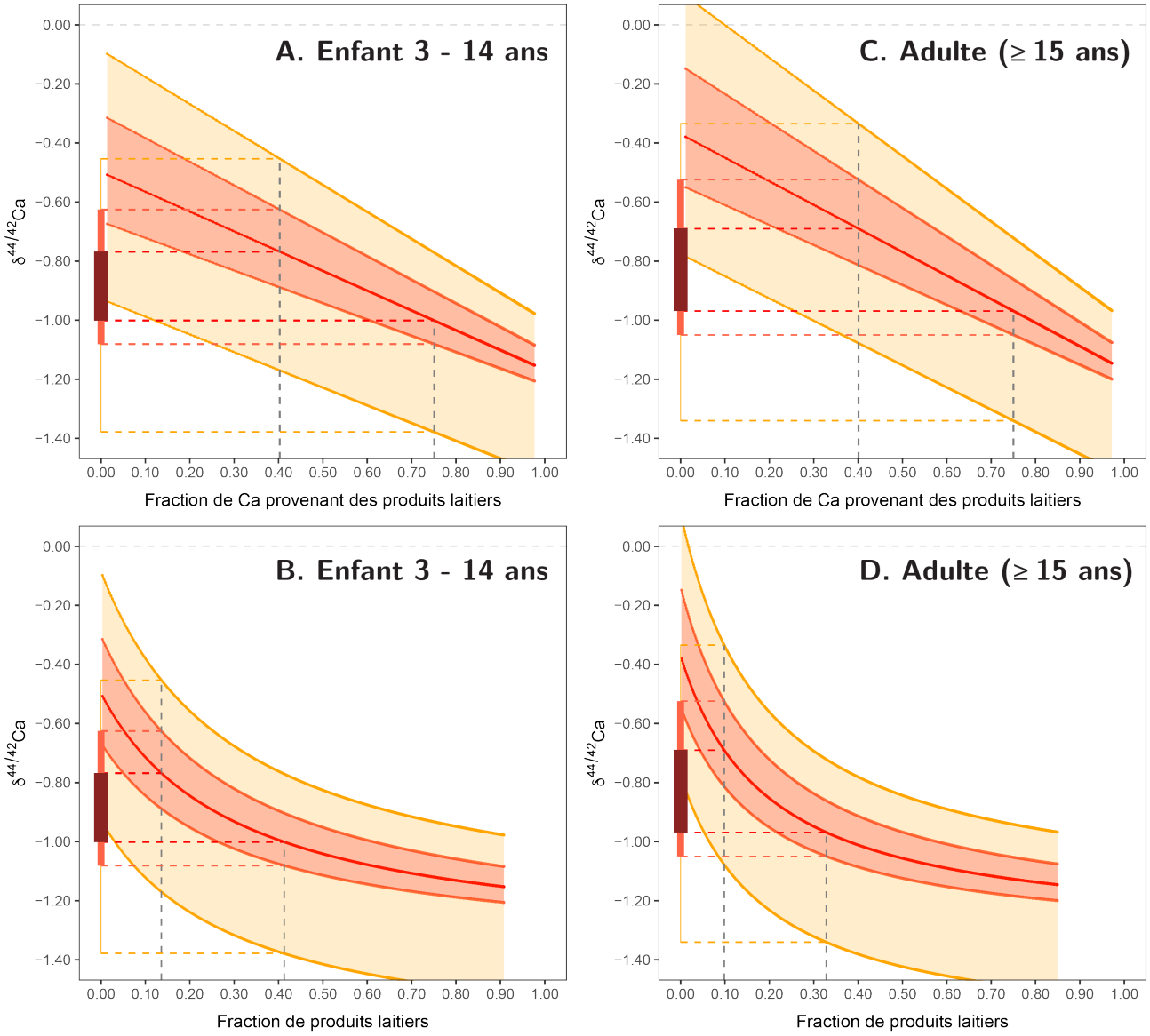

FIGURE 7.4 – **Distributions des $\delta^{44/42}Ca$ de l'alimentation humaine prédite par le modèle de mélange en fonction du Ca alimentaire provenant des produits laitiers (A.C.) et les proportions massiques de produits laitiers dans l'alimentation totale (B.D.).** Les lignes oranges sont les pourcentiles à 5 et 95 % et délimitent 90 % des compositions prédites (aire orange). Les lignes rouges qui délimitent l'aire rouge sont les pourcentiles à 25 et 75 % et définissent 50 % de la distribution prédite. La ligne rouge centrale est la médiane (pourcentile à 50 %) prédite par le modèle. Les traits verticaux sur la gauche de chaque graphique sont les distributions intégrées sur une proportion de Ca provenant des produits laitiers variant entre 40 et 75 %. **$\delta^{44/42}Ca$ distribution of human food predicted by mixing model as a function of fraction of Ca intake from dairy products (A.C.) and of dairy products mass fraction in total diet (B.D.).** Orange lines are the 5 and 95 % percentiles delimiting the 90 % of predicted compositions (orange area). The red lines delimiting the red area are the 25 and 75 % percentiles and défine the 50 % of predicted distribution. The central red line is the median (50 % percentile) predicted by the model. The vertical lines on the left side of each figure are the integrated distributions for a Ca fraction stemming from dairy products varying between 40 and 75 %.

au cours de l'histoire humaine, devraient être mesurables pour peu que les proportions de Ca apporté par les produits laitiers varient de plus de 20 à 40 %. Ainsi, le modèle prédit au premier ordre qu'une alimentation pauvre en produits laitiers (moins de 20 % des apports de Ca) devrait présenter une composition isotopique médiane plus élevée de 0.2 à 0.4 ‰ qu'une alimentation présentant 40 à 60 % de ses apports en Ca provenant des produits laitiers (Figure 7.5.B.).

Ce modèle est encore naturellement limité par les hypothèses et incertitudes portant sur les proportions des sources de Ca ainsi que sur les compositions isotopiques de ces mêmes sources. La variabilité estimée ici est donc en partie due à une probable surestimation des variabilités des sources primaires de Ca et ne peut être considérée comme juste mais comme l'estimation d'un ordre de grandeur. Heuser (2016) prédit, pour une alimentation dont environ 70 % des apports en Ca proviennent des produits laitiers, une composition moyenne de -1.00 ‰. Ceci se trouve être dans la gamme basse des compositions prédites par le modèle présenté ici, proche du quantile à 25 % (-1.01 ‰). Cette différence est imputable aux valeurs $\delta^{44/42}Ca$ choisies par l'auteur pour décrire les compositions isotopiques des différentes sources de Ca de l'alimentation, ne prenant en compte qu'un nombre limité de données, issues de trois publications (Chu *et al.* 2006, Heuser et Eisenhauer 2010, Gussone et Heuser 2016), dont la représentativité pourrait être discutée.

Enfin, le Ca ingéré n'est potentiellement pas représentatif du Ca absorbé effectivement à travers l'épithélium intestinal. Une proportion variant de 20 à 70 % du Ca du chyme est effectivement absorbée et dépend de nombreux facteurs physiologiques et alimentaires, notamment de l'âge, des apports en Ca ou encore de sa biodisponibilité. Plusieurs paramètres influencent cette biodisponibilité, comme la présence de certaines espèces chimiques complexant le Ca, tels les oxalates ou les phytates, ou encore d'espèces stimulant son excrétion, comme le sodium (Guéguen et Pointillart 2000). La biodisponibilité du Ca des produits laitiers est relativement bonne ($\simeq$30 % du Ca en est absorbable) mais n'est pas significativement meilleure que certains aliments comme les laits végétaux (soja, amande, *etc.*) (Buchowski 2016).

La discussion autour de l'alimentation humaine actuelle ne peut donc se conclure ici car les jeux de données disponibles sont encore lacunaires. Cependant, il est probable qu'une grande partie de la variabilité interindividuelle observée dans les compositions isotopiques des tissus humains, de l'ordre de 0.50 ‰ (Partie III), soit imputable à la variabilité des natures et des proportions des sources alimentaires de Ca.

IV Perspectives préhistoriques et historiques

A titre exploratoire, les compositions isotopiques d'ossements humains de plusieurs périodes préhistoriques et historiques ont été compilées et sont présentées en Figure 7.5.A. afin de discuter des variations de composition du Ca alimentaire à travers les périodes préhistoriques et historiques. Comme la composition isotopique de l'alimentation détermine celle du squelette, les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des os de populations

dont les pratiques alimentaires diffèrent devraient elles-mêmes être significativement différentes.

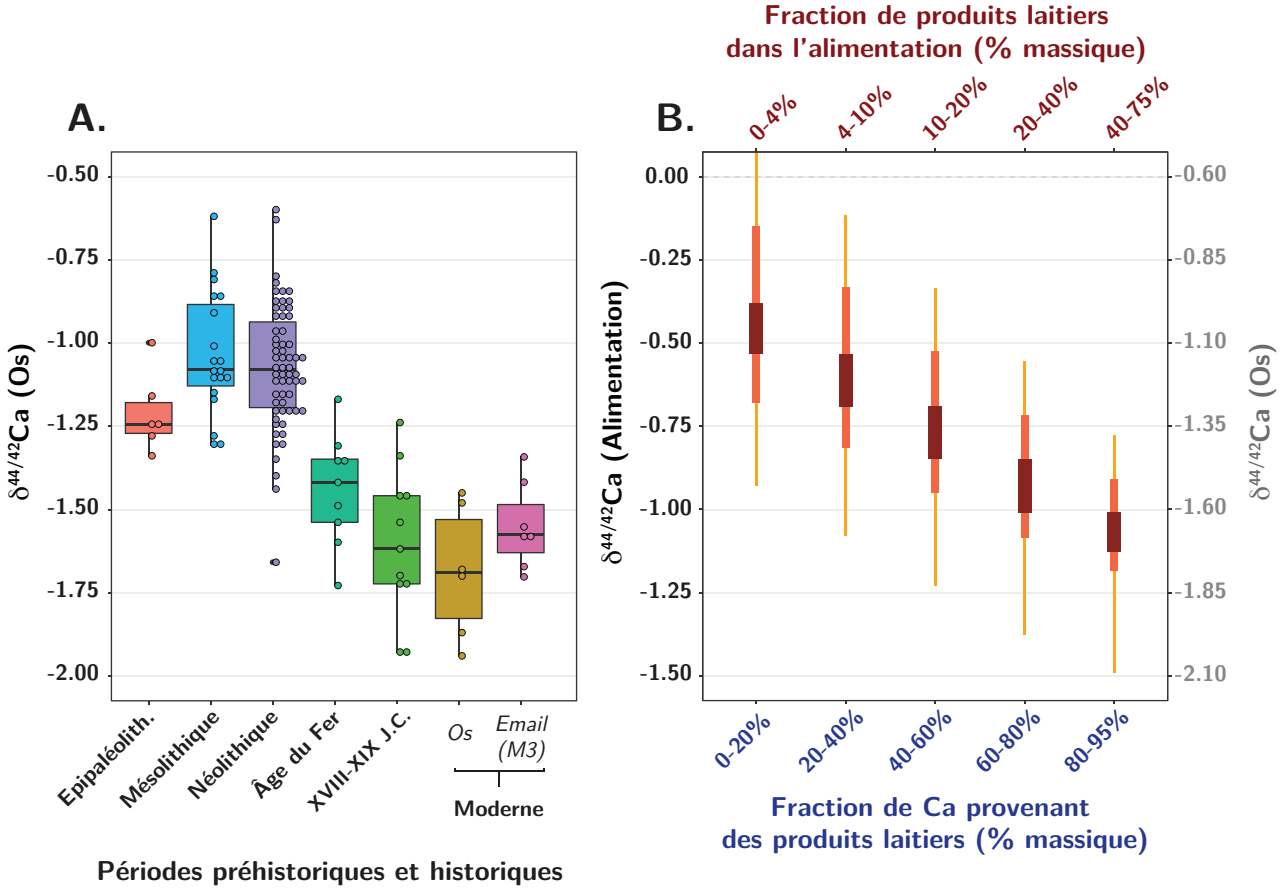

FIGURE 7.5 – **A. Distributions des $\delta^{44/42}Ca$ d'os humains archéologiques (Reynard *et al.* 2010; 2013) et moderne (Tacail *et al.* 2017b, et non publié) en fonction des périodes préhistoriques ou historiques. B. Distributions des $\delta^{44/42}Ca$ de l'alimentation (échelle de gauche) prédites pour des proportions de Ca provenant des produits laitiers variables (‰, rel. *ICP Ca Lyon*).** Les traits orange fins sont les intégrations des distributions à 90 % (entre les quantiles 5 et 95 %), les traits orange intermédiaires sont les intégrations des distributions à 50 % (entre les quantiles 25 et 75 %) et les traits rouge épais sont les intégrations de la médiane. L'échelle équivalente en $\delta^{44/42}Ca$ de l'os est donnée par l'échelle de droite, sur l'hypothèse d'une diminution de -0.60 ‰ depuis l'alimentation jusqu'à l'os.
A. Distributions of $\delta^{44/42}Ca$ values of bone from archaeologic (Reynard *et al.* 2010; 2013) and modern remains (Tacail *et al.* 2017b, et non publié) as a function of prehistoric and historic periods. B. Distributions of $\delta^{44/42}Ca$ values of diet (left scale bar) predicted for varying proportions of Ca stemming from dairy products (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*). The thin orange lines are integration of 90 % of distribution (between 5 and 95 % quantiles), the intermediate orange lines are integration of 50 % of distribution (between 25 and 75 % quantiles) and the red thick lines are the integrations of medians. The equivalent scale in $\delta^{44/42}Ca$ values of bone is given on the right side scale bar, assuming an offset from diet to bone of -0.60 ‰.

La compilation présentée est issue de deux articles (Reynard *et al.* 2010; 2013) présentant des études de sites archéologiques historiques et préhistoriques (Table 7.1). Cette compilation a été enrichie de quelques compositions isotopiques d'os moderne (voir Partie III) et de compositions isotopiques d'émail de dents de

TABLEAU 7.1 – **Description des provenances des échantillons d'os utilisés pour la compilation présentée en Figure 7.5.** Description of provenances of bone samples used in the compilation presented in Figure 7.5

Période	Référence	Matériel	Site (nombre d'individus)
Epipaléolihtique	Reynard *et al.* (2010)	Os	Taforalt, Maroc (6)
Mésolithique	Reynard *et al.* (2010)	Os	Abu Hureyra, Syrie(12)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Aveline's Hole, UK (1)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Ogof Yr Ychen, UK (1)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Teviec, France (3)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Totty pot, UK (1)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Worms Head, UK (1)
Néolithique	Reynard *et al.* (2010)	Os	Abu Hureyra, Syrie (28)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Balatonszarsz, Hongrie (12)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Bouqras, Syrie (1)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Hoedic, France (1)
	Reynard *et al.* (2010)	Os	Magura, Roumanie (8)
	Reynard *et al.* (2013)	Os	Asikli Hoyu, Anatolie, Turquie (12)
Âge du Fer	Reynard *et al.* (2010)	Os	Danebury, UK (9)
XVIII-XIXe siècles	Reynard *et al.* (2013)	Os	Spitafields, UK (11)
XXe siècle	Tacail *et al.* (2017b)	Email (M3)	France, Belgique (7)
	Lyon, non publié (Partie III)	Os	Rhône-Alpes, France (6)

sagesse d'individus européens nés dans la deuxième partie du XXe siècle (Tacail *et al.* 2017b). L'ensemble des valeurs, à l'exception des fœtus, nourrissons et juvéniles de moins de 2 ans (Reynard *et al.* 2010; 2013), est présenté en Figure 7.5, où les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sont données en fonction des périodes préhistoriques et historiques, depuis l'épipaléolithique jusqu'aux échantillons modernes de société occidentale industrialisée.

Malgré les contextes géographiques et culturels variés et l'échantillonnage lacunaire, les compositions isotopiques des différents groupes semblent évoluer vers des valeurs appauvries en isotopes lourds. Les sociétés néolithiques pour lesquelles il y a des indications de consommation de produits laitiers ne se distinguent pas de celles du mésolithique, ce qui avait été décrit préalablement (Reynard *et al.* 2010; 2011b). Les valeurs pré-néolithiques et néolithiques présentent une moyenne de -1.06±0.04 ‰ (2SE, test t de Student, n = 81). En revanche, les assemblages historiques des collections de Spitafields et les valeurs modernes se distribuent dans une gamme nettement plus basse avec une moyenne de -1.61±0.08 ‰ (2SE, test t de Student, n = 24) avec les échantillons d'émail dentaire, et de -1.63±0.11 ‰ (2SE, test t de

Student, n = 17) sans les échantillons d'émail dentaire. Cette moyenne est significativement plus basse d'environ -0.60 ‰ relativement aux groupes paléolithiques à néolithiques ($p < 10^{-16}$, test t de Student). Les données datant de l'Âge du Fer (Danebury, UK) semblent se trouver dans une gamme intermédiaire, ce qui correspondrait à une augmentation nette de la proportion de produits laitiers dans leur alimentation mais inférieure à l'époque actuelle.

A effets physiologiques supposés constants, ces résultats suggèrent un changement drastique des compositions isotopiques du Ca alimentaire et donc de l'utilisation du Ca environnemental. Cette variation, de l'ordre de 0.60 ‰, coïnciderait avec une augmentation significative de la proportion de Ca des produits laitiers de l'ordre de +60 %. En revanche, selon la même interprétation, les assemblages associés à des preuves de domestication animale ou de consommation de produits laitiers ne montrent pas de diminution notable des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (*e.g.* Abu Hureyra, Reynard *et al.* 2011b). En considérant un effet physiologique induisant une diminution de -0.60 ‰ de l'alimentation à l'os, les valeurs des assemblages néolithiques prédisent une alimentation distribuée entre -0.60 et -0.30 ‰ pour la moitié d'entre elles (entre les quantiles 25 et 75 %), ce qui serait en accord avec des proportions de Ca des produits laitiers inférieures à 20 %. De la même manière, les valeurs des assemblages historiques (Spitafields) et actuels, prédisent une alimentation distribuée entre -1.11 et -0.86 ‰ pour 50 % des valeurs (entre les quartiles 25 et 75 %). Ceci est compatible avec des apports en Ca des produits laitiers compris entre 60 et 80 %. En somme, ces différences suggèrent que ces sociétés néolithiques et pré-néolithiques consommaient des proportions massiques inférieures à environ 4 % de produits laitiers, contrairement aux sociétés modernes étudiées, où la proportion en masse de produits laitiers consommés dépasserait 10 voire 20 %.

Si cela est vérifié, les isotopes du Ca permettraient l'étude de la consommation de produits laitiers, au cours de la néolithisation par exemple. Avant la domestication animale, il y a environ 10 000 ans, la consommation de produits laitiers était probablement restreinte à la jeune enfance (Diamond 2002, Curry 2013). Cependant, les processus de néolithisation sont particulièrement étudiés et la consommation régulière de produits laitiers, dont les premières traces remontent jusqu'au septième millénaire avant J.C., est au centre de nombreuses recherches (*e.g.* Vigne et Helmer 2007, Evershed *et al.* 2008, Salque *et al.* 2012). Il est avancé que la généralisation de la consommation de produits laitiers et d'autres animaux a participé au développement des sociétés néolithiques grâce aux apports nutritionnels et économiques qu'ils représentent.

Cependant, d'autres explications peuvent être évoquées et nécessiteront à l'avenir des études plus approfondies. Il est possible que selon les pratiques et contextes, les compositions des produits laitiers aient été plus ou moins enrichies en isotopes lourds, en raison par exemple d'une source alimentaire spécifique de l'animal producteur. Il est par ailleurs probable que les compositions isotopiques moyennes de l'alimentation humaine autre que les produits laitiers aient changé également, avec les changements de sources végétales par exemple (espèces ou organes). Enfin, les relations entre compositions isotopiques des dents et de l'os

sont encore discutées et la comparaison n'est peut-être pas possible telle quelle (Heuser *et al.* 2011, Martin *et al.* 2015; 2017a). Cet axe nécessite donc des travaux de recherche dédiés, permettant de compléter les jeux de données, tant en nombres d'individus qu'en périodes archéologiques et contextes culturels.

Ces observations contredisent les conclusions des études citées ici (Reynard *et al.* 2010; 2011b; 2013) en ce sens que les isotopes du Ca sont probablement sensibles aux proportions de produits laitiers de l'alimentation. Cependant, les études en question traitaient de périodes pour lesquelles les variations de consommation des produits laitiers étaient probablement limitées et donc moins marquées qu'à l'échelle temporelle considérée ici.

Ces constats à l'échelle de l'histoire de l'humanité peuvent être mis en parallèle avec l'histoire de l'individu. Le lait maternel humain a une composition encore plus négative que les produits laitiers et devrait être à l'origine de variations des compositions du Ca des tissus minéralisés. L'hypothèse a été testée en comparant les compositions isotopiques de restes osseux d'individus d'âge croissant dans deux populations archéologiques (Reynard *et al.* 2013). Cependant, aucune variation systématique pouvant être associée à la consommation de lait maternel n'a été observée. La variabilité des effets physiologiques a été mise en avant. L'os est en perpétuelle reconstruction au cours de la croissance et à l'âge adulte. Les potentielles variations de compositions isotopiques du Ca seraient donc significativement atténuées par la remobilisation du Ca osseux et l'arrivée tardive Ca de l'alimentation post-sevrage. Cette hypothèse a été testée au cours de cette thèse, dans l'émail dentaire qui ne subit pas de remodelage, et cette étude est présentée dans le Chapitre 8.

TABLEAU 7.2 – **Bilan des données d'entrée du modèle d'alimentation humaine.**
Summary of input data of human diet model.

Groupe d'aliments	Ca (mg/kg)	Sources de Ca de chaque groupe d'aliments: Source principale #1	Source principale #2	Source principale #3	Source principale #4	fraction de Ca apporté par #1	fraction de Ca apporté par #2	fraction de Ca apporté par #3	fraction de Ca apporté par #4	Distribution des $\delta^{44/42}$Ca (quantiles) (‰, ICP Ca Lyon): Q5%	Q25%	Q50%	Q75%	Q95%	Apports moyens en Ca: ENFANT (3-14 ans) mg/j de Ca	%Ca apports totaux	ADULTE (15 ans et plus) mg/j de Ca	%Ca apports totaux
Pain et panification sèche	477	Céréales	Eaux	-	-	0.60	0.40	-	-	-0.93	-0.61	-0.40	-0.23	-0.05	16.52	2.51	29.21	3.72
Céréales pour petit déjeuner	1179	Céréales	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.26	-0.84	-0.59	-0.51	-0.42	16.98	2.58	3.78	0.48
Pâtes	168	Céréales	Eaux	-	-	0.90	0.10	-	-	-1.17	-0.78	-0.54	-0.44	-0.33	6.94	1.05	6.25	0.79
Riz et blé dur ou concasse	147	Céréales	Eaux	-	-	0.90	0.10	-	-	-1.17	-0.78	-0.54	-0.44	-0.33	2.45	0.37	2.53	0.32
Viennoiseries	381	Céréales	Produits laitiers (lait)	Produits laitiers (beurre)	-	0.22	0.73	0.05	-	-1.47	-1.14	-1.04	-0.97	-0.87	5.97	0.91	3.62	0.46
Biscuits sucrés ou salés et barres	386	Céréales	Produits laitiers (lait)	Produits laitiers (beurre)	-	0.15	0.78	0.07	-	-1.49	-1.16	-1.08	-1.01	-0.91	5.27	0.80	2.85	0.36
Pâtisseries et gâteaux	453	Céréales	Produits laitiers (lait)	Produits laitiers (beurre)	Œufs et dérivés	0.11	0.80	0.01	0.08	-1.38	-1.08	-1.01	-0.94	-0.84	13.22	2.01	11.27	1.43
Lait	1024	Produits laitiers	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.53	-1.22	-1.17	-1.10	-1.00	174.19	26.44	87.72	11.16
Ultra frais laitier	1081	Produits laitiers	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.53	-1.22	-1.17	-1.10	-1.00	85.83	13.03	92.24	11.74
Fromages	5164	Produits laitiers	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.53	-1.22	-1.17	-1.10	-1.00	84.90	12.88	149.93	19.08
Oeufs et dérivés	490	Jaunes d'œufs	Blancs d'œufs	-	-	0.92	0.08	-	-	-0.10	-0.03	0.04	0.11	0.19	4.94	0.75	7.54	0.96
Beurre	185	Produits laitiers	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.53	-1.22	-1.17	-1.10	-1.00	1.38	0.21	1.97	0.25
Huile	21	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.75	-0.46	-0.22	-0.08	0.19	0.08	0.01	0.11	0.01
Margarine	89	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.75	-0.46	-0.22	-0.08	0.19	0.23	0.03	0.50	0.06
Viande	165	Muscles et sang	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.83	-0.59	-0.52	-0.45	0.23	3.99	0.61	5.67	0.72
Volaille et gibier	116	Muscles et sang	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.83	-0.59	-0.52	-0.45	0.23	3.09	0.47	4.41	0.56
Abats	108	Muscles et sang	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.83	-0.59	-0.52	-0.45	0.23	0.05	0.01	0.15	0.02
Charcuterie	144	Muscles et sang	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.83	-0.59	-0.52	-0.45	0.23	3.15	0.48	3.65	0.46
Poissons	168	Poissons	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.34	-0.29	-0.14	0.05	0.22	1.87	0.28	2.44	0.31
Crustacés et mollusques	1066	Crustacés et mollusques	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.23	-0.22	0.07	0.31	0.38	1.72	0.26	4.05	0.52
Légumes hors pommes de terre	313	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.20	-0.88	-0.63	-0.27	-0.05	20.79	3.16	36.10	4.59
Pommes de terre et apparentés	176	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.20	-0.88	-0.63	-0.27	-0.05	8.33	1.26	8.03	1.02
Légumes secs	407	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.75	-0.46	-0.22	-0.08	0.19	1.55	0.24	1.83	0.23
Fruits	144	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.75	-0.46	-0.22	-0.08	0.19	6.52	0.99	13.73	1.75
Fruits secs et graines oléagineuses	535	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.75	-0.46	-0.22	-0.08	0.19	0.58	0.09	1.45	0.18
Glaces et desserts glacés	839	Produits laitiers (crème)	Végétaux (sucre)	Œufs et dérivés	-	0.76	0.02	0.22	-	-1.21	-0.95	-0.89	-0.82	-0.72	8.01	1.22	6.26	0.80
Chocolat	1200	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.75	-0.46	-0.22	-0.08	0.19	12.82	1.94	6.22	0.79
Sucres et derivés	119	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.20	-0.88	-0.63	-0.27	-0.05	1.04	0.16	1.49	0.19
Eaux	205	Eaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.44	-0.27	-0.10	0.20	0.50	55.53	8.43	102.11	13.00
Boissons fraîches sans alcool	91	Eaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.44	-0.27	-0.10	0.20	0.50	11.88	1.80	8.10	1.03
Boissons alcoolisées	122	Eaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.44	-0.27	-0.10	0.20	0.50	0.20	0.03	14.69	1.87
Café	233	Eaux	Végétaux	-	-	0.92	0.08	-	-	-0.46	-0.28	-0.11	0.18	0.47	1.53	0.23	53.77	6.84
Autres boissons chaudes	739	Eaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-0.44	-0.27	-0.10	0.20	0.50	15.91	2.41	31.07	3.95
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	1188	Produits laitiers (lait)	Produits laitiers (fromage)	Céréales	Eaux	0.34	0.57	0.06	0.03	-1.48	-1.17	-1.10	-1.03	-0.92	19.67	2.99	21.24	2.70
Sandwichs, casse croûte	502	Céréales	Eaux	Produits laitiers (fromage)	Végétaux	0.10	0.04	0.80	0.05	-1.43	-1.11	-1.03	-0.94	-0.82	5.09	0.77	6.04	0.77
Soupes et bouillons	140	Eaux	Végétaux	-	-	0.15	0.85	-	-	-1.09	-0.79	-0.55	-0.20	0.03	5.59	0.85	11.10	1.41
Plats composés	437	Inconnu	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.00	-0.75	-0.50	-0.25	0.00	18.62	2.83	15.37	1.96
Entremêts, crèmes desserts et laits gelifiés	887	Produits laitiers (lait)	Œufs et dérivés	Inconnu	-	0.82	0.13	0.05	-	-1.32	-1.04	-0.98	-0.90	-0.79	22.81	3.46	17.57	2.24
Compotes et fruits cuits	366	Végétaux	Eaux	-	-	0.74	0.26	-	-	-0.67	-0.41	-0.19	-0.01	0.27	7.46	1.13	6.67	0.85
Condiments et sauces	233	Inconnu	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.00	-0.75	-0.50	-0.25	0.00	2.19	0.33	2.94	0.37
Aliments particuliers (tofu)	802	Végétaux	-	-	-	1.00	-	-	-	-1.00	-0.75	-0.50	-0.25	0.00	0.00	0.00	0.05	0.01
														TOTAL	**659**	mg/j	**786**	mg/j

Chapitre 8

Transitions nutritionnelles précoces

Sommaire

I Introduction 106

II Article *"Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel"* 106

I Introduction

Nous testons dans ce chapitre l'hypothèse énonçant que la consommation de produits laitiers et en particulier de lait maternel devrait influencer la composition isotopique de l'organisme et plus spécifiquement des tissus minéralisés. Nous avons choisi ici de réaliser une étude sur l'émail dentaire humain et les transitions nutritionnelles précoces vécues par le nouveau-né, à savoir la naissance et le sevrage du lait maternel. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* et permet de discuter de l'impact des variations de compositions isotopiques des sources de Ca sur celles de l'organisme et des applications que ces variations permettraient de développer.

II Article *"Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel"*

Résumé *Les pratiques du sevrage diffèrent au sein des grands singes et ont probablement divergé au cours de l'évolution humaine. Cependant, les explorations des comportements d'espèces fossiles sont freinées par un manque de biomarqueurs sans équivoque. Dans cette étude, nous montrons que les transitions nutritionnelles précoces sont enregistrées dans l'émail des dents de lait humaines par des variations marquées des rapports isotopiques du Ca ($\delta^{44/42}Ca$). A l'aide d'une méthode de microéchantillonnage séquentiel le long de l'axe de croissance de l'émail, nous avons collecté plus de 150 microéchantillons d'émail de 51 dents de lait issues de 12 humains modernes d'histoires alimentaires connues. Nous avons également prélevé l'émail de 9 troisièmes molaires permanentes. Nous avons mesuré et reconstruit l'évolution des rapports $^{44}Ca/^{42}Ca$ de l'émail depuis le développement* in utero *jusqu'aux premiers mois de développement postnatal. Nous montrons que les variations observées de $\delta^{44/42}Ca$ enregistrent une transition depuis la nutrition placentaire jusqu'à l'acquisition d'un régime similaire aux régimes adultes. Nous montrons également que les isotopes du Ca reflètent la durée d'allaitement vécu par chaque nouveau-né. Ainsi, les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ d'individus peu ou pas allaités présentent une augmentation systématique au cours des premiers 5 à 10 mois, tandis que les individus ayant été allaités longtemps ne présentent pas de dérive mesurable des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$. L'utilisation des mesures de rapports isotopiques du Ca dans l'émail dentaire permet le microéchantillonnage et offre une approche indépendante permettant de traiter des questions centrales en lien avec les dynamiques des populations passées et l'évolution des pratiques de sevrage des hominines.* [1]

http://doi.org/10.1073/pnas.1704412114

1. Les suppléments sont présentés à la suite de cet article, à l'exception de la Figure S4 présentée en Annexe H.

Conclusion de la Partie II

Les sources de Ca déterminent donc en grande partie la variabilité des compositions isotopiques des organismes. Le lien entre composition isotopique de la source et celle des tissus minéralisés est déterminant pour expliquer l'existence d'un effet trophique isotopique pour le Ca. Cependant l'adéquation entre les sources d'énergie, qui déterminent le niveau trophique, et les sources de Ca est variable selon les espèces ce qui explique probablement une partie de la variabilité résiduelle, qui n'apparaît pas être rattachée directement au niveau trophique de l'espèce considérée. La variabilité isotopique de l'environnement explique également probablement une partie importante de la variabilité inter- et intraspécifique, d'après les analyses de compositions des sources primaires de Ca : les eaux de mer et continentales ainsi que les végétaux.

Chez l'homme, il apparaît que la composition isotopique de l'alimentation hérite probablement de la variabilité des compositions de l'environnement, y compris des plantes, mais la consommation de produits laitiers dans des proportions variables peut expliquer des variations de composition alimentaire moyenne pouvant atteindre plus de 0.50 ‰. Les résultats préliminaires d'une compilation de compositions isotopiques d'os humains datant du paléolithique jusqu'à aujourd'hui dénotent une variation d'une amplitude comparable, ce qui est compatible avec une augmentation très significative de la proportion de Ca provenant des produits laitiers possiblement contemporaine ou succédant au néolithique, et variant d'une proportion inférieure à 20 % jusqu'à une proportion actuelle de plus de 40 voire plus de 60 % pour les populations étudiées. L'alimentation moderne occidentale moyenne présenterait donc une composition isotopique moyenne comprise entre -1.11 et -0.86 ‰. Ces résultats confirmeraient les hypothèses énoncées dans les années 2000 et ouvrent de nouveau les perspectives sur l'étude de la consommation de produits laitiers au cours de l'histoire humaine. L'étude suggère cependant que les variations de consommation de produits laitiers doivent représenter au moins de l'ordre de 10 % des apports en Ca pour que les compositions isotopiques de l'alimentation présentent des variations observables.

Enfin, à l'échelle de l'histoire d'un individu humain, les transitions nutritionnelles vécues à la naissance et à l'arrêt de la consommation de lait maternel se traduisent par des variations de compositions isotopiques de l'émail dentaire formé au cours de ces périodes. Ces résultats ouvrent des perspectives sur l'étude des pratiques de sevrage dans les populations humaines passées et de la lignée humaine.

L'ensemble de ces conclusions sont issues des constats initiaux qu'il existe des différences de compositions entre l'organisme et son environnement, induites par la physiologie et relativement conservées au sein des mammifères, d'une espèce à une autre et entre individus. Cependant, les causes physiologiques ne sont pas ou peu expliquées et nécessitent l'exploration de la distribution des isotopes du Ca au sein de l'organisme et la construction d'un modèle de l'organisme permettant de synthétiser ces observations et d'expliquer ces distributions. Ceci fait l'objet de la Partie III qui suit.

Troisième partie

Effets physiologiques : observations et modélisations

Introduction à la Partie III

La compréhension actuelle des mécanismes responsables de la distribution des isotopes du Ca dans l'organisme d'un mammifère sain et adulte est actuellement héritée de deux observations.

i) La composition isotopique de l'os est appauvrie relativement à l'alimentation, avec une amplitude initialement estimée à -0.65 ‰ et parfois arrondie à -0.75 ‰ (Skulan et DePaolo 1999). Selon cette première étude, la variabilité observée dans les compositions des tissus mous et du sang des quelques animaux étudiés refléterait le statut nutritionnel et physiologique sur le court terme de l'individu mais les compositions des tissus mous et par extension du sang seraient identiques ou assimilables à l'alimentation sur le long terme. Cette hypothèse énoncée est utilisée depuis dans la plupart des discussions portant sur les variations des compositions isotopiques induites par la physiologie de l'organisme. Tous les modèles mathématiques développés par la suite ont été construits en supposant un fractionnement isotopique localisé à la minéralisation de l'os et d'une amplitude $\Delta^{44/42}Ca_{Os-Tissus\,mous} = \Delta^{44/42}Ca_{Os-Sang} = \Delta^{44/42}Ca_{Os-Alim.}$ = -0.65 voire -0.75 ‰ (Skulan et DePaolo 1999, Skulan *et al.* 2007, Reynard *et al.* 2010, Heuser et Eisenhauer 2010, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015). Cependant cette hypothèse est fondée sur des observations réalisées sur un nombre restreint de vertébrés de physiologies variées (le cheval, une otarie trouvé mort, un poulet et un mérou) et n'est pas appuyée par l'étude de mammifères élevés en conditions contrôlées. Par ailleurs, aucun mécanisme de fractionnement n'est avancé permettant d'expliquer la composition aussi appauvrie en isotopes lourds de l'os relativement au Ca alimentaire.

ii) La composition des urines est enrichie relativement au sang de l'ordre de +1 ‰. Ceci a été suggéré par deux études ne portant que sur des urines humaines (Skulan *et al.* 2007, Heuser et Eisenhauer 2010) puis confirmé par des analyses de sang et d'urines de cochon (Morgan *et al.* 2012a, Heuser 2016), de mouton (Tacail *et al.* 2014) et d'humains (Channon *et al.* 2015). Le fractionnement à l'excrétion des urines est donc pris en compte dans certains modèles depuis lors (Heuser et Eisenhauer 2010, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015).

L'ensemble des modèles conceptuels et mathématiques qui en découlent est donc fondé sur ces observations, incluant l'hypothèse forte que le fractionnement biologique responsable des compositions aussi appauvries en isotopes lourds de l'os est le résultat du processus de minéralisation. Par ailleurs, ces modèles ne s'attachent pas à expliquer la distribution des isotopes du Ca dans l'organisme mais à prédire les effets de déséquilibres du remodelage osseux sur la composition isotopique du sang et des urines.

Il existe d'autres flux et réservoirs pouvant participer à la discrimination des isotopes du Ca à l'échelle tissulaire et de l'organisme (Fig. 1.5, Chapitre 1) et n'ayant ni été caractérisés, ni pris en compte dans les modélisations précédentes : l'absorption à travers l'épithélium intestinal pourrait induire des fractionnements isotopiques du Ca selon son environnement chimique dans le chyme, son abondance et l'absorption elle-même (para- ou transcellulaire) ; les sécrétions digestives produites par les glandes salivaires, le foie ou le pancréas pourraient également participer à la redistribution des isotopes du Ca de l'organisme ; enfin, l'excrétion préférentielle des isotopes lourds par le rein pourrait participer à la détermination de la composition du reste de l'organisme.

Il est donc nécessaire de mieux définir les relations entre les différents réservoirs et flux principaux de Ca de l'organisme afin de développer un modèle, fondé sur des observations actualisées et permettant d'expliquer globalement la distribution des isotopes du Ca à travers l'organisme sain.

Cette partie s'attache donc dans un premier temps à actualiser la description des distributions des isotopes du Ca à travers les principaux réservoirs et flux de l'organisme, à discuter des mécanismes possibles responsables des fractionnements isotopiques localisés et enfin à dessiner un modèle conceptuel sur la base de ces observations (Chapitre 9). Dans un second temps, je présenterai les résultats de premières modélisations mathématiques permettant de discuter des causes principales de la distribution des isotopes du Ca dans l'organisme, et notamment des compositions isotopiques extrêmes du Ca osseux (Chapitre 10).

Chapitre 9

Distribution des isotopes du Ca dans l'organisme

Sommaire

I Introduction . . . 114

II Matériel et méthodes . . . 114

A Echantillons de moutons . . . 114

B Echantillons de rats . . . 114

C Echantillons humains . . . 115

D Analyses des compositions isotopiques du Ca . . . 117

III Résultats et relations entre les principaux réservoirs . . . 117

A Relations entre os et Ca alimentaire . . . 117

B Relations entre sang et urines . . . 118

C Composition isotopique du sang et relations entre le sang et l'os . . . 121

D Tissus mous, absorptions et excrétions . . . 128

IV Mécanismes des fractionnements des isotopes du Ca . . . 130

A Fractionnement rénal des isotopes du Ca . . . 131

B Autres transports transépithéliaux . . . 135

C Fractionnement à la minéralisation osseuse . . . 139

D Fractionnements dans les tissus mous et Ca intracellulaire . . . 140

V Mécanismes moléculaires possibles . . . 140

VI Bilan et modèle conceptuel . . . 141

A Fractionnements isotopiques . . . 141

B Modèle conceptuel 142

I Introduction

L'approche privilégiée dans l'exploration des distributions des isotopes du Ca chez les mammifères est l'étude d'animaux élevés en conditions contrôlées.

La première étude portait sur des échantillons de sang et d'os de souris (Hirata *et al.* 2008). La seconde est celle présentée en Chapitre 3 dans l'article « *A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples* » portant sur l'exploration des compositions de tissus et fluides de 4 moutons élevés en conditions contrôlées. Enfin, une étude portant sur des cochons nains de Göttingen a dernièrement fait état des compositions isotopiques du sang, de l'os, des urines et des excréments d'un groupe témoin, d'un groupe d'individus à ostéoporose induite par injections de glucocorticostéroïdes et enfin d'un groupe au régime carencé en Ca et vitamine D. L'ensemble de ces données est discuté dans ce chapitre pour le groupe témoin uniquement, sauf indication contraire. Par ailleurs, des mesures ont été réalisées chez l'humain et le rat pour des cohortes saines décrites ci-dessous.

Après avoir discuté des relations entre les sources, réservoirs, apports et pertes de Ca que sont l'alimentation, le sang, l'os, les sécrétions digestives et les urines, je discuterai des mécanismes responsables des fractionnements à l'échelle des tissus puis résumerai l'ensemble de ces observations et des hypothèses afin d'esquisser un modèle de boîtes global de l'organisme.

II Matériel et méthodes

A Echantillons de moutons

Les moutons, présentés en Chapitre 3, sont des animaux ayant été élevés en conditions contrôlées au cours d'une expérience décrite préalablement (Zazzo *et al.* 2008, Balter *et al.* 2010). Les matériaux prélevés sont des échantillons de plasma sanguin, de globules rouges, d'os, d'émail dentaire (molaires), de foies, de reins, de muscles, d'urines, d'excréments et de nourriture composée essentiellement de plantes herbacées.

B Echantillons de rats

Les rats ont été élevés dans le cadre d'expériences réalisées sous l'autorisation n°69-266-0501, en accord avec les directives établies par le Ministère Français de l'Agriculture (n°2013-118) et la directive du 22 septembre 2010 (2010/63UE) du conseil de l'Union Européenne, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique local (Comité Ethique de l'INSA-Lyon-CETIL, CRNEEA n°102).

Des rats mâles adultes de types Sprague Dawley de 150 à 175 g (6 à 7 semaines d'âge) ont été fournis par Janvier-Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) et élevés dans une pièce à air conditionné, dont l'environnement est contrôlé en température (21 $\pm$ 0.5 ^{o}C) et humidité (60 à 70 %), avec des cycles jour-nuit de 12 h et un accès libre à l'eau et la nourriture. Treize rats ont été élevés pendant 9 semaines en conditions standard au cours de 3 sessions d'élevage (4 pour la période avril-juin 2014, 6 pour avril-juin 2016 et 3 pour octobre-décembre 2016). Les rats étaient nourris avec des aliments standard (A04, 13.4 kJ.g^{-1}) au cours de toute la période d'observation. Un jour avant le sacrifice, les rats ont été transférés en cages métaboliques (Laboratoire Charles River, L'Arbresle, France) pour une collecte des urines de 24 h. Ils sont alors âgés de 15 à 16 semaines et pèsent 606$\pm$22 g (2SEM). Ils ont ensuite été profondément anesthésiés par injection de pentobarbital de sodium (200 mg.kg^{-1} ip). Le sang (environ 10 mL) a été collecté par ponction cardiaque à l'aide de seringues héparinées, puis centrifugé 2 minutes à 2000 ***g*** afin de séparer le plasma qui a ensuite été congelé par trempage dans l'azote liquide à -80 ^{o}C jusqu'à analyse. Les fémurs ont été prélevés par dissection anatomique et congelés par trempage dans l'azote liquide à -80 ^{o}C.

Le bilan des échantillons de rats analysés est présenté en Tableau I.1 en Annexe I.

C Echantillons humains

Des échantillons de prélèvements synchrones de plasma et d'urines de mictions uniques provenant d'une cohorte de 14 individus sains (7 femmes et 7 hommes) ont été analysés. Ces échantillons proviennent d'une étude nutritionnelle décrite par (Nazare *et al.* 2010) (protocole « Eurostarch »). Les échantillons de plasma et d'urine utilisés ici ont été prélevés le matin entre 7 h et 9h sur l'individu jeûnant depuis 20 h la veille pour la nourriture et minuit pour l'eau, et avant le début de l'expérience nutritionnelle (à T-15 et T-0 minutes). Des échantillons de sang total et de plasma, d'urines de mictions uniques et de 12 h, de salive et de lait maternel ont été collectés chez 6 volontaires sains (3 femmes dont une allaitante et 3 hommes) de la métropole lyonnaise, d'âges compris entre 24 et 54 au moment des prélèvements. L'ensemble de ces échantillons est présenté dans le Tableau I.2 en Annexe I.

Les compositions isotopiques d'urines de trois volontaires sains ont été suivis durant 3 à 5 jours afin d'explorer la variabilité au sein d'une journée et d'un jour à l'autre. Les urines d'un individu ont été collectées par tranches de 12 h (Vlt-C) pour des périodes diurnes (8 h-20 h) et nocturnes (20 h-8 h). Les urines des deux autres individus (Vlt-E et Vlt-T) ont été collectées selon quatre périodes types : au réveil pour la collecte des urines de la nuit, au cours de la matinée jusqu'au repas de la mi-journée, au cours de l'après-midi, jusqu'au repas du soir, au cours de la soirée jusqu'au coucher. Aucune miction n'ayant eu lieu la nuit, les urines de la nuit sont reflétées par la collecte du lever. Les volumes ont été mesurés ainsi que les concentrations en éléments majeurs (ICP-AES) dont le Ca pour la mesure de la calciurie et le calcul du Ca excrété. Les échantillons sont décrits en Tableau I.3 en Annexe I. Les échantillons de sang de volontaires

ont été collectés en tubes héparinés ou EDTA sans gel puis centrifugés à 1300 g (3500 rpm pour rotor incliné) pendant 12 à 15 minutes. Le plasma séparé a ensuite été acidifié puis traité comme décrit dans Tacail *et al.* (2014).

Enfin, des échantillons d'os (fémur) et de sérums sanguins ont été prélevés sur des échantillons d'autopsies, considérés comme déchets biologiques, réalisées au Service de Médecine Légale, Hôpital Edouard Herriot F-69003 Lyon (Pr. Fanton, avec l'aide de Dr. Barbesier) sur 6 individus décédés de causes traumatiques. L'ensemble des échantillons est décrit en Tableau I.4 en Annexe I.

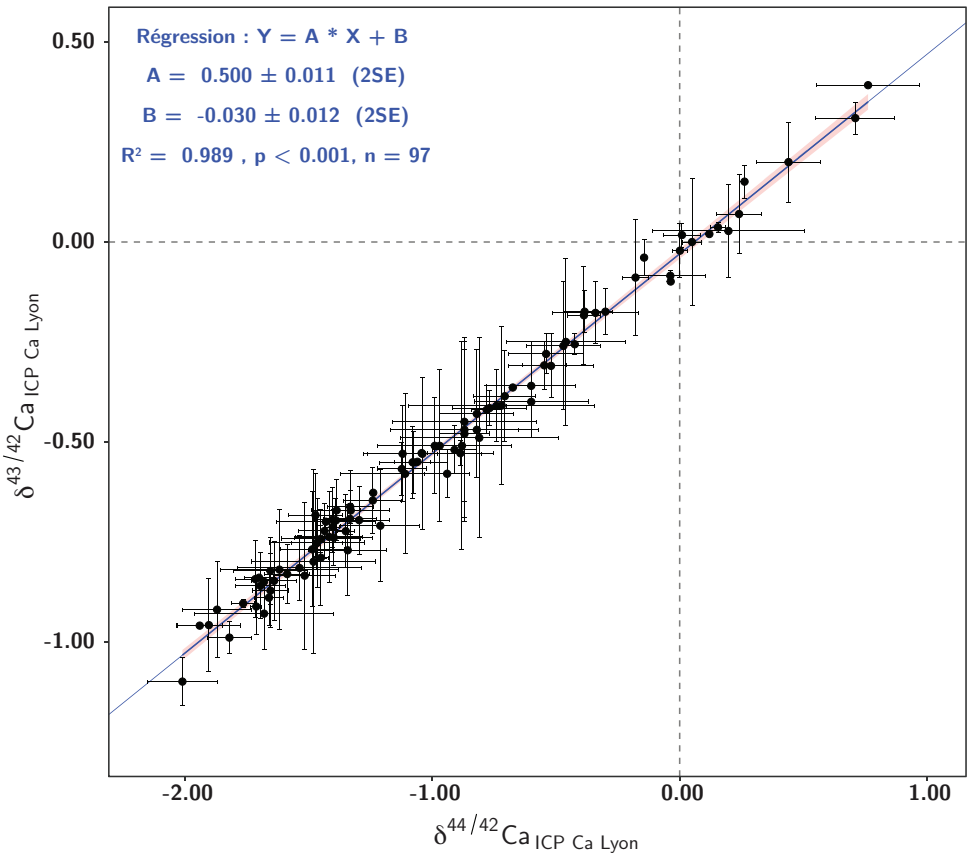

FIGURE 9.1 – $\delta^{43/42}Ca$ **en fonction de** $\delta^{44/42}Ca$ **(‰, rel. *ICP Ca Lyon*) pour toutes les analyses présentées en partie III.** Les compositions isotopiques du Ca se distribuent sur une droite d'ordonnée à l'origine proche de 0 et une pente de 0.500 ± 0.011 (2SE), ne pouvant être distinguée des pentes prédites par les lois exponentielle (0.507), inverse (0.512) et puissance (0.501) des fractionnements dépendants de la masse. Les barres d'erreur correspondent aux 2SD. L'aire colorée en rouge délimite l'intervalle de confiance à 95 % sur la droite de régression linéaire donnée en bleu. $\delta^{43/42}Ca$ **as a function of** $\delta^{44/42}Ca$ **(‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) for analyses presented in part III.** Ca isotope compositions fall on a line with a y-intercept close to 0 and a slope of 0.500 ± 0.011 (2 SE) indistinguishable from predicted slopes according to exponential (0.507), inverse (0.512) or power (0.501) mass-dependent fractionation laws. Error bars correspond to 2SD. The red shaded area corresponds to the 95 % confidence interval on the regression line, drawn in blue.

D Analyses des compositions isotopiques du Ca

Les analyses ont été réalisées selon les procédures décrites en Chapitre 3. Les compositions se répartissent sur une droite de dépendance en masse proche de la droite théorique présentée en Figure 9.1.

Les données de la littérature présentées ici ont été compilées et converties vers le standard de référence *ICP Ca Lyon* selon la méthode décrite en Chapitre 4. Sauf indication contraire, l'ensemble des données de la littérature présentée est constitué de compositions de tissus d'individus adultes, sains ou en état physiologique basal. Par exemple, les compositions d'urines et de sang d'individus participant à des expériences d'alitement (Skulan *et al.* 2007, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015) sont uniquement celles des prélèvements à l'état basal, précédant les expériences.

III Résultats et relations entre les principaux réservoirs

A Relations entre os et Ca alimentaire

La compilation des données couplées de compositions isotopique du Ca alimentaire et des os est présentée en Figure 6.1 (Chapitre 6) pour 6 espèces de mammifères ainsi que le poulet. La différence moyenne entre les compositions de l'os et de l'alimentation ($\Delta_{Os-Alim.}$) semble être partagée par toutes les espèces et est estimée à -0.57±0.10 ‰ (2SE, intervalle de confiance à 95 %, test t de Student) d'après cette compilation.

L'inclusion d'un oiseau (Skulan et DePaolo 1999) à cette compilation est discutable. Sa physiologie du Ca diffère de celle des mammifères, notamment du fait de la ponte d'œufs à coquilles carbonatées. Il n'est pas précisé si l'oiseau analysé est une femelle pondeuse ou non or il apparaît que la différence entre la composition de son Ca alimentaire et son os semble se démarquer des autres mammifères par une amplitude plus importante ($\Delta_{Os-Alim.} \simeq$ -0.75 ‰).

Ainsi, en excluant le poulet du jeu de données, la valeur moyenne de $\Delta_{Os-Alim.}$ est estimée pour 6 espèces de mammifères à -0.54±0.08 ‰ (2SE , intervalle de confiance à 95 %, test t de Student). Les espèces considérées ici ont des régimes alimentaires et des physiologies digestives variées, avec deux herbivores non ruminants (cheval, souris), deux herbivores ruminants (cerf élaphe, mouton) ainsi qu'un omnivore (cochon) et un piscivore (otarie). La constance des valeurs de $\Delta_{Os-Alim.}$ suggère que les processus physiologiques responsables des fractionnements isotopiques du Ca sont relativement bien partagés entre ces espèces.

En somme, la valeur de $\Delta_{Os-Alim.}$ moyenne est donc probablement inférieure à la valeur arrondie de -0.75 ‰ utilisée jusque là dans certaines études pour modéliser l'organisme (Skulan et DePaolo 1999, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015). J'utiliserai dans la suite du raisonnement une valeur de $\Delta_{Os-Alim.}$ de -0.54±0.08 ‰, comprise donc entre un minimum de -0.46 et un maximum de -0.62 ‰.

B Relations entre sang et urines

Les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des urines de 12 ou 24 heures sont représentées en fonction des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ du sang échantillonné à la fin de ces prélèvements d'urine en Figure 9.2. Les compositions isotopiques se distribuent sur une droite ($R^2 = 0.816$, valeur $p = 2 \times 10^{-11}$ et Figure 9.2) de pente proche de 1. Les individus humains pour lesquels les urines de 12 h ont été analysées présentent une valeur de $\Delta_{Urine-Sang} = +1.16 \pm 0.12$ ‰ (2SE, test t de Student, n = 9 pour 6 individus), ce qui est en très bon accord avec l'estimation publiée en 2015 pour l'humain sain de $+1.16 \pm 0.12$ ‰ (2SE, test t de Student, n = 12), mesurée pour des urines de 24 h (Channon *et al.* 2015). Par ailleurs, les valeurs de $\Delta_{Urine-Sang}$ pour les urines de 24 h des rats ($+1.19 \pm 0.17$ ‰, 2SE, test t de Student, n = 5) sont également indiscernables de tous les humains ($+1.16 \pm 0.08$ ‰, 2SE, test t de Student, n = 21) et des cochons ($+1.04 \pm 0.16$ ‰, 2SE, test t de Student, n = 3). L'ensemble des urines de 12 et 24 h sont donc enrichies en isotopes lourds relativement au sang, avec une amplitude moyenne de $+1.15 \pm 0.06$ ‰ (2SE, test t de Student, n = 29) pour l'humain, le rat et le cochon.

Les valeurs de $\Delta_{Urines-Sang}$ des urines de mictions uniques synchrones des prélèvements sanguins de la cohorte Eurostarch (Symboles gris en Figure 9.2) sont du même ordre de grandeur mais apparemment plus dispersées, avec une amplitude moyenne de $+1.35 \pm 0.22$ ‰ (2SE, test t de Student, n = 8). Cette plus grande dispersion marque vraisemblablement les variations des compositions isotopiques des urines au cours de la journée, probablement dues à la régulation des flux de Ca selon l'état physiologique et nutritionnel.

A titre exploratoire, la variabilité quotidienne des compositions isotopiques des urines de trois individus sains a été étudiée. Les urines ont été récoltées par tranches de 12 h pour l'individu A et par tranches d'environ 6 h ou moins pour B et C (voir Tableau I.3 en Annexe I). Ces données sont présentées conjointement aux volumes (mL) et quantités de Ca excrété (mg), en Figure 9.3. On constate une apparente cyclicité des variations des compositions isotopiques chez A et C et probablement chez B malgré un échantillonnage lacunaire et réduit à trois jours.

Les amplitudes des variations d'une miction à une autre semblent dépendre de l'individu et sont comprises entre 0.20 et plus de 1 ‰ selon l'individu et la période de la journée. Pour A et C, les compositions des urines de la journée apparaissent avoir des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ plus basses que celles de la nuit alors que les compositions calculées des urines de 24 h varient dans des gammes plus restreintes de l'ordre de 0.20 ‰ pour A (5 jours), et 0.05 ‰ pour C (3 jours). Les causes de ces variations sont probablement multifactorielles, et incluent très certainement l'action du rein dans la régulation homéostatique de la calcémie ionisée, la nature, la fréquence et les quantités de Ca des apports alimentaires et les comportements alimentaires affectant l'homéostasie calcique (jeûne prolongé, espèces chimiques comme la caféine et le sodium aux effets diurétiques ou hypercalciuriants, *etc.*). Des variations temporelles des compositions isotopiques du sang peuvent également faire varier celles des urines. La discussion approfondie de ces causes

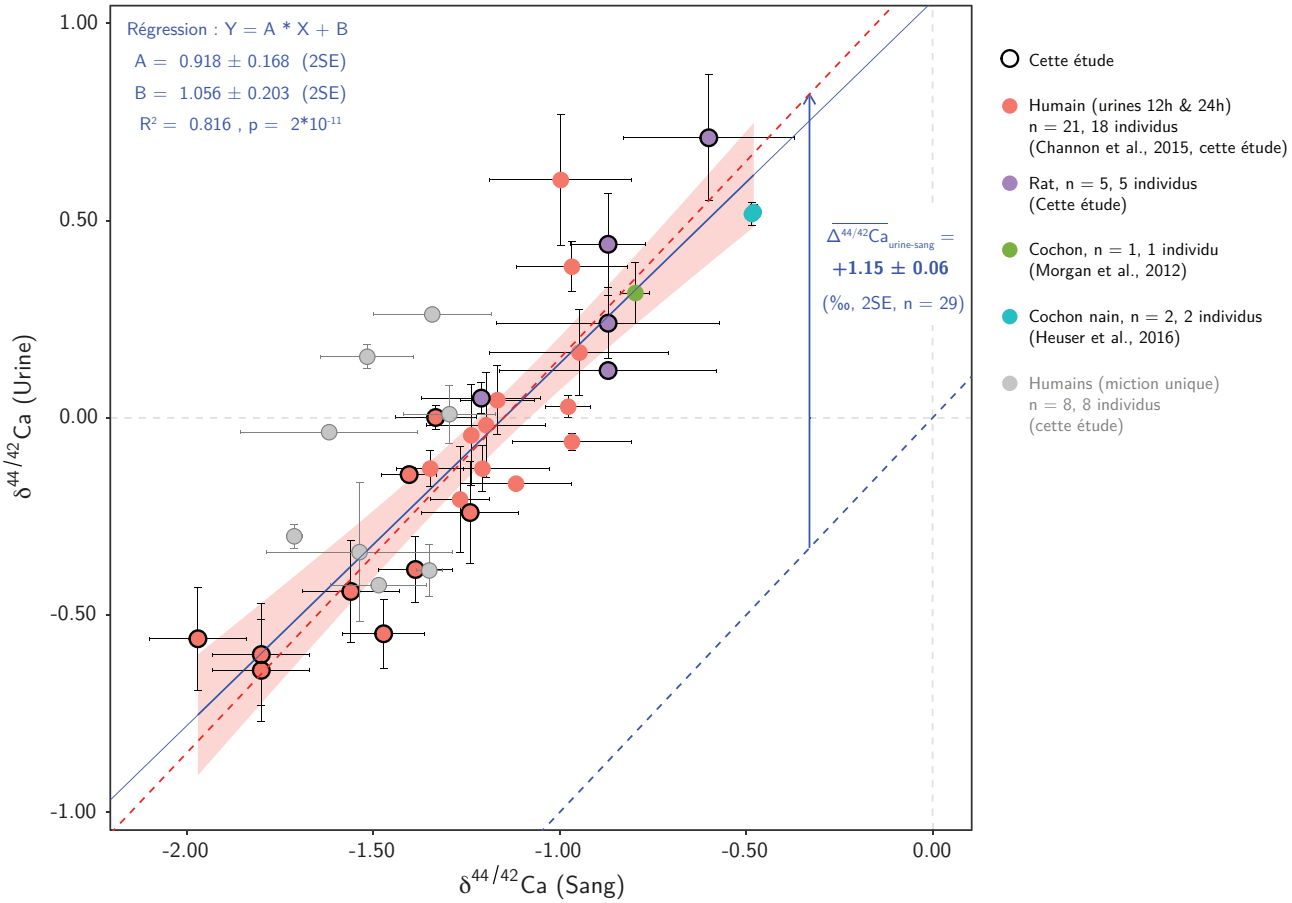

FIGURE 9.2 – **Valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des urines de 12 ou 24 heures en fonction de celles du Ca sanguin (plasma) chez les mammifères (‰, rel. *ICP Ca Lyon*)**. La droite en pointillés bleus est la droite identité, la droite bleue en trait plein correspond à la droite de régression linéaire dont l'équation est donnée en bleu, la droite en pointillés rouges est la droite y = x + 1.15 (Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015, Heuser *et al.* 2016a, cette étude). L'aire rosée correspond à l'intervalle de confiance à 95 % de la droite de régression. Chaque taxon est associé au nombre d'individus analysés. Les barres d'erreur sont les 2SD. Les échantillons humains issus de mictions uniques (cohorte Eurostarch) sont en gris et ne sont pris en compte ni dans la régression linéaire ni dans le calcul de la différence moyenne entre urines de 12 et 24 heures et le sang ($\Delta_{Urines-Sang}$).
$\delta^{44/42}Ca$ values for 12 and 24 hour urines as a fonction of $\delta^{44/42}Ca$ of blood plasma in mammals (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*). The blue dashed line is identity line, the blue full line corresponds to the linear regression line for which equation is given in blue. The red shaded area corresponds to the 95 % confidence interval for regression line. The red dashed line is the y = x + 1.15 line (Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015, Heuser *et al.* 2016a, this study). Each taxon is associated with the number of analyses and/or individuals. Error bars are 2SD. Human samples from unique micturitions (Eurostarch cohort) are in grey and not taken into account for linear regression calculation nor for calculation of average difference between 12 and 24 hours urines and blood ($\Delta_{Urines-Sang}$).

nécessiterait donc un travail dédié avec un suivi détaillé de l'alimentation et des conditions physiologiques, de la calcémie et de la composition isotopique du sang notamment.

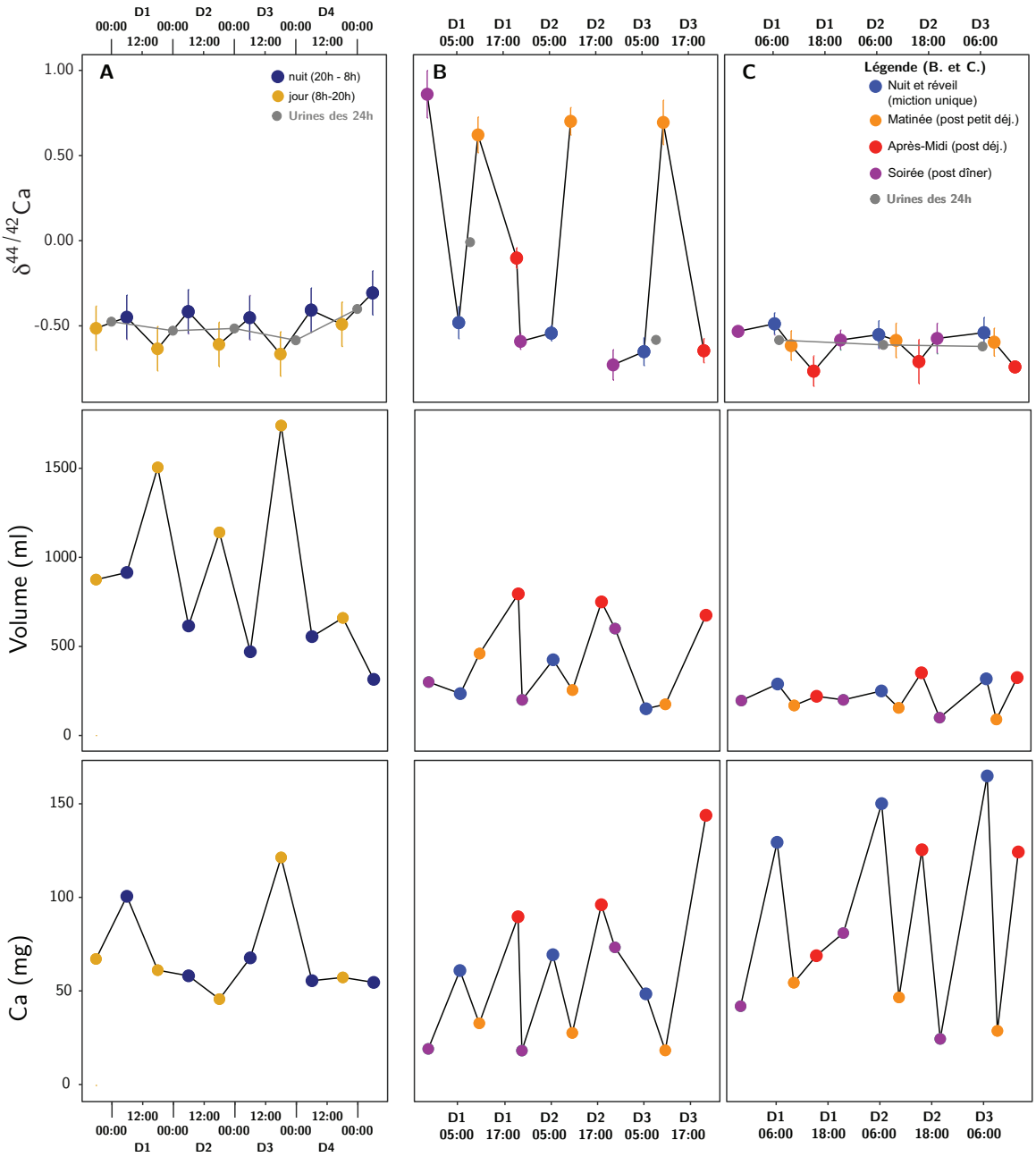

FIGURE 9.3 – **Variations quotidiennes de $\delta^{44/42}Ca$ dans les urines (‰, rel. *ICP Ca Lyon*), du volume émis (mL) et du Ca excrété (mg) pour 3 individus sains au cours d'une période de 3 à 5 jours. A.** Individu Vlt-C avec collecte des urines par tranches de 12h la nuit (20h-8h) et la journée (8h-20h). **B. et C.** sont deux individus (Vlt-E et Vlt-T) avec collectes plus résolues (voir Tableau I.3 en Annexe I). **Daily variations in urine $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*), volume (mL) and excreted Ca (mg) for 3 healthy individuals over a normal life period of 3 to 5 days. A.** Individual (Vlt-C) with 12 h urine collections for night (8pm-8am) and day (8am-8pm) periods. **B. and C.** are two individuals (Vlt-E and Vlt-T) with shorter collection periods : **Night and Waking up** : collection of night urines in the morning (single micturition), before breakfast if taken, **Morning** : collection of following urines up to noon meal, **Afternoon** : collection of urines following noon meal up to evening meal, **Evening** : collection of urines following evening meal up to bedtime. Described in Table I.3 in Annex I

Ces résultats soulignent cependant l'importance de la mesure de compositions isotopiques d'urines collectées sur des périodes de l'ordre de 24 h (Morgan *et al.* 2012a) voire d'une semaine (Skulan *et al.* 2007) pour l'étude des fractionnements isotopiques moyens induits par le rein et pour le suivi de la perte osseuse.

En conclusion, les urines des 24 h sont corrélées à la composition moyenne du sang, ce qui permet de confirmer que les compositions des urines de 24 h reflètent celles du sang à l'état sain. On constate par ailleurs que la fonction rénale induit des fractionnements isotopiques très conservés pour les trois espèces considérées ce qui suggère des mécanismes de fractionnements communs chez ces trois espèces, et probablement chez les autres animaux partageant une physiologie rénale comparable.

C Composition isotopique du sang et relations entre le sang et l'os

Le sang constitue un réservoir de Ca dynamique dont les compositions isotopiques sont susceptibles de varier rapidement du fait des changements des conditions physiologiques. Si l'on considère la totalité du Ca du liquide extracellulaire, sang inclus, le temps de résidence du Ca, calculé par division de la masse de Ca du réservoir par la somme des flux sortants, atteint une à deux heures (en utilisant les ordres de grandeurs donnés en Figure 1.5 du chapitre 1 pour un adulte de 70kg). Le Ca du plasma constitue un réservoir de taille réduite et son temps de résidence y est inférieur à 40 mn en considérant une masse de Ca sanguin de 300 mg et des flux sortants de 10 000 mg vers le rein, 500 mg vers l'os, 180 mg vers le tube digestif, auxquels nous pourrions ajouter les flux vers les autres tissus et organes non-excréteurs. Enfin, ce réservoir extrêmement dynamique est lui-même compartimenté. Le Ca^{2+} libre, représentant environ la moitié du Ca sanguin, est la fraction réellement régulée et son temps de résidence peut y être estimé de la même manière à moins de 20 mn.

Ces temps caractéristiques font du sang un réservoir difficile à étudier en conditions normales pour ce qui est de ses compositions isotopiques en Ca. Il est notamment peu aisé d'estimer la composition moyenne du sang pour un individu puisque les conditions de prélèvement pourraient affecter sa composition : statut nutritionnel (jeûnant ou non), régulation homéostatique, types d'alimentation ou lieu de ponction si l'on fait l'hypothèse d'une possible hétérogénéité des compositions isotopiques au sein même du système circulatoire (*e.g.* vaisseaux efférents et afférents de l'ensemble des organes irrigués).

Le but premier ici est de mieux définir la composition isotopique moyenne du Ca sanguin des mammifères adultes avec lequel l'os en remodelage est à l'équilibre en termes de flux élémentaires et isotopiques du Ca. Je considérerai donc le Ca^{2+} plasmatique ou sérique total et m'attacherai à décrire les relations entre compositions isotopiques du sang et des os mesurées conjointement chez des individus adultes étudiés au cours de cette thèse (mouton, rat et humain) et de la littérature. Je présenterai ensuite les distributions des compositions isotopiques du Ca à l'échelle de groupes d'individus pour les principaux réservoirs et flux

entrants ou sortants de Ca que sont l'alimentation, le sang, les os, les urines et les excréments.

1 Valeurs intraindividuelles de $\Delta_{Sang-Os}$

Comme suggéré précédemment, l'estimation de la valeur de $\Delta_{Sang-Os}$ à l'équilibre est complexe du fait de la dichotomie entre le grand temps de résidence du Ca osseux, de l'ordre de 5 à 10 ans, et celui particulièrement court du Ca sanguin. Le bilan des différences calculées entre $\delta^{44/42}Ca$ du sang et de l'os de mêmes individus est présenté en Figure 9.4.

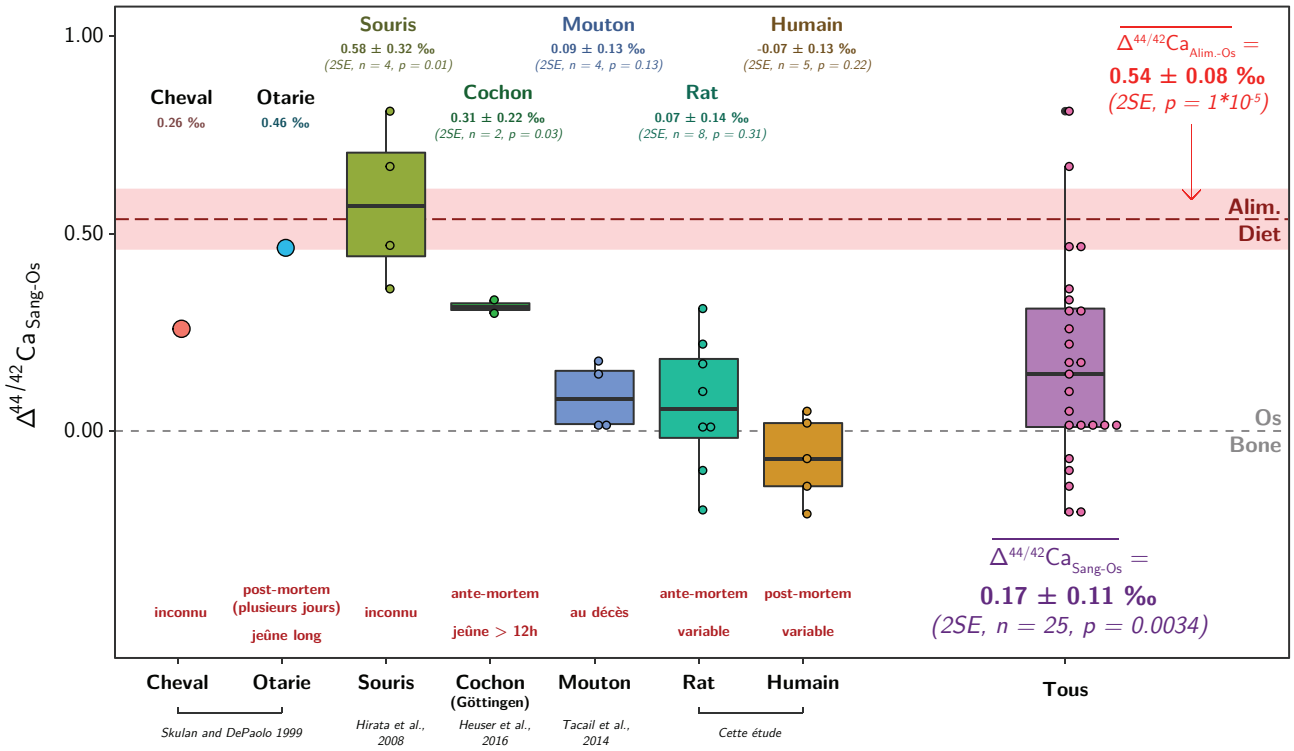

FIGURE 9.4 – **Valeurs de $\Delta_{Sang-Os}$ ($\delta^{44/42}Ca_{Sang} - \delta^{44/42}Ca_{Os}$ en ‰) pour l'ensemble des compositions couplées intraindividuelles de sang et d'os de la littérature et de cette étude.** Les moyennes, les erreurs (2SE, intervalle de confiance à 95 %) et les valeurs *p* sont calculées selon le test t de Student de comparaison entre les groupes de valeurs de $\Delta_{Sang-Os}$ et 0 ‰, c'est-à-dire la composition de l'os. En rouge sombre sont données les conditions physiologiques dans lesquelles les prélèvements sanguins ont été effectués. **Values of $\Delta_{Blood-Bone}$ ($\delta^{44/42}Ca_{Blood} - \delta^{44/42}Ca_{Bone}$ in ‰) for all the intraindividual paired isotope compositions of blood and bone from literature and this study.** Averages, errors (2SE, 95 % confidence intervals) and p-values are calculated using the t-test of Student for comparison between group of $\Delta_{Blood-Bone}$ values and 0 ‰, that is bone isotope composition. In dark red are indicated the physiological conditions in which blood was sampled. Données issues de (Skulan et DePaolo 1999, Hirata *et al.* 2008, Heuser 2016, Tacail *et al.* 2014, cette étude)

On constate que les compositions isotopiques du sang sont très variables et se distribuent entre celles de l'os et de l'alimentation selon l'espèce ou l'animal considéré. En plus de mettre en jeu des espèces variées, les différents jeux de données comparés sont particulièrement hétérogènes en tailles et natures des cohortes ainsi qu'en conditions d'échantillonnage. Ceci participe probablement à la variabilité constatée des

compositions du sang.

Il est possible que la durée du jeûne influence la composition isotopique du sang du fait de la mise en place de mécanismes de régulation homéostatique du Ca visant à contrer les pertes obligatoires de Ca urinaire. Par ailleurs, le décès pourrait engendrer des variations de compositions isotopiques par l'arrêt de l'homéostasie calcique, probablement associé à une hausse de la concentration en Ca^{2+} sérique dans les heures suivant le décès (Zhu *et al.* 2005). L'otarie a été retrouvé morte, possiblement depuis plusieurs jours et les causes du décès et conditions post-mortem sont inconnues (Skulan et DePaolo 1999). Cet individu ne sera donc pas pris en compte dans le reste de la discussion.

A l'exception de l'otarie, il est donc difficile d'éliminer en conscience certains groupes pour causes de non-représentativité.

L'ensemble des données suggère cependant une composition isotopique moyenne du sang significativement appauvrie relativement à l'alimentation à l'exception des souris (Hirata *et al.* 2008) pour lesquelles les conditions des individus à l'échantillonnage du sang sont inconnues. Les compositions isotopiques des sangs de cheval, de cochon, de mouton, de rat et d'humain se distinguent en effet des compositions de l'alimentation. Si l'on compare la distribution à la plus faible amplitude $\Delta_{Alim.-Os}$ estimée (+0.46 ‰), la différence reste très significative ($p = 4 \times 10^{-9}$ du test t de Student).

Les échantillons sanguins de rats ont été prélevés alors que les rats étaient anesthésiés par ponction intracardiaque d'environ 10 mL, soit 25 à 30 % du volume sanguin total de rats pesant en moyenne 600g (Lee et Blaufox 1985). Par ailleurs, les rats étaient nourris *ad libitum* ce qui implique des statuts nutritionnels instantanés variables d'un individu à un autre au moment de la ponction. Les compositions isotopiques de ces échantillons sont donc probablement représentatives du sang moyen. On constate ainsi que la distribution des valeurs de $\Delta_{Sang-Os}$ des rats ne peut être distinguée des moutons et des humains et présente une moyenne de 0.07 $\pm$ 0.14 ‰, ne pouvant être distinguée de 0 ‰, c'est à dire de la composition isotopique de l'os.

Ces résultats suggèrent que les compositions isotopiques du Ca sanguin moyen ne reflètent pas celles du Ca alimentaire. La formation de l'os n'induirait pas un fractionnement isotopique aussi grand que l'amplitude entre le Ca alimentaire et l'os. Ces données prises dans leur ensemble suggèrent un fractionnement à la minéralisation provoquant une variation de -0.17 $\pm$ 0.11 ‰ (2SE, n = 25) voire -0.07 $\pm$ 0.08 ‰ (2SE, n = 20) en ne considérant ni l'otarie et ni les souris. Ceci n'exclut pas la possibilté qu'il n'y ait pas de fractionnement à la minéralisation. Ces valeurs contrastent grandement avec l'amplitude de -0.65 ‰, réestimée à -0.54 $\pm$ 0.08 ‰ entre l'alimentation et l'os, proposée initialement comme valeur de $\Delta_{Os-Sang}$ et utilisée depuis dans les discussions et modélisations mathématiques.

2 Distributions interindividuelles

Modèles animaux La seconde approche consiste à comparer les compositions des différents réservoirs pour des populations homogènes d'individus. Chez l'animal, les données pour le mouton, le cochon et le rat donnent accès aux distributions des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ du sang, de l'os et des urines, ainsi qu'à l'alimentation et aux fèces pour le mouton et le cochon (Figure 9.5.A., B. et C.). Il est ainsi possible d'estimer une distribution type pour l'ensemble des expériences d'élevage en conditions contrôlées (Figure 9.5.D.).

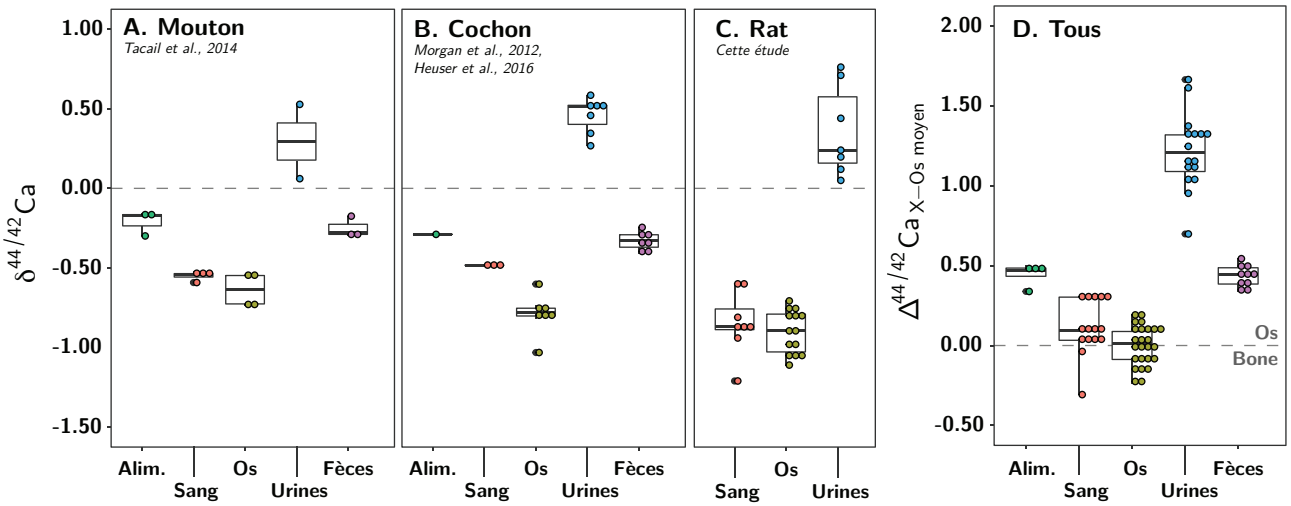

FIGURE 9.5 – **Distributions des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) chez A. le mouton (Tacail *et al.* 2014), B. le cochon (Morgan *et al.* 2012a, Heuser 2016) et C. le rat (*cette étude*) pour l'alimentation, le sang, l'os, les urines et les fèces. La figure D. représente l'ensemble des différences Δ_{X-Os} de chaque matériau relativement à la moyenne de la composition de l'os de chaque cohorte.** Cette figure est associée au Tableau 9.1 donnant les différences moyennes entre les différents matériaux. **Distributions of $\delta^{44/42}Ca$ values (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) in A. sheep (Tacail *et al.* 2014), B. pig (Morgan *et al.* 2012a, Heuser 2016) and C. Rat (*This study*) for diet, blood, bone, urines and feces. Figure D. represents the distribution of the differences Δ_{X-Bone} between each material and the average bone composition of each cohort.** This figure is associated with Table 9.1, showing average differences between all materials.

L'approche à l'échelle de la population présentée en Figure 9.5 confirme les relations décrites précédemment entre l'alimentation et l'os (-0.44 ± 0.11 ‰ compatible avec la valeur estimée à -0.54 ± 0.08 ‰ en section A de ce chapitre) ainsi qu'entre le sang et les urines (+1.10 ± 0.15 ‰ ne pouvant être distingué de la valeur de +1.15 ± 0.06 ‰ estimée précédemment).

On constate par ailleurs que la composition isotopique de l'ensemble des échantillons de sang est significativement différente de l'alimentation, avec une différence estimée à -0.33 ± 0.12 ‰ (valeur $p = 7\times10^{-5}$ et voir Tableau 9.1).

Cette approche permet enfin de constater que les compositions isotopiques du sang semblent se distri-

TABLEAU 9.1 – **Différences moyennes entre les $\Delta^{44/42}Ca_{X-Os}$ des compartiments présentés en Figure 9.5.D.** (Ligne-Colonne). Les précisions sont les intervalles de confiances à 95 %. Les calculs sont effectués par test t de Student pour des variances inégales (test t de Welch). NS, valeur *p* non significative ; **p* = 0.01–0.05 ; ***p* = 0.001–0.01 ; and ****p* < 0.001. **Average differences between $\Delta^{44/42}Ca_{X-Bone}$ of compartments presented in Figure 9.5.D.** (Row-Column). Precisions are 95 % confidence intervals. Calculations are performed using the t-test of students for inequal variances (Welch's t-test). NS, nonsignificant *p* value ; **p* = 0.01–0.05 ; ***p* = 0.001–0.01 ; and ****p* < 0.001

	Alimentation	**Os**	**Sang**	**Urines**
Os	**-0.44 ± 0.11 ‰** *** (p = 4×10^{-5})	-	-	-
Sang	**-0.33 ± 0.12 ‰** *** (p = 7×10^{-5})	**+0.11 ± 0.10 ‰** * (p = 0.03)	-	-
Urines	**+0.77 ± 0.15 ‰** *** (p = 5×10^{-9})	**+1.21 ± 0.13 ‰** *** (p = 3×10^{-14})	**+1.10 ± 0.15 ‰** *** (p = 1×10^{-14})	-
Fèces	**+0.01 ± 0.11 ‰** NS (p = 0.85)	**+0.44 ± 0.07 ‰** *** (p = 4×10^{-14})	**+0.32 ± 0.10 ‰** *** (p = 2×10^{-6})	**-0.78 ± 0.13 ‰** *** (p = 2×10^{-10})

buer à proximité de celles de l'os, avec une valeur moyenne possiblement légèrement enrichie en isotopes lourds de +0.11 ± 0.10 ‰ relativement à l'os ($p = 0.03$, test t de Welch, Tableau 9.1). Ceci n'exclut pas la possibilité qu'il n'y ait pas de fractionnement à la minéralisation.

Humains Les jeux de données disponibles de compositions isotopiques du Ca du sang, d'urines et d'os de populations humaines sont très limités aujourd'hui. Seules les compositions isotopiques des urines et de sang en conditions basales d'individus sains américains participant à deux expériences d'alitement sont disponibles dans la littérature (Skulan *et al.* 2007, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015). Comparées aux compositions des échantillons de sang et d'urines présentés dans cette section (Figure 9.6), celles des individus américains conservent la relation entre sang et urine d'environ +1.15 ‰ mais sont globalement enrichies en isotopes lourds en comparaison avec les échantillons français, avec une amplitude d'environ +0.41 ‰. Cette différence significative (valeurs *p* inférieures à 10^{-4}, Figure 9.6) marque très probablement une différence de comportements alimentaires, potentiellement due à des contrastes dans les pratiques de consommation des produits laitiers entre les deux populations étudiées. Malgré l'absence d'informations spécifiques sur l'alimentation moyenne de ces deux groupes, on note que les deux mesures de composition de l'alimentation totale de la cohorte étudiée par Skulan *et al.* (2007) présentent des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de -0.51 ± 0.07 ‰ et -0.52 ± 0.07 ‰ respectivement (rel. *ICP Ca Lyon*), ce qui se trouve être parmi les valeurs les plus enrichies en isotopes lourds de la distribution des compositions isotopiques de l'alimentation présentée en Chapitre 7. La différence entre cette composition moyenne de -0.51 ‰ et la composition d'une alimentation très riche en Ca des produits laitiers, tendant vers -1 ‰, est compatible avec la différence

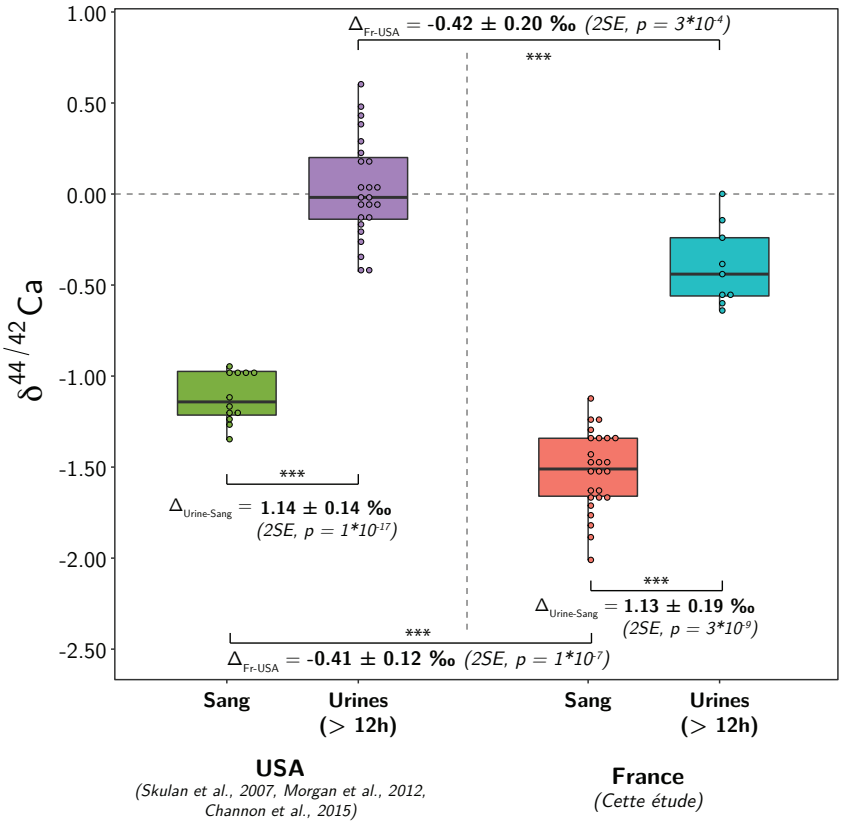

FIGURE 9.6 – **Valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) du sang et des urines des cohortes des Etats-Unis (USA, à gauche) et de France (à droite).** Les différences moyennes entre les groupes sont données avec les 2SE et valeurs *p* calculées selon le test t de Student avec variances inégales (test t de Welch). **$\delta^{44/42}Ca$ values (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) in blood and urines of cohorts from USA (left) and France (right).** The average differences between groups are given with 2SE and *p*-values calculated using the Student t-test for inequal variances (Welch's t-test). Données issues de (Skulan *et al.* 2007, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015, cette étude)

entre ces deux populations.

Dans le but de discuter des relations entre compositions isotopiques du sang et de l'os humain, je choisis donc de ne considérer que les échantillons du groupe issu de la population française, présentés en Figure 9.7. Ces échantillons de sang et d'urine sont issus de la cohorte Eurostarch et de celle constituée pour cette étude (Rhône-Alpes). Les échantillons d'os sont ceux prélevés au cours d'autopsies réalisées en région Rhône-Alpes et les échantillons d'émail de dents de sagesse, formé entre 7 et 15 ans, ont été prélevés chez des individus ayant vécu à ces âges dans la deuxième moitié du XXème siècle, en France à l'exception d'un individu, ayant grandi en Belgique (Tacail *et al.* 2017b). Malgré le peu de données d'os actuel, l'approche interindividuelle semble confirmer les observations précédentes sur la proximité entre compositions isotopiques du sang et de l'os. En ne considérant que l'os, le sang semble légèrement enrichi en isotopes lourds, bien que cette différence ne soit pas significative. En considérant également l'émail des dents de sagesse, que l'on assimile ici à l'os, le sang ne semble pas significativement être enrichi en isotopes

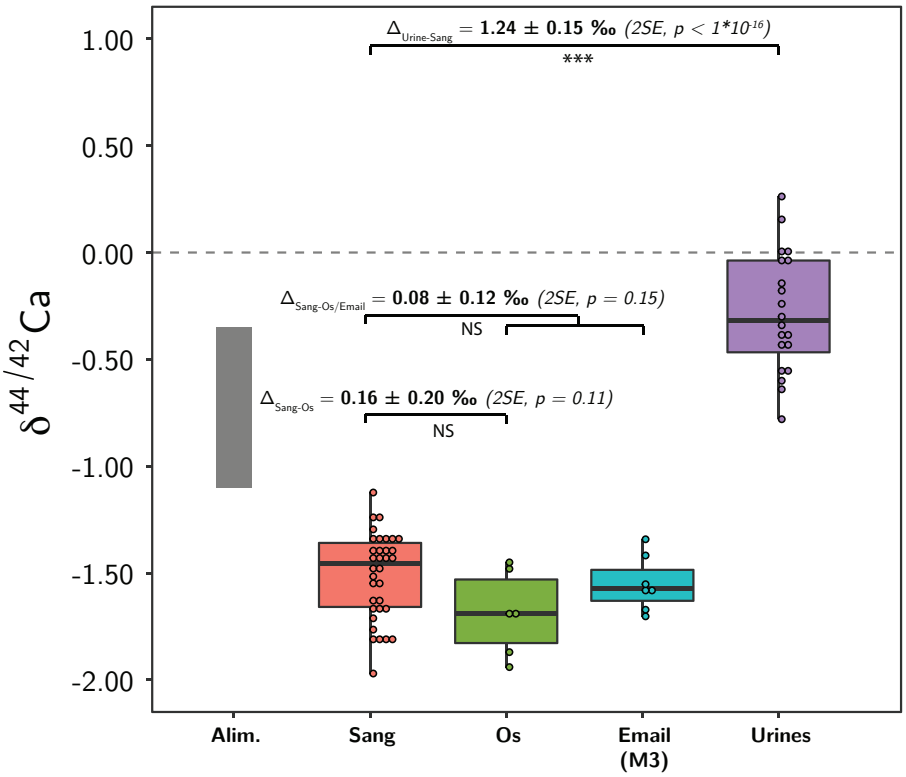

FIGURE 9.7 – **Valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) du sang, des os, des urines (cette étude) et de l'émail de troisièmes molaires (Tacail *et al.* 2017b) d'individus Français.** Les différences moyennes entre les groupes sont données avec les 2SE et valeurs *p* calculées selon le test t de Student avec variances inégales (test t de Welch). La distribution à 50 % des compositions de l'alimentation moyenne (entre les quantiles 25 et 75 %, Chapitre 7) est donnée en grisé pour des proportions de Ca provenant des produits laitiers variant entre 40 et 75 % des apports. **$\delta^{44/42}Ca$ values (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) of blood, bone, urines (This study) and third molars enamel (Tacail *et al.* 2017b) of French individuals.** The average differences between groups are given with 2SE and *p*-values calculated using the Student t-test for inequal variances (Welch's t-test). The central 50 % distribution of average alimentation compositions (between 25 and 75 % percentiles, Chapter 7) are given as grey bar for dairy products Ca intake varying between 40 and 75 % of total intake.

lourds.

3 Limitations et explorations futures

Il est probable que certains paramètres non pris en compte ici bruitent ces observations, et nécessiteront à l'avenir des explorations dédiées. Ainsi, les points suivants pourraient être soulevés.

1. De la même manière que les urines, les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sanguin varient probablement au cours de la journée. Cependant la variété des conditions de prélèvement (*e.g.* à jeun ou nourri) permet probablement d'intégrer partiellement cette variabilité dans les observations réalisées ici.
2. La composition isotopique de l'os pourrait être variable selon l'os, qu'il soit par exemple cortical ou trabéculaire. Ceci pourrait être hérité d'un changement de régime alimentaire drastique enregistré

précocément par les os à remodelage intense. Les transitions nutritionnelles précoces, qui impliquent des changements de compositions isotopiques des sources de Ca, participent probablement à ce type de phénomènes chez le nouveau-né (Tacail *et al.* 2017b). Cependant, la croissance et le remodelage osseux homogénéisent la composition isotopique globale du squelette. Cette variabilité intraindividuelle a été estimée par plusieurs études chez plusieurs espèces dont le cerf élaphe et l'humain mais n'a pas mis en évidence de variations supérieures à l'incertitude de mesure par MC-ICP-MS, c'est-à-dire 0.10 à 0.13 ‰ pour les rapports $^{44}Ca/^{42}Ca$ (Chu *et al.* 2006, Reynard *et al.* 2010, Heuser *et al.* 2011).

3. Des paramètres démographiques, tels que l'âge, l'indice de masse corporelle ou le sexe pourraient influencer les compositions isotopiques du sang et devront être explorés à grande échelle.

En somme, l'ensemble de ces observations, intra- et interindividuelles, chez l'animal et l'humain, me permet de conclure que la composition isotopique moyenne du Ca sanguin n'est probablement pas identique à celle de l'alimentation, contrairement à l'hypothèse prévalant jusqu'ici. Autrement dit, la composition du Ca à partir duquel la phase minérale de l'os est formée n'est pas de composition isotopique enrichie de plus de +0.46 ‰ par rapport à l'os, et donc pas non plus de +0.65 ‰, comme énoncé précédemment. Le fractionnement à la minéralisation n'est donc pas d'une amplitude de -0.65 ‰ mais il provoque une variation des rapports $^{44}Ca/^{42}Ca$ plus limitée, comprise entre -0.30 ‰ et 0 ‰, c'est-à-dire aucun fractionnement à la minéralisation.

D Tissus mous, absorptions et excrétions

Les organes et tissus non-minéralisés comportent environ 10 g de Ca chez l'adulte. Les concentrations en Ca^{2+} libre cytosolique sont 1000 à 10 000 fois inférieures à celles du liquide extracellulaire mais d'autres réservoirs de Ca^{2+} intracellulaire sont impliqués dans la régulation de ses flux (protéines liant le Ca^{2+} et organites, voir Chapitre 1).

1 Tissus mous

Les muscles concentrent une grande partie du Ca^{2+} dans les réticulums sarcoplasmiques, qui jouent le rôle de réservoirs dynamiques impliqués dans le relargage du Ca^{2+} déclenchant la contraction musculaire.

Les compositions isotopiques de muscles de mammifères ont été analysées conjointement au sang chez le cheval (Skulan et DePaolo 1999) et le mouton (Tacail *et al.* 2014). Chez ces deux espèces, le muscle présente une composition isotopique variable, mais tend à être enrichi en isotopes lourds relativement au Ca sanguin et à l'os (Figure 1.14 du Chapitre 1 et Figure 3 de Tacail *et al.* (2014), Chapitre 3). Les autres tissus mous analysés chez le mouton (foie et rein) présentent également des compositions variables et globalement enrichies en isotopes lourds relativement au sang (Figure 3 de Tacail *et al.* (2014), Chapitre

3).

Ces observations me permettront de discuter ensuite des mécanismes de fractionnement biologique mais sont encore limitées à quelques individus et quelques organes.

Cependant, les tissus mous non-excréteurs, c'est-à-dire n'impliquant pas de flux de Ca^{2+} exocrine, sortant de l'organisme (sécrétions digestives, excrétions urinaires ou sueur et desquamation), présentent chez l'adulte des échanges équilibrés avec le sang. Autrement dit, le flux de Ca^{2+} entrant depuis le sang vers les tissus mous non-excréteurs devrait être compensé par le flux de Ca^{2+} retournant vers le sang, en considérant des organes n'accumulant pas de Ca sur le long terme. L'existence de fractionnements isotopiques au cours de l'un et/ou de l'autre de ces transports ne devrait donc pas influencer la composition isotopique moyenne du sang, des urines ou de l'os.

2 Calcium des matières fécales

Il est possible que l'absorption intestinale fractionne les isotopes du Ca mais son étude est particulièrement difficile. Les environnements chimiques du Ca du chyme sont variés et participent à sa biodisponibilité (Guéguen et Pointillart 2000). Il est probable que les compositions isotopiques du Ca varient selon ces environnements chimiques (*e.g.* Moynier et Fujii 2017). Ainsi, l'absorption du Ca le plus disponible pourrait induire un fractionnement apparent entre le Ca du chyme total et le sang, sans pour autant démontrer un fractionnement au cours du transport à travers l'épithélium intestinal.

Deux caractéristiques s'opposent par ailleurs à l'étude d'un tel fractionnement localisé à l'absorption.

1. D'abord, le constat que l'alimentation et le sang ne présentent pas la même composition isotopique n'est pas une preuve de l'existence d'un fractionnement à l'absorption. En effet, la composition isotopique du sang résulte d'échanges élémentaires et de fractionnements isotopiques avec d'autres réservoirs. Il serait donc nécessaire d'accéder exclusivement à la composition isotopique du Ca^{2+} absorbé, pénétrant les capillaires sanguins irriguant l'épithélium intestinal. Ceci nécessiterait une étude expérimentale dédiée, telle que la culture in vitro d'épithéliums intestinaux.
2. Ensuite, le Ca résiduel n'ayant pas été absorbé pourrait présenter une composition isotopique distincte de celle du Ca initial du chyme dans le cas où l'absorption discriminerait les isotopes. Cependant, la grande proportion de Ca du chyme non-absorbé (estimée par exemple à 70 % en moyenne chez l'humain adulte, voir Chapitre 1) tamponnerait les effets d'un fractionnement à l'absorption intestinale, et en cacherait ces effets. De plus, la présence de Ca endogène, issu des sécrétions digestives, pourrait également participer à la modification de la composition du Ca des matières fécales.

La composition isotopique des fèces des moutons ne se distingue pas de celles de l'alimentation (Tacail *et al.* 2014). De la même manière, les compositions isotopiques des matières fécales des cochons nains

de Göttingen témoins ne se distinguent pas de celles de l'alimentation (Heuser 2016). Il est donc difficile de discuter de l'existence de fractionnements à l'absorption intestinale avec les données disponibles actuellement.

Les tissus mous aux fonctions exocrines, impliqués dans des flux d'excrétion du Ca vers le milieu extérieur, pourraient affecter la composition du reste de l'organisme. Les sécrétions digestives représentent des flux de Ca^{2+} de l'ordre de 120 à 200 mg.j^{-1} vers la lumière du tube digestif de l'humain adulte (Heaney et Abrams 2004) et pourraient être associées à des fractionnements isotopiques ayant pour résultat l'excrétion préférentielle d'isotopes légers ou lourds.

L'étude en comparaison avec le Ca sanguin des compositions isotopique de ce Ca endogène sécrété dans le tube digestif n'est cependant pas aisée. La comparaison de la composition isotopique des fèces avec celle de l'alimentation et du sang ne permet pas de conclure car le Ca non-absorbé représente une grande proportion du Ca des fèces et tamponne la composition isotopique du Ca endogène, comme suggéré précédemment.

Heuser *et al.* (2016a) présentent une étude de la composition isotopique des tissus de cochons nains de Göttingen et comparent un groupe carencé en Ca et vitamine D à un groupe témoin. Les auteurs montrent que la composition isotopique des fèces diminue significativement chez ce groupe, avec une différence moyenne de -0.33 ‰ en comparaison avec les compositions des fèces du groupe témoin. Il serait possible d'expliquer cette différence par une absorption préférentielle des isotopes lourds à travers l'épithélium intestinal, qui provoquerait un appauvrissement en isotopes lourds du peu de Ca non-absorbé. Cependant, la mise en évidence de pertes conséquentes de Ca endogène dans ces fèces (plus de 1.6 fois la quantité de Ca ingéré) suggère plutôt que les sécrétions digestives sont caractérisées par des compositions isotopiques appauvries en isotopes lourds de l'ordre de -0.30 ‰ relativement au sang (Heuser *et al.* 2016a).

Les compositions isotopiques particulièrement enrichies en isotopes lourds de deux des trois foies de moutons analysés (Tacail *et al.* 2014) pourraient suggérer que la fonction exocrine des hépatocytes sécrétant la bile implique l'excrétion préférentielle d'isotopes légers du Ca et la rétention dans ces tissus d'isotopes lourds résiduels.

De telles observations suggèrent que les sécrétions digestives seraient appauvries en isotopes lourds relativement au sang mais nécessitent des recherches plus approfondies dédiées à cette question.

IV Mécanismes des fractionnements des isotopes du Ca

Le fractionnement isotopique le mieux décrit est le fractionnement rénal. Il a été à la source du développement d'une hypothèse de fractionnement lors du transport transépithélial du Ca^{2+} depuis la lumière du néphron jusqu'au sang (Heuser et Eisenhauer 2010, Heuser *et al.* 2016a, Heuser 2016). Par ailleurs, le fractionnement à la minéralisation de l'os n'a pour l'instant pas été expliqué et peu d'hypothèses ont

été formulées jusqu'à aujourd'hui. Je m'attacherai donc ici à faire le point sur les hypothèses prévalant à l'explication des fractionnements majeurs des isotopes du Ca à travers l'organisme et évoquerai les possibles mécanismes moléculaires sous-jacents.

A Fractionnement rénal des isotopes du Ca

L'excrétion rénale provoque depuis le sang vers les urines un enrichissement en isotopes lourds du Ca de +1.15 ‰ en moyenne chez l'humain (voir section précédente).

Heuser et Eisenhauer (2010) proposent que le fractionnement rénal est provoqué par une distillation de Rayleigh. Dans le néphron, le Ca des urines primaires filtré en grande quantité à travers le glomérule est progressivement réabsorbé le long du néphron vers le sang, jusqu'à la réabsorption fractionnelle de 98 % en moyenne des 10 g.j^{-1} de Ca^{2+} filtrés par le glomérule (Figure 1.8 du Chapitre 1). Dans le cas où cette réabsorption induirait un fractionnement isotopique de la lumière du néphron vers le Ca sanguin, le produit de la réaction, c'est-à-dire le Ca^{2+} absorbé, serait isolé du réactif, dont la quantité décroît au cours de la réabsorption fractionnelle jusqu'à l'excrétion du Ca des urines secondaires. Cette hypothèse est initialement en partie fondée sur le fait que les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ d'urines d'un individu augmentaient pour des calciuries décroissantes.

En faisant l'hypothèse d'une distillation de Rayleigh au cours de la réabsorption fractionnelle du Ca dans le néphron (Heuser et Eisenhauer 2010, Heuser 2016, Heuser *et al.* 2016a), il est possible de décrire la réaction comme suit :

$$\left({}^{44}Ca/{}^{42}Ca\right)_{Ur.\,résid.} = \left({}^{44}Ca/{}^{42}Ca\right)_{Ur.\,prim.} f^{\alpha_{s.u.}-1} \tag{9.1}$$

où :

— $({}^{44}Ca/{}^{42}Ca)_{Ur.\,résid.}$ est le rapport des abondances isotopiques du Ca des urines résiduelles, c'est-à-dire non réabsorbé.

— $({}^{44}Ca/{}^{42}Ca)_{Ur.\,prim.}$ est le rapport des abondances isotopiques du Ca des urines primaires, c'est-à-dire du Ca filtré par le glomérule.

— f est la fraction massique de Ca résiduel, c'est-à-dire encore non-absorbé ($f = \frac{m^{Ca}_{Ur.\,résid.}}{m^{Ca}_{Ur.\,prim.}}$)

— $\alpha_{s.u.}$ est le coefficient de fractionnement de la réaction de réabsorption depuis les urines jusqu'au sang, c'est-à-dire $\frac{({}^{44}Ca/{}^{42}Ca)_{Sang}}{({}^{44}Ca/{}^{42}Ca)_{Ur.}}$

Cette équation permet de prédire l'ordre de grandeur du coefficient de fractionnement $\alpha_{s.u.}$ pour une fraction donnée de Ca résiduel et une augmentation de $\delta^{44/42}Ca$ de +1.15 ‰ du sang vers les urines excrétées. Ainsi, en réarrangeant l'équation 9.1 et par définition de $\delta^{44/42}Ca$, on obtient :

$$\alpha_{s.u.} = \left(\ln(\frac{\delta^{44/42}Ca_{Ur.\,résid} + 1000}{\delta^{44/42}Ca_{Ur.\,prim.} + 1000}) \div \ln(f) \right) + 1 \tag{9.2}$$

La réabsorption fractionnelle du Ca^{2+} représente en moyenne 98 % à 98.5 % chez l'humain (*e.g.* Hoenderop 2005). Cette valeur correspond à une fraction de Ca résiduel de 0.015 à 0.02 (1.5 à 2 %). En supposant que la filtration glomérulaire du Ca du sang n'induit pas de fractionnement isotopique, $\delta^{44/42}Ca_{Ur.\,prim.}$ peut être assimilé à $\delta^{44/42}Ca_{Sang}$ tandis que la valeur de $\delta^{44/42}Ca_{Ur.\,résid}$ est supérieure de +1.15 ‰ par rapport à $\delta^{44/42}Ca_{Ur.\,prim.}$ pour des urines de 24 h.

Le calcul de $\alpha_{s.u.}$ prédit une valeur de 0.99971 pour une fraction résiduelle de 2 % et de 0.99973 pour une fraction résiduelle de 1.5 %. Ceci correspondrait à des amplitudes de fractionnements isotopiques de -0.27 à -0.30 ‰ au cours du transport à travers l'épithélium rénal.

L'équation 9.2 permet également de représenter les variations de $\Delta_{Urine-Sang}$ en fonction de la quantité de Ca urinaire excrété (mg) pour plusieurs valeurs de $\alpha_{s.u.}$ (Figure 9.8.A.). La distillation de Rayleigh prédit une augmentation importante des valeurs de $\Delta_{Urine-Sang}$ pour des valeurs élevées de réabsorption fractionnelle, c'est-à-dire pour de faibles fractions de Ca résiduel.

Il est possible de linéariser la relation entre $\Delta_{Urine-Sang}$ et Ca_{excr}. L'équation 9.1 donne :

$$\frac{(^{44}Ca/^{42}Ca)_{Ur.\,résid.}}{(^{44}Ca/^{42}Ca)_{Ur.\,prim.}} = f^{\alpha_{s.u.}-1} \tag{9.3}$$

Pour de faibles fractionnements (inférieurs à 10 ‰ en valeur absolue), il est possible de faire l'approximation suivante (*e.g.* Wombacher *et al.* 2016) :

$$1000 \ln \frac{(^{44}Ca/^{42}Ca)_{A.}}{(^{44}Ca/^{42}Ca)_{B.}} \simeq \delta^{44/42}Ca_{A.} - \delta^{44/42}Ca_{B.} \tag{9.4}$$

Ceci permet d'écrire :

$$\exp(\frac{\delta^{44/42}Ca_{Ur.\,résid.} - \delta^{44/42}Ca_{Ur.\,prim.}}{1000}) \simeq f^{\alpha_{s.u.}-1} \tag{9.5}$$

Ainsi, il est possible d'écrire la relation affine entre $\Delta_{Urine-Sang}$ et $\ln(Ca_{excr})$:

$$\Delta_{Urine-Sang} = \delta^{44/42}Ca_{Ur.\,résid.} - \delta^{44/42}Ca_{Ur.\,prim.} = 1000(\alpha_{s.u.}-1) \times \ln(Ca_{excr}) - 1000(\alpha_{s.u.}-1)\ln(Ca_{glom.}) \tag{9.6}$$

où la pente de la droite est donnée par la valeur de $1000(\alpha_{s.u.} - 1)$ pour des valeurs constantes de Ca filtré par le glomérule ($Ca_{glom.}$). Par ailleurs, la valeur du coefficient directeur de cette droite approche l'amplitude en ‰ du fractionnement associé au transport du Ca à travers l'épithélium.

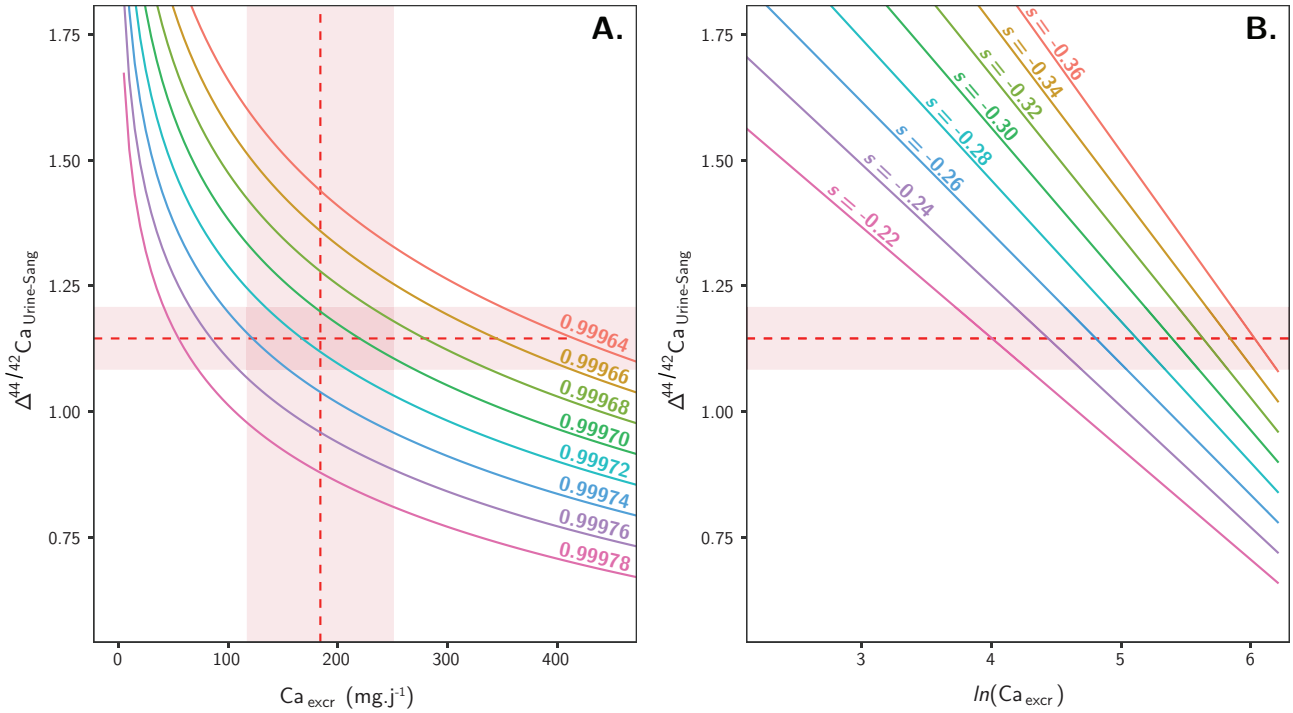

FIGURE 9.8 – **Amplitudes de $\Delta_{Urine-Sang}$ en fonction de (A.) la quantité de Ca excrété en 24 h (Ca$_{excr}$) et (B.) le logarithme népérien de Ca$_{excr}$ calculées selon un modèle de distillation de Rayleigh pour des valeurs variables de $\alpha_{s.u.}$** et en considérant une quantité de Ca filtré par le glomérule constante de 10 g.j^{-1}. La valeur moyenne de $\Delta_{Urine-Sang}$ mesurée (+1.15±0.06 ‰, 2SE) est indiquée sur les deux graphiques par les droites horizontales en pointillés rouges. Les nombres associés à chaque courbe du graphique **A.** sont les valeurs de $\alpha_{s.u.}$ utilisées pour leur tracé. Les nombres *s* indiqués pour chaque droite du graphique **B.** sont les pentes des droites locales. Le code couleur des calculs est identique pour les deux graphiques. La quantité moyenne de Ca urinaire de 24 h est indiquée par la droite verticale en pointillés rouges du graph A. et l'aire rouge couvre la variabilité décrite chez l'adulte (Taylor et Curhan 2009, Rathod *et al.* 2015).

Amplitudes of $\Delta_{Urine-Blood}$ values as a function of (A.) amount of 24 h urinary Ca (Ca$_{excr}$) and (B.) natural logarithm of Ca$_{excr}$ calculated using the Rayleigh distillation model for varying $\alpha_{s.u.}$, as indicated next to each curve on graph **A.** We consider a constant filtrated Ca amount by glomerulus of 10 g.j^{-1}. The average measured $\Delta_{Urine-Blood}$ value (+1.15±0.06 ‰, 2SE) is indicated on both graphs by the horizontal red dashed lines. Numbers next to each curve of graph **B.** are local line slopes. The colors of the curves refer to the same calculations on both graphs. The average 24 h urinary calcium in human is given by the vertical red dashed line on graph A. and the shaded area covers the typical variability observed in adults (Taylor et Curhan 2009, Rathod *et al.* 2015).

En conclusion, l'hypothèse d'une distillation de Rayleigh prédit un fractionnement au cours du transfert du Ca à travers l'épithélium de l'ordre de -0.30 ‰ ($\alpha_{s.u.} \simeq 0.9997$). Des variations des quantités de Ca urinaire excrété pour des filtrations glomérulaires constantes devraient se traduire par une relation linéaire entre les valeurs de $\Delta_{Urine-Sang}$ mesurées et $\ln(Ca_{excr})$ avec une pente de l'ordre de -0.30.

Aucun jeu de données de **cohortes** de $\Delta_{Urine-Sang}$ n'est disponible aujourd'hui pour l'humain. Cependant, les compositions isotopiques du Ca des urines de 24 h de l'expérience d'alitement décrite par Morgan

et al. (2012a) ont été représentées graphiquement en fonction des quantités de Ca excrété (Morgan *et al.* 2012a, et suppléments). La représentation graphique de ces compositions isotopiques des urines de 24 h en fonction de $\ln(Ca_{excr})$ est donnée en Figure 9.9.

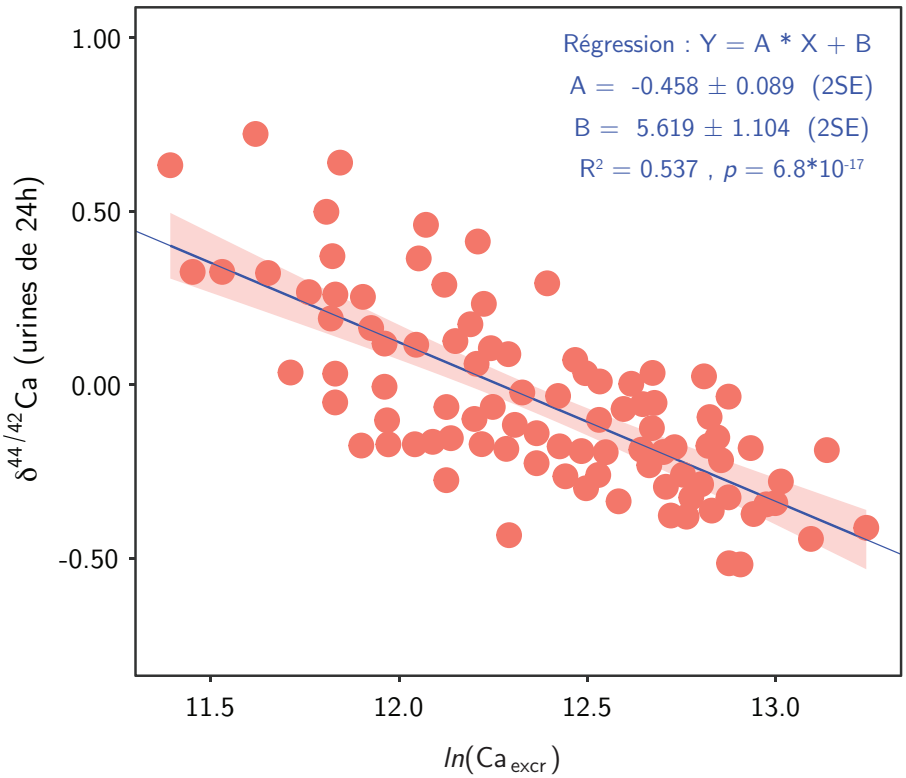

FIGURE 9.9 – **Valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des urines de 24 h des patients soumis à l'expérience d'alitement de 30 j décrite par Morgan *et al.* (2012a), en fonction du logarithme népérien du Ca urinaire des 24 h (mg).** La régression linéaire indique une corrélation significative (valeur p $< 10^{-16}$) et une pente comprise entre -0.37 et -0.55 ‰.
$\delta^{44/42}Ca$ values of 24 h urines of patients from 30 days bedrest experiment described by Morgan *et al.* (2012a), as a function of the natural logarithm of 24 h urinary Ca (mg). The linear regression indicates a significant correlation (p-value $< 10^{-16}$) and a slope ranging between -0.37 and -0.55 ‰.

On constate que les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des urines de 24 h de la cohorte soumise à une expérience d'alitement de 30 j sont significativement corrélées avec les valeurs de $\ln(Ca_{excr})$. Si cette relation est interprétée comme étant le produit d'une distillation de Rayleigh, la pente de la droite prédit une amplitude de fractionnement au transport transépithélial de -0.37 à -0.55 ‰. Cette gamme de valeur n'inclut pas la prédiction de -0.30 ‰ mais s'en approche et semble prédire un fractionnement du même ordre de grandeur. Cette relation est compatible avec une distillation de Rayleigh au cours de la réabsorption fractionnelle du Ca dans le néphron.

Cependant le jeu de données n'est pas parfait car il ne s'agit pas de valeurs de $\Delta_{Urine-Sang}$ et la lecture faite ici suppose une composition isotopique constante du sang. Or les compositions isotopiques du sang semblent avoir évolué conjointement à celle des urines (Channon *et al.* 2015) ce qui pourrait biaiser

l'estimation de l'amplitude d'un fractionnement transépithélial. Par ailleurs, ces données regroupent les urines de 12 individus, de physiologies probablement variées ou changeantes. L'approche présentée ici ne prend pas en compte les variations inter- et intraindividuelles probables des quantités de Ca filtré par le glomérule, ce qui biaise également l'estimation de la pente.

Il sera donc nécessaire de vérifier ces observations en réalisant des études de cohortes saines, sans perte osseuse induite et pour lesquelles les compositions isotopiques du sang seront également suivies, de même que les quantités de Ca filtré par le glomérule, par le calcul du taux de filtration glomérulaire grâce à la mesure de la créatinine des 24 h par exemple.

L'hypothèse d'une distillation de Rayleigh est née de celle d'un fractionnement isotopique induit par le passage du Ca à travers l'épithélium, par voie para- ou transcellulaire (Heuser et Eisenhauer 2010, Heuser 2016, Heuser *et al.* 2016a). Ainsi, les isotopes légers du Ca seraient préférentiellement transportés par certaines protéines participant à son transfert, comme les claudines des jonctions serrées (*e.g.* Bleich *et al.* 2012) et les protéines transmembranaires comme les canaux (de type TRPV dans le rein), les échangeurs Na^+/Ca^{2+} ou les pompes ATP-asiques (*e.g.* Brini *et al.* 2013).

Cependant, d'autres hypothèses peuvent être avancées. La présence dans les urines d'espèces complexant le Ca comme le citrate pourrait participer à la rétention préférentielle des isotopes lourds dans les urines car les calculs *ab initio* prédisent que les fractionnements therdomynamiques des isotopes du Ca entre le Ca^{2+} libre (hydraté) et le Ca^{2+} complexé au citrate induiraient une différence de $+0.50$ à $+1.80$ ‰ selon la coordination du Ca^{2+} libre (Moynier et Fujii 2017). Ce mécanisme pourrait d'ailleurs induire des fractionnements entre urine et sang d'amplitudes variables selon les quantités excrétées et peut-être expliquer la relation entre $\Delta_{Urine-Sang}$ et Ca_{excr} décrite ci-dessus. Ces espèces chimiques pouvant expliquer la rétention des isotopes lourds du Ca sont multiples, incluant notamment les carbonates, les oxalates ou les phosphates (Moynier et Fujii 2017).

B Autres transports transépithéliaux

Les échanges de Ca^{2+} avec le milieu extérieur, principalement l'absorption et les différents modes d'excrétions, se font à travers des épithéliums partageant des caractéristiques communes. Les épithéliums rénaux et intestinaux présentent des structures et des modes de transports du Ca similaires (Chapitre 1). Ces transports impliquent des transports par voies paracellulaires et transcellulaires. L'étude de transferts transépithéliaux autres que la réabsorption rénale permettrait de faire avancer la discussion des hypothèses de fractionnements isotopiques au cours des transports à travers les épithéliums.

1 Sécrétion du lait par les glandes mammaires

Le transport du Ca depuis le sang vers le lait des mammifères est un processus actif, impliquant l'entrée massive de Ca^{2+} dans le cytosol selon son gradient électrochimique par des canaux protéiques transmembranaires, où il serait activement concentré dans des organites (réticulum et appareil de Golgi) et des vésicules par des pompes ATP-asiques (de type SERCA ou SPCA) (Cross *et al.* 2014). Le Ca^{2+} est ensuite excrété dans la lumière de la glande mammaire par exocytose des vésicules et par des pompes transmembranaires ATP-asiques (de type PMCA) localisées sur la membrane luminale. Entre le liquide extracellulaire et le lait, la concentration en Ca^{2+} est multipliée par un facteur variant entre 5 et 40 selon les espèces (Cross *et al.* 2014). Le transport implique donc les mêmes types de voies transcellulaires et de protéines que dans l'épithélium intestinal et le néphron du rein. Le Ca du lait (10 mM au total soit de l'ordre de 400 mg.L^{-1} chez l'humain) est majoritairement complexé à des protéines (caséine, α-lactalbumine) et des anions comme les bicarbonates, les citrates et les phosphates. Le Ca^{2+} libre représente environ 3 mM (Cross *et al.* 2014).

Les compositions isotopiques du lait des mammifères ont été décrites comme appauvries en isotopes lourds de l'ordre de -0.60 ‰ relativement à l'alimentation chez le cerf élaphe, la vache, la chèvre et l'humain (Chu *et al.* 2006). L'hypothèse fondée sur cette observation, et prévalant depuis, est que le transport du Ca^{2+} dans les glandes mammaires et vers le lait serait associé à un fractionnement isotopique favorisant l'excrétion des isotopes légers du Ca^{2+} (Chu *et al.* 2006, Reynard *et al.* 2010, Heuser 2016). Cependant, aucune valeur de composition isotopique du lait n'a été comparée à celle du sang de la mère allaitante prélevé au même moment.

Ces travaux ont été l'occasion de comparer la composition isotopique d'un échantillon de sang (plasma) d'une femme allaitante (Tableau I.2 en Annexe I) avec les compositions de quatre échantillons de lait prélevés à 1 mois d'intervalle pendant 4 mois. Les résultats montrent que la valeur du $\delta^{44/42}Ca$ du lait reste relativement constante et particulièrement négative au cours de l'allaitement, avec une moyenne de -1.60 $\pm$ 0.08 ‰ (2SE, test t de Student, n $=$ 4), en très bon accord avec la moyenne des compositions isotopiques du lait maternel humain préalablement publiées de -1.67 $\pm$ 0.23 ‰ (2SE, test t de Student, n $=$ 5) (Chu *et al.* 2006, Tacail *et al.* 2017b). L'échantillon de sang, prélevé au cours de l'allaitement, présente une valeur de $\delta^{44/42}Ca$ de -1.24 $\pm$ 0.13 ‰. Malgré l'unique échantillon de sang, il semblerait que le lait de cet individu soit appauvri en isotopes lourds relativement au sang, avec une différence calculée de -0.36 ‰. Cette amplitude du fractionnement entre le Ca sanguin et le Ca du lait est proche de celle calculée pour la réabsorption rénale sur l'hypothèse d'une distillation de Rayleigh, de -0.30 ‰.

Bien qu'il soit nécessaire de valider cette observation en réalisant une exploration plus systématique chez la femme allaitante, il est donc possible que la sécrétion de lait soit associée à un fractionnement isotopique du Ca lors de son transfert depuis le sang jusqu'au lait.

2 Salive et sécrétions digestives

Les pertes de Ca endogène dans le tube digestif représentent des flux importants de Ca vers la lumière intestinale, comparable chez l'adulte à la perte urinaire moyenne (de l'ordre 120 à 200 mg.j^{-1} d'après Heaney et Abrams (2004)). Elles regroupent la perte de muqueuses et la sécrétion de salive par les glandes salivaires, de bile par le foie et de suc pancréatique.

La salive est sécrétée par les glandes parotides, sublinguales et submandibulaires. Sa sécrétion implique des cellules épithéliales organisées en acini. La salive est collectée par des conduits ramifiés vers la bouche. Deux grands types de salive sont sécrétés, avec et sans mucine, une protéine constituant le principal composant du mucus (Proctor 2016). La salive contient des protéines, de l'eau et des électrolytes comme des carbonates, du sodium, du chlore ou du calcium. La sécrétion de Ca^{2+} est active et principalement réalisée par les cellules épithéliales des acini par voie transcellulaire (Homann *et al.* 2006, Proctor 2016). L'entrée est réalisée par le transport transmembranaire facilité par des canaux de la membrane basolatérale. Le transport intracellulaire implique des calbindines, la concentration du Ca dans le réticulum endoplasmique par le biais de pompes ATP-asiques (de type SERCA) (Homann *et al.* 2006) ou encore dans des granules de protéines, probablement par pompage actif également (Proctor 2016). Enfin, la sécrétion du Ca^{2+} vers la lumière de l'acinus est réalisée par l'exocytose des granules (Proctor 2016) ou le pompage actif du Ca par des ATP-ases de type PMCA (Homann *et al.* 2006).

Les conduits modulent les concentrations en électrolytes, notamment en Na^+ et Cl^- par leur réabsorption régulée. Cependant la concentration en Ca^{2+} est relativement constante à la sécrétion dans les acini et à la sortie des conduits, ce qui suggère une réabsorption limitée voire nulle du Ca^{2+} dans ces conduits glandulaires. Par ailleurs, selon le type de stimulation, la salive sécrétée peut présenter des types et des compositions variés mais le Ca^{2+} total présente des concentrations de l'ordre de 2 mM relativement constantes dans la salive totale de la bouche (Proctor 2016).

En somme, le transport transépithélial du Ca dans les glandes salivaires est actif et implique des voies similaires à celles des voies transcellulaires du néphron, des glandes mammaires et de l'intestin.

Afin de tester l'hypothèse d'un fractionnement induit par le transport transépithélial du Ca^{2+}, la composition isotopique du sang et de la salive de quatre individus adultes et sains a été analysée (Tableau I.2 en Annexe I) conjointement à celle de la salive. La salive a été récoltée après un temps de plus d'une heure sans consommation de nourriture et de boissons. L'échantillonnage de plus de 2 ml de salive dans des béchers en Téflon (Savillex) a été précédé de l'expectoration de salive répétée 4 fois pour le rinçage de la bouche. Les concentrations en Ca^{2+} mesurées dans les salives sont proches des valeurs de la littérature (2 mM soit 80 mg.L^{-1}) avec une moyenne de 76 $\pm$ 18 mg.L^{-1} (2SE, test t de Student, n = 4).

Les compositions isotopiques des échantillons couplés de sang et de salive sont présentées en Figure 9.10. On constate que les compositions isotopiques du Ca de la salive sont systématiquement appauvries

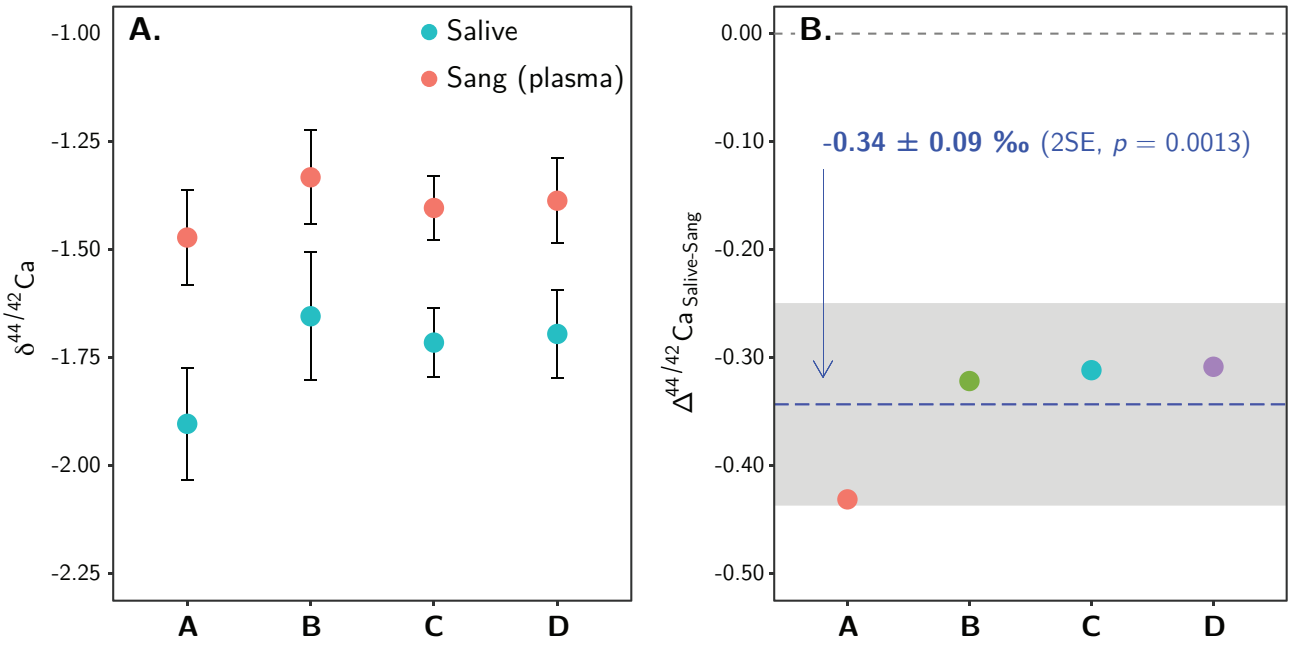

FIGURE 9.10 – **Valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) de sangs (plasma) et de salives prélevés conjointement chez 4 individus (A.) et amplitudes des différences entre la salive et le sang ($\Delta_{Salive-Sang}$) pour chaque individu (B.).** La moyenne, le 2SE et la valeur *p* ont été calculés par le test t de Student.
$\delta^{44/42}Ca$ **values (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) of blood (plasma) and saliva samples collected at the same time from 4 individuals (A.) and amplitudes of the differences between saliva and blood ($\Delta_{Saliva-Blood}$) for each individual (B.).** The average, 2SE and *p*-value were calculated using Student's t-test.

en isotopes lourds relativement à celle du plasma, avec une moyenne de -0.34 ± 0.09 ‰ (2SE, test t de Student). Ceci suggère qu'un fractionnement isotopique accompagne le transfert du Ca depuis le sang vers la salive, avec un ordre de grandeur comparable à celui calculé pour la réabsorption du Ca des urines et à celui suggéré par les compositions isotopiques du lait.

Les autres sources de Ca endogène impliquent également des sécrétions transépithéliales par les hépatocytes pour la sécrétion de la bile, également structurés en acini, et les cellules acineuses pancréatiques, participant à la sécrétion des sucs pancréatiques. Le Ca de ces sécrétions provient également probablement d'une voie transcellulaire comparable à celle des glandes salivaires (*e.g.* Ceccarelli *et al.* 1975, Rege 2002). Si les transports transépithéliaux sont donc effectivement responsables de fractionnements de l'ordre de -0.30 ‰ lors du transport du Ca, il est possible que le reste des sécrétions digestives présente des compositions isotopiques appauvries relativement au sang, avec une différence du même ordre de grandeur. Les résultats de Heuser *et al.* (2016a) suggérant des compositions du Ca endogène appauvri relativement au sang de l'ordre de -0.30 ‰ chez le cochon nain vont également dans ce sens (voir précédemment et Heuser *et al.* 2016a).

En somme, l'observation de différences de compositions isotopiques du Ca de part et d'autre des épithéliums rénaux, salivaires et mammaires renforce l'hypothèse que le Ca est fractionné au cours de son transport à travers les épithéliums, avec une amplitude de l'ordre de -0.30 ‰.

C Fractionnement à la minéralisation osseuse

Depuis les premières études (Skulan et DePaolo 1999), il est supposé que la résorption osseuse médiée par l'action ostéolytique des ostéoclastes ne modifie pas les compositions isotopiques du Ca de l'os. Cette hypothèse est plausible dans le sens où le processus de résorption implique une réaction relativement totale de dissolution acide de la portion d'os concernée. Bien qu'il soit possible que des fractionnements opèrent au cours d'une telle réaction, leur effet serait limité voire annulé dans le cas d'une dissolution totale de la phase minérale.

L'hypothèse d'un fractionnement entre le Ca sanguin et le Ca osseux au cours de la minéralisation, médiée par les ostéoblastes et de l'ordre de -0.75 ‰, est remise en question par les observations présentées dans ce chapitre. Ce fractionnement est plus probablement responsable d'une différence comprise entre -0.30 ‰ et 0 ‰, c'est-à-dire qu'il n'y aurait pas de fractionnement à la minéralisation.

Les calculs *ab initio* prédisent que les phosphates, précurseurs et constituants de la matrice minérale, devraient concentrer les isotopes lourds, dans le cas de réactions à l'équilibre thermodynamique. Ainsi, la réaction de minéralisation depuis un Ca^{2+} hydraté vers un complexe $CaPO_4$ devrait être accompagnée d'une variation de $\delta^{44/42}Ca$ de $+0.24$ à $+1.7$ ‰ (Moynier et Fujii 2017). Il est donc clair que ce mécanisme ne prédomine pas pour l'os, dont les compositions sont au contraire parmi les plus appauvries en isotopes lourds dans l'organisme.

Les mécanismes de transport du Ca^{2+} depuis le sang jusqu'à l'ostéoblaste puis l'ostéoïde impliquent des voies transcellulaires et la concentration de Ca^{2+} et de phosphate dans les mitochondries, des vésicules intracellulaires mais également extracellulaires (Clarke 2008, Boonrungsiman 2012).

Ces mécanismes actifs de concentration du Ca pourraient participer à un transport préférentiel des isotopes du Ca, comme cela est suggéré par les fractionnements à travers les épithéliums. Il serait donc possible qu'un fractionnement d'une amplitude de -0.30 ‰ caractérise la minéralisation à la condition que le Ca^{2+} ainsi transporté réagisse totalement pour former la matrice minérale de l'os. Dans le cas où cette réaction est incomplète, il est également possible que des fractionnements opèrent au cours de la précipitation des phosphates et de la croissance des cristaux d'hydroxyapatite. Si ces réactions se réalisent partiellement à l'équilibre, il est alors possible que la matrice phosphatée tende à concentrer les isotopes lourds, et compense partiellement l'effet d'un appauvrissement en isotopes lourds provoqué par les transports cellulaires du Ca^{2+}.

Toutefois, ce système est particulièrement complexe et met en jeu un grand nombre de réactions dont

les effets isotopiques sont probablement combinés, voire contradictoires. La minéralisation n'implique pas d'épithélium formant une barrière entre deux compartiments et isolant les réactifs des produits de la réaction. Le système est relativement ouvert au Ca^{2+} du milieu extracellulaire, ce qui complexifie probablement l'identification de mécanismes simples. Il est donc difficile de conclure quant à un mécanisme précis.

D Fractionnements dans les tissus mous et Ca intracellulaire

Les compositions isotopiques enrichies en isotopes lourds des muscles et des globules rouges du mouton (Tacail *et al.* 2014) suggèrent l'absorption préférentielle des isotopes lourds ou l'extrusion préférentielle des isotopes légers. La corrélation entre les compositions isotopiques des tissus des moutons et l'inverse de la concentration en Ca^{2+} (Figure 4 du Chapitre 3) suggère un mécanisme de distillation, dans lequel le Ca^{2+} est perpétuellement extrudé activement par des pompes ATP-asiques et des échangeurs transmembranaires, permettant de contrer les entrées facilitées du Ca^{2+} par les canaux transmembranaires. Selon cette interprétation, l'extrusion active du Ca^{2+} intracellulaire serait accompagnée par un fractionnement favorisant le transport des isotopes légers.

Cette interprétation est compatible avec celle selon laquelle les transports transcellulaires impliquant le transfert actif du Ca vers un compartiment extracellulaire favorise les isotopes légers du Ca^{2+}. L'hypothèse a par ailleurs été proposée pour expliquer les compositions des carbonates des coccolithophoridés (Gussone *et al.* 2006), celles des coraux sclératiniens (Böhm *et al.* 2006) ou encore pour expliquer les fractionnements à l'absorption racinaire chez les végétaux (Moynier et Fujii 2017).

V Mécanismes moléculaires possibles

Les mécanismes responsables de tels fractionnements sont difficiles à identifier mais quelques pistes peuvent être évoquées.

Les arguments en faveur de fractionnements au cours des transports transépithéliaux, voire transmembranaires, font naître l'hypothèse que les transporteurs transmembranaires du Ca seraient à l'origine des fractionnements isotopiques observés.

La sélection des cations par les protéines qui leurs sont spécifiques est en partie déterminée par la sphère d'hydratation de ces cations, bien que ce domaine soit encore au cœur de recherches pour le Ca^{2+} (*e.g.* Saotome *et al.* 2016, Tang et Skibsted 2016). Or le Ca^{2+} présente en solution des sphères d'hydratation pouvant impliquer 6, 7 ou 8 molécules d'eau (Katz *et al.* 1996) et les calculs *ab initio* prédisent à 37°C (310K) des fractionnements isotopiques à l'équilibre de l'ordre de -0.42 ‰ lors du passage de 6 à 7 molécules d'eau et de -0.46 ‰ pour le passage de 7 à 8 molécules d'eau (Moynier et Fujii 2017). Ainsi, la sélection préférentielle de Ca^{2+} hydraté par 7 ou 8 molécules d'eau pourrait expliquer des transports préférentiels des isotopes légers du Ca à travers les membranes et les épithéliums.

Par ailleurs, les fonctions organiques des protéines liant le Ca^{2+} sont multiples et lient le Ca^{2+} avec des énergies variables, ce qui pourrait également participer au tri des isotopes selon les acides aminés impliqués.

Enfin, les énergies d'activation de rupture des liaisons sont généralement plus faibles pour les isotopes légers que pour les isotopes lourds. Les fractionnements cinétiques ou diffusifs pourraient donc également expliquer le transport favorisé des isotopes légers dans les configurations où les produits de ces réactions sont isolés des réactifs (Schauble 2004, Richter *et al.* 2009, Eiler *et al.* 2014, Watkins *et al.* 2017).

Cependant, il est possible d'avancer des hypothèses sur les spéciations du Ca^{2+} mobile. Selon les espèces chimiques et les conditions du milieu (concentration, pH, *etc.*), les complexes formés entre Ca^{2+} et certaines espèces anioniques pourraient trier les isotopes entre les formes complexées et les formes libres de Ca^{2+}. Si les deux formes sont séparées par un processus physiologique, comme le transport du Ca^{2+} libre vers un autre compartiment et donc sa séparation du milieu réactionnel, le transport sélectif des isotopes peut être expliqué. La grande variété des rigidités des liaisons parmi les différentes espèces peut donc expliquer les fractionnements isotopiques apparent aux frontières des compartiments tissulaires (épithéliums) ou cellulaires (membranes plasmiques, des vésicules ou des organites). Ainsi, comme énoncé précédemment, il est possible que les anions comme les citrates, les phosphates ou les oxalates participent de la sorte aux fractionnements isotopiques du Ca^{2+}.

Il est donc difficile en l'état de privilégier une hypothèse sans plus de recherches portant sur ces problématiques. Une meilleure connaissance de la chimie des urines ou du sang permettraient par exemple d'explorer ces hypothèses : le pH, qui influence la formation effective des complexes entre le Ca et les anions des urines ou du sang (*e.g.* les carbonates) pourrait influencer la distribution des isotopes du Ca ; de la même manière, l'exploration conjointe de la citraturie et des compositions isotopiques du Ca urinaire permettrait également de caractériser ou non l'implication des citrates dans le fractionnement rénal.

VI Bilan et modèle conceptuel

A Fractionnements isotopiques

L'ensemble de ces observations me permet de dresser un bilan des fractionnements isotopiques observés, probables et hypothétiques.

Le fractionnement à la réabsorption rénale est très probablement responsable de l'enrichissement des urines en isotopes lourds relativement au sang, avec une amplitude moyenne de $+1.15 \pm 0.06$ ‰ pour une réabsorption fractionnelle de 98 à 98.5 % du Ca des urines primaires. Il est probable que ce fractionnement apparent résulte au moins en partie d'une distillation de Rayleigh et que son amplitude augmente avec la réabsorption fractionnelle.

Le fractionnement à la minéralisation n'est pas de l'amplitude initialement proposée de -0.65 à -0.75 ‰. Il est d'une amplitude probablement plus limitée voire nulle, induisant une baisse des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ vraisemblablement comprise entre -0.30 à 0 ‰. Il est donc notamment possible qu'aucun fractionnement à la minéralisation ne détermine la composition isotopique de l'os.

Les transports transépithéliaux du Ca induisent probablement un fractionnement d'une amplitude de l'ordre de -0.30 ‰, bien que les épithéliums soient variés en structures et en fonctions. Les sécrétions digestives constituent la majeure partie du Ca endogène libéré dans le tube digestif et incorporé au chyme avant son transfert vers l'intestin. Il est donc possible que le Ca endogène soit de composition appauvrie relativement au sang. L'absorption intestinale pourrait de la même manière être associée à un fractionnement des isotopes du Ca, induisant une baisse des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de l'ordre de 0 à -0.30 ‰ depuis le tube digestif jusqu'au sang. Enfin, chez la femme allaitante, la sécrétion de lait maternel par les glandes mammaires participe peut-être à la baisse des compositions isotopiques du Ca depuis le sang vers le lait, avec une amplitude de l'ordre de -0.30 ‰.

Le Ca des tissus mous, principalement intracellulaire, est probablement de composition isotopique enrichie en isotopes lourds relativement au sang. Ceci est peut-être dû à la sortie préférentielle des isotopes légers du Ca lors de l'extrusion active de ce dernier.

B Modèle conceptuel

En se fondant sur la connaissance du cycle du Ca dans l'organisme (Figure 1.5, Chapitre 1), il est possible de construire un modèle plausible des flux et des fractionnements isotopiques du Ca à l'état stationnaire, en vue de modéliser mathématiquement les distributions des isotopes du Ca à travers ces différents réservoirs. Ce modèle est présenté en Figure 9.11 et dans le Tableau 9.2.

Le Ca de l'alimentation pénètre le tube digestif où il est mélangé au Ca endogène, principalement constitué des sécrétions digestives produites par les glandes salivaires, le foie et le pancréas. Le Ca endogène est associé au Ca du chyme avant l'entrée dans l'intestin. Il est donc en partie réabsorbé. Par ailleurs, les sécrétions digestives apportent un Ca potentiellement appauvri en isotopes lourds. Il est donc possible que les compositions isotopiques de l'organisme dépendent du rapport de la quantité de Ca alimentaire sur la quantité de Ca endogène.

Dans ce modèle, le sang est assimilé au liquide extracellulaire dans sa globalité car les relations entre le Ca circulant et les différents réservoirs ont été décrites pour le sang, qui porte la forme circulante et utile du Ca.

L'absorption intestinale transfère le Ca vers le liquide extracellulaire, avec un fractionnement isotopique possible, puis est échangé avec l'os, les tissus mous non-excréteurs et le rein.

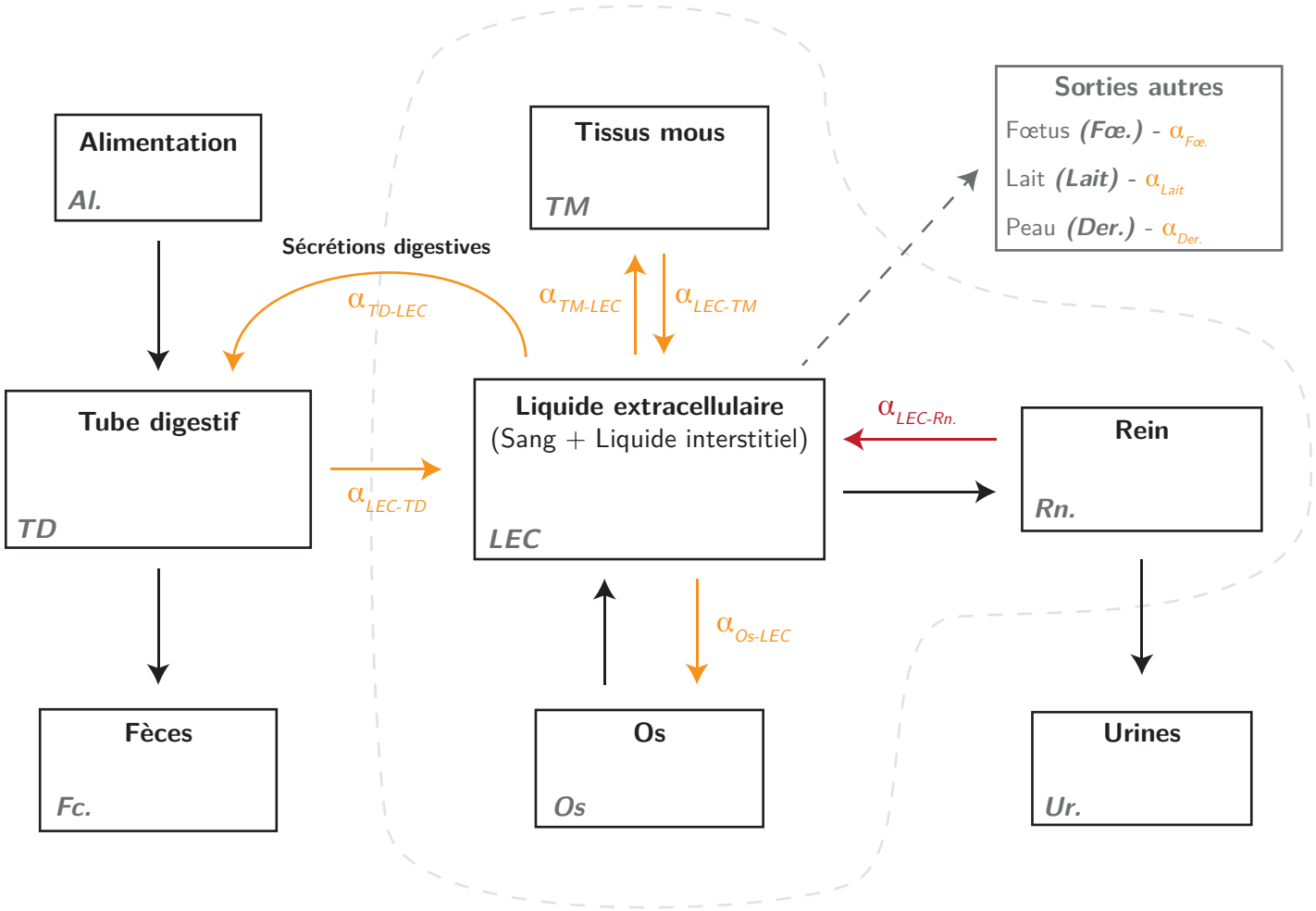

FIGURE 9.11 – **Modèle des transports et des fractionnements isotopiques du Ca entre les principaux réservoirs des mammifères.** Les facteurs α des fractionnements possibles ou probables sont en orange et le fractionnement avéré est en rouge. Les abréviations associées à chaque réservoir sont données en gris, dans le quart inférieur gauche de chaque boîte. Les flux entrants et sortants de l'organisme, délimité par un trait en pointillés gris, correspondent aux échanges de Ca avec l'environnement. **Model of transports and isotope fractionation for Ca between main mammal's reservoirs.** Possible or probable fractionation factors are in orange and likely fractionation factors are in red. Abbreviations for each reservoir are given in grey in the lower part of each box. Fluxes entering and leaving the organism, marked by a grey dashed line, correspond to exchanges with environment.

A l'état stationnaire, les échanges entre le réservoir central, qu'est le liquide extracellulaire, et les réservoirs périphériques ou "non-excréteurs", qui n'échangent pas avec l'environnement, ne peuvent pas influencer la composition isotopique du liquide extracellulaire. En effet, les flux de matière entrant et sortant de ces réservoirs périphériques sont équilibrés à l'état stationnaire. Ainsi, un fractionnement associé à un flux périphérique est nécessairement compensé par le flux inverse, les isotopes lourds (ou légers) accumulés dans ce réservoir sont retournés vers le réservoir central. Seuls des déséquilibres des flux de Ca entrant et sortant de ces réservoirs peuvent expliquer des variations transitoires des compositions des autres réservoirs. Pour cette raison, les tissus mous, dont les compositions sont mal décrites, ne seront pas pris en compte

TABLEAU 9.2 – **Bilan des relations entre les différents réservoirs (ou boîtes) présentés en Figure 9.11.** Les gammes de variations des flux de Ca sont données pour un humain adulte sain (Heaney et Abrams 2004, Hoenderop 2005, Peterson et Riggs 2010, Peacock 2010, Courbebaisse et Souberbielle 2011, Leblanc et Sirot 2011, Del Valle *et al.* 2011, Truswell 2017). [a] : Les apports alimentaires en Ca sont très variables (350 à 1400 mg.j^{-1}, estimé en France par Leblanc et Sirot (2011)) et les moyennes occidentales se situent entre 800 et 1000 mg.j^{-1}. [b] : Les compositions isotopiques de l'émail formé *in utero* chez l'humain suggèrent un fractionnement placentaire mais aucune preuve directe n'est disponible. [c] : Notez que les valeurs de α sont indexées par convention avec le produit puis le réactif de la réaction (voir Chapitre 1) et il en va de même pour les amplitudes Δ. * : fractionnement possible, ** : fractionnement probable, *** : fractionnement démontré. **Summary of relationships between reservoirs (or boxes) presented in Figure 9.11.** Variation intervals of Ca fluxes are given for a healthy adult (Heaney et Abrams 2004, Hoenderop 2005, Peterson et Riggs 2010, Peacock 2010, Courbebaisse et Souberbielle 2011, Leblanc et Sirot 2011, Del Valle *et al.* 2011, Truswell 2017). [a] : Ca intakes are highly variable (350 to 1400 mg.d^{-1}, as estimated in France by Leblanc et Sirot (2011)) and western average intake range between 800 and 1000 mg.d^{-1}. [b] : Isotope compositions of *in utero* formed enamel suggest possible placental fractionation although not proved. [c] : Note that α values are indexed with product first and then reactant. The same goes for δ amplitudes. * : possible fractionation ; ** : probable fractionation ; *** : demonstrated fractionation.

Boîte 1 > Boîte 2		Flux (mg.j^{-1})		Facteurs de fractionnement[c]		Amplitudes ($\delta^{44/42}$Ca, ‰)[c]	
Alimentation	> **Tube Digestif**	**Al.** > **TD**	800-1000[a]	$\alpha_{TD\text{-}Al.}$	1	$\Delta_{TD\text{-}Al.}$	0
Tube Digestif	> **Fèces**	**TD** > **Fc.**	850	$\alpha_{Fc.\text{-}TD}$	1	$\Delta_{Fc.\text{-}TD}$	0
Liquide Extracellulaire	> **Tube Digestif**	**LEC** > **TD**	120-200	$\alpha_{TD\text{-}LEC}$	0.9997** - 1	$\Delta_{TD\text{-}LEC}$	0 / -0.30**
Tube Digestif	> **Liquide Extracellulaire**	**TD** > **LEC**	300	$\alpha_{LEC\text{-}TD}$	0.9997* - 1	$\Delta_{LEC\text{-}TD}$	0 / -0.30*
Liquide Extracellulaire	> **Os**	**LEC** > **Os**	500	$\alpha_{Os\text{-}LEC}$	0.9997* - 1	$\Delta_{Os\text{-}LEC}$	0 / -0.30*
Os	> **Liquide Extracellulaire**	**Os** > **LEC**	500	$\alpha_{LEC\text{-}Os}$	1	$\Delta_{LEC\text{-}Os}$	0
Liquide Extracellulaire	> **Tissus Mous**	**LEC** > **TM**	1-10-100	$\alpha_{TM\text{-}LEC}$	0.9997* - 1	$\Delta_{TM\text{-}LEC}$	0 / -0.30*
Tissus Mous	> **Liquide Extracellulaire**	**TM** > **LEC**	1-10-100	$\alpha_{LEC\text{-}TM}$	0.9997* - 1	$\Delta_{LEC\text{-}TM}$	0 / -0.30*
Liquide Extracellulaire	> **Rein**	**LEC** > **Rn.**	10000	$\alpha_{Rn.\text{-}LEC}$	1	$\Delta_{Rn.\text{-}LEC}$	0
Rein	> **Liquide Extracellulaire**	**Rn.** > **LEC**	9880-9800	$\alpha_{LEC\text{-}Rn.}$	0.99885***	$\Delta_{LEC\text{-}Rn.}$	-1.15***
Rein	> **Urines**	**Rn.** > **Ur.**	120-200	$\alpha_{Ur.\text{-}Rn.}$	1	$\Delta_{Ur.\text{-}Rn.}$	0
Liquide Extracellulaire	> **Peau**	**LEC** > **Der.**	20-25	$\alpha_{Der.\text{-}LEC}$	Inconnu	$\Delta_{Der.\text{-}LEC}$	Inconnu
Liquide Extracellulaire	> **Fœtus**	**LEC** > **Fœ.**	**25-30g à la naissance**	$\alpha_{Fœ.\text{-}LEC}$	Inconnu[b]	$\Delta_{Fœ.\text{-}LEC}$	Inconnu[b]
Liquide Extracellulaire	> **Lait**	**LEC** > **Lait**	**160-300**	$\alpha_{Lait\text{-}LEC}$	0.9997** - 1	$\Delta_{Lait\text{-}LEC}$	0 / -0.30**

dans la discussion des compositions à l'état stationnaire.

En ce qui concerne l'os, en présence d'un fractionnement à la minéralisation, sa composition à l'état stationnaire devrait être appauvrie relativement au Ca du liquide extracellulaire.

Du calcium est perdu par le biais de la peau, des desquamations et des chutes de phanères. Ce flux représente moins de 25 mg.j^{-1} en moyenne et sera négligé pour la suite de la discussion des mécanismes responsables des compositions isotopiques de l'organisme au premier ordre.

En cas de grossesse ou d'allaitement, du Ca est également transféré au fœtus ou excrété vers le nourrisson. Ces flux sont changeants, temporaires, peuvent être intenses et sont probablement associés à des fractionnements isotopiques. Ils ne seront pas traités dans la discussion de l'état stationnaire.

L'excrétion du Ca dans les urines est réalisée par la filtration de 10 g.j^{-1} de Ca par les glomérules. Le fractionnement isotopique est localisé à la réabsorption fractionnelle des 9.8 à 9.85 g.j^{-1} de Ca. Il est donc associé au flux de Ca retournant depuis le rein vers le sang (α_{LEC-Rn}.). L'excrétion préférentielle des isotopes lourds par le rein devrait exercer une rétroaction sur le reste de l'organisme en y enrichissant le Ca en isotopes légers.

En somme, des interrogations demeurent quant aux rôles des différents flux de Ca dans la détermination des compositions isotopiques de l'organisme et de l'os en particulier. Aucun mécanisme n'explique à ce jour de manière satisfaisante la composition isotopique appauvrie de -0.54 $\pm$ 0.08 ‰ de l'os relativement au Ca alimentaire.

En vue de déterminer les causes responsables au premier ordre de la distribution observée des isotopes dans l'organisme (LEC ou sang, os, urines et excréments), ce modèle de transport a été testé par la construction d'un modèle mathématique, dit "de boîte", de l'organisme humain. Ceci est traité dans le Chapitre 10 qui suit.

Chapitre 10

Modèle de boîte

Sommaire

I Introduction 148

II Méthodes numériques 148

A Programme *Isopybox* 148

B Principe et formalisme mathématique 149

C Construction du modèle isotopique pour le Ca des mammifères 152

D Principe de la résolution de l'état stationnaire 155

III Résultats et discussion 157

A Les fractionnements à la minéralisation suffisent-ils ? 157

B Les fractionnements à la minéralisation et à l'excrétion urinaire sont-ils compatibles ? 157

C Les effets du fractionnement rénal peuvent-ils être modérés par d'autres paramètres ? 160

D Comment expliquer les dérives des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sanguins et urinaires lors de la perte osseuse induite ? 166

I Introduction

Les modélisations mathématiques des organismes présentés jusqu'ici (Skulan et DePaolo 1999, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015) ne sont pas des modélisations de l'organisme total à l'état stationnaire. Ces modèles sont construits pour prédire des perturbations d'un état stationnaire hypothétique et non justifié par des modélisations. Des hypothèses fortes y sont notamment faites : les fractionnements à la minéralisation induisent des fractionnements de -0.65 à -0.75 ‰, et le fractionnement rénal, lorsqu'il est pris en compte, n'exerce pas ou peu de rétroaction sur les compositions de l'organisme.

Afin de dégager des mécanismes de premier ordre pouvant expliquer les distributions des isotopes du Ca dans l'organisme, je choisis dans ce chapitre de présenter les résultats de modélisations de l'organisme à l'état stationnaire.

Dans cette étude, les quantités de Ca porté par chaque réservoir sont définies grâce aux estimations de la littérature. Plusieurs modèles de cycle du Ca élémentaire à l'état stationnaire sont construits pour l'humain adulte sur la base des flux de références (voir 9.2). Chaque simulation numérique consiste ensuite à imposer un ou plusieurs fractionnements isotopiques pour un cycle du Ca donné et à estimer les compositions isotopiques vers lesquelles le système se relaxe en partant de valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ nulles pour la totalité des réservoirs. Les simulations sont répétées en faisant varier les flux et les amplitudes et localisations des fractionnements isotopiques afin de discuter de l'importance des différents fractionnements démontrés, probables ou hypothétiques.

II Méthodes numériques

A Programme *Isopybox*

Le programme informatique *Isopybox* a été développé en langage Python en collaboration avec Jean-Alexis Hernandez et sur la base d'un code préexistant développé par Klervia Jaouen et Laurent Pouilloux. Ce programme permet la modélisation des évolutions des rapports d'isotopes stables pour des systèmes définis par l'utilisateur et comprenant autant de boîtes que souhaitées.

Les données d'entrées (conditions initiales, durée et résolution temporelle de la simulation, flux et fractionnements isotopiques) sont fournies *via* un fichier de format .xlsx lu par le programme. Celui-ci fournit en sortie les évolutions des quantités de l'élément d'intérêt dans chaque réservoir ainsi que leur composition isotopique (valeurs δ) en éditant un fichier .xlsx résumant les conditions initiales et finales, un fichier .txt des évolutions temporelles de quantités et compositions isotopiques et les graphiques de ces mêmes évolutions.

B Principe et formalisme mathématique

1 Principe des modèles de boîtes des isotopes stables

Le principe de la modélisation des compositions isotopiques d'éléments échangés entre les réservoirs (ou boîtes) d'un système est décrit depuis longtemps. Cette partie s'inspire des formalismes décrits par Albarède (1995).

On considère un système constitué de n boîtes j, échangeant un élément X ayant deux isotopes *M* et *N*. Toute boîte est définie par

— m_i^X la masse de l'élément X contenu par la boîte i. m_i^X sera désignée également par la "taille" de boîte dans la suite de ce chapitre.

— m_i^M et m_i^N sont les masses des isotopes M et N dans la boîte i, respectivement.

— $J_{i\mapsto j}^X$ est le flux massique de X depuis i vers j (homogène au rapport d'une masse sur un temps).

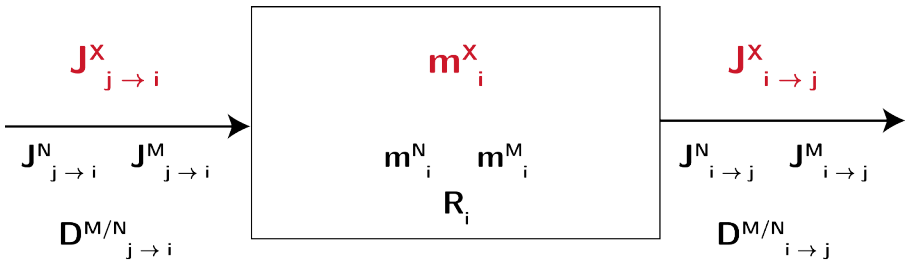

FIGURE 10.1 – **Variables définies pour le modèle de boîte : exemple d'une boîte *i* échangeant avec $n-1$ boîtes j.** Les grandeurs en **rouge** se rapportent aux variables élémentaires, celles en **noir** aux variables isotopiques. **Variables defined for the present boxmodel : example of a box *i* exchanging with $n-1$ boxes j.** Variables in **red** report to elemental quantities and those in **black** to isotopic quantities.

Nous appelons R_i le rapport des abondances isotopiques M/N :

$$R_i = \left(\frac{n^M}{n^N}\right)_i = \left(\frac{m^M}{m^N}\right)_i \times \left(\frac{M^N}{M^M}\right) = \left(\frac{m^M}{m^N}\right)_i A$$

où :

— n_i^M et n_i^N sont les quantités molaires des isotopes M et N dans la boîte i

— M^M et M^N sont les masses atomiques des isotopes M et N dans la boîte i

— $A = \left(\frac{M^N}{M^M}\right)$

Enfin, nous définissons $D_{i\mapsto j}^{M/N}$ comme étant le facteur de fractionnement relatif entre M et N de i vers j :

$$D_{i\mapsto j}^{M/N} = \frac{J_{i\mapsto j}^M / J_{i\mapsto j}^N}{m_i^M / m_i^N}$$

2 Conservation de la masse de X

En considérant que X n'a pas d'isotopes radioactifs ou radiogéniques, la conservation de la masse de X s'écrit :

$$\frac{dm_i^X}{dt} = -\sum_{j\neq i} J^X_{i\mapsto j} + \sum_{j\neq i} J^X_{j\mapsto i} \tag{10.1}$$

Cette équation peut être intégrée pour des flux constants ainsi :

$$m_i^X = \left(-\sum_{j\neq i} J^X_{i\mapsto j} + \sum_{j\neq i} J^X_{j\mapsto i}\right) \times t + m^X_{i-initial} \tag{10.2}$$

3 Equation différentielle pour R_i

En considérant que N et M sont stables et non radiogéniques, la conservation de la masse s'écrit :

$$\frac{dm_i^N}{dt} = -\sum_{j\neq i} J^N_{i\mapsto j} + \sum_{j\neq i} J^N_{j\mapsto i} = -\sum_{j\neq i} \frac{J^N_{i\mapsto j}}{m_i^N} m_i^N + \sum_{j\neq i} \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m_j^N} m_j^N \tag{10.3}$$

De la même manière,

$$\frac{dm_i^M}{dt} = -\sum_{j\neq i} \frac{J^M_{i\mapsto j}}{m_i^M} m_i^M + \sum_{j\neq i} \frac{J^M_{j\mapsto i}}{m_j^M} m_j^M \tag{10.4}$$

Il est par ailleurs possible de dériver le rapport R_i ainsi :

$$\frac{dR_i}{dt} = \frac{d}{dt}\left(\frac{m^M}{m^N}\right)_i A = \frac{A}{{m_i^N}^2}\left(m_i^N \frac{dm_i^M}{dt} - m_i^M \frac{dm_i^N}{dt}\right) = \frac{A}{m_i^N}\left(\frac{dm_i^M}{dt} - \frac{R_i}{A}\frac{dm_i^N}{dt}\right)$$

Nous pouvons insérer *(10.3)* et *(10.4)* dans la relation précédente :

$$\frac{dR_i}{dt} = \frac{A}{m_i^N}\left(-\sum_{j\neq i} \frac{J^M_{i\mapsto j}}{m_i^M} m_i^M + \sum_{j\neq i} \frac{J^M_{j\mapsto i}}{m_j^M} m_j^M + \frac{R_i}{A}\sum_{j\neq i} \frac{J^N_{i\mapsto j}}{m_i^N} m_i^N - \frac{R_i}{A}\sum_{j\neq i} \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m_j^N} m_j^N\right) \tag{10.5}$$

Cette équation peut être modifiée comme suit :

$$\frac{dR_i}{dt} = A\left(-\sum_{j\neq i} \frac{J^M_{i\mapsto j}}{m_i^M}\frac{m_i^M}{m_i^N} + \sum_{j\neq i} \frac{J^M_{j\mapsto i}}{m_j^M}\frac{m_j^M}{m_j^N}\frac{m_j^N}{m_i^N} + R_i\sum_{j\neq i} \frac{J^N_{i\mapsto j}}{m_i^N} - R_i\sum_{j\neq i} \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m_j^N}\frac{m_j^N}{m_i^N}\right)$$

$$\frac{dR_i}{dt} = A\left(-\sum_{j\neq i} \frac{J^M_{i\mapsto j}}{m_i^M}\frac{R_i}{A} + \sum_{j\neq i} \frac{J^M_{j\mapsto i}}{m_j^M}\frac{R_j}{A}\frac{m_j^N}{m_i^N} + R_i\sum_{j\neq i} \frac{J^N_{i\mapsto j}}{m_i^N} - R_i\sum_{j\neq i} \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m_j^N}\frac{m_j^N}{m_i^N}\right)$$

$$\frac{dR_i}{dt} = R_i \sum_{j\neq i} \left(\frac{J^N_{i\mapsto j}}{m^N_i} - \frac{J^M_{i\mapsto j}}{m^M_i} \right) + \sum_{j\neq i} \frac{J^M_{j\mapsto i}}{m^M_j} \frac{m^N_j}{m^N_i} R_j - \sum_{j\neq i} \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m^N_j} \frac{m^N_j}{m^N_i} R_i$$

$$\frac{dR_i}{dt} = R_i \sum_{j\neq i} \left(\frac{J^N_{i\mapsto j}}{m^N_i} - \frac{J^M_{i\mapsto j}}{m^M_i} \right) + \sum_{j\neq i} \left(\frac{J^M_{j\mapsto i}}{m^M_j} R_j - \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m^N_j} R_i \right) \frac{m^N_j}{m^N_i}$$

$$\frac{dR_i}{dt} = R_i \sum_{j\neq i} \frac{J^N_{i\mapsto j}}{m^N_i} \left(1 - \frac{J^M_{i\mapsto j}/J^N_{i\mapsto j}}{m^M_i/m^N_i} \right) + \sum_{j\neq i} \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m^N_j} \left(\frac{J^M_{j\mapsto i}/J^N_{j\mapsto i}}{m^M_j/m^N_j} R_j - R_i \right) \frac{m^N_j}{m^N_i}$$

Ce qui permet d'écrire :

$$\frac{dR_i}{dt} = R_i \sum_{j\neq i} \frac{J^N_{i\mapsto j}}{m^N_i} \left(1 - D^{M/N}_{i\mapsto j} \right) + \sum_{j\neq i} \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m^N_j} \left(D^{M/N}_{j\mapsto i} R_j - R_i \right) \frac{m^N_j}{m^N_i} \tag{10.6}$$

Dans le but de résoudre l'équation 10.6, nous faisons les approximations suivantes :

$$\frac{J^N_{i\mapsto j}}{m^N_i} \simeq \frac{J^X_{i\mapsto j}}{m^X_i} \quad ; \quad \frac{J^N_{j\mapsto i}}{m^N_j} \simeq \frac{J^X_{j\mapsto i}}{m^X_j} \quad ; \quad \frac{m^N_j}{m^N_i} \simeq \frac{m^X_j}{m^X_i}$$

Ces approximations sont valables pour des fractionnements limités à quelques ‰, ce qui est le cas pour les systèmes isotopiques d'éléments relativement lourds (ou non-traditionnels) comme les isotopes du Ca. Cette approximation n'est plus valable pour des systèmes isotopiques légers où les différences de réactivité entre les isotopes sont trop importantes et les amplitudes des fractionnements sont trop grands.

Nous avons donc l'équation finale utilisée pour la modélisation des compositions isotopiques par *Isopybox* :

$$\frac{dR_i}{dt} = R_i \sum_{j\neq i} \frac{J^X_{i\mapsto j}}{m^X_i} \left(1 - D^{M/N}_{i\mapsto j} \right) + \sum_{j\neq i} \frac{J^X_{j\mapsto i}}{m^X_j} \left(D^{M/N}_{j\mapsto i} R_j - R_i \right) \frac{m^X_j}{m^X_i} \tag{10.7}$$

La résolution numérique est réalisée par calculs itératifs des compositions élémentaires et isotopiques calculées grâce aux équations 10.2 et 10.7. A chaque pas de temps, défini par le nombre d'incréments et la durée de simulation déterminés par l'utilisateur, *Isopybox* calcule une nouvelle distribution des éléments et des compositions isotopiques à travers les différents réservoirs. Les valeurs de $D^{M/N}_{i\mapsto j}$ sont alors assimilées aux valeurs des facteurs de fractionnements α_{j-i} de i vers j. Les conditions initiales sont données par les tailles des boîtes et les valeurs de δX de chaque boîte.

Pour la modélisation d'un état stationnaire, les flux doivent être équilibrés pour le système étudié, c'est-à-dire que la somme des flux entrants et sortants de chaque réservoir doit être nulle. Pour des simulations suffisamment longues (environ 10 fois plus longues que le temps de relaxation du système), le modèle permet de prédire la distribution isotopique de l'état stationnaire pour les isotopes.

Il est par ailleurs possible d'étudier la réponse du système à des perturbations discrètes, ce qui permet par exemple d'étudier la relaxation du système. Il est ainsi possible de modifier la composition isotopique

d'entrée après avoir préalablement déterminé les compositions de l'état stationnaire précédant la perturbation.

Enfin, il est possible de simuler des déséquilibres de flux en faisant en sorte que la somme des flux entrants et sortants soit non nulle. Il est alors nécessaire de veiller à ne pas réaliser la simulation sur une durée conduisant à la vidange totale d'un ou de plusieurs réservoirs.

C Construction du modèle isotopique pour le Ca des mammifères

Le modèle de l'organisme est dérivé de celui présenté en figure 9.11 du Chapitre 9. Il est présenté en Figure 10.2.

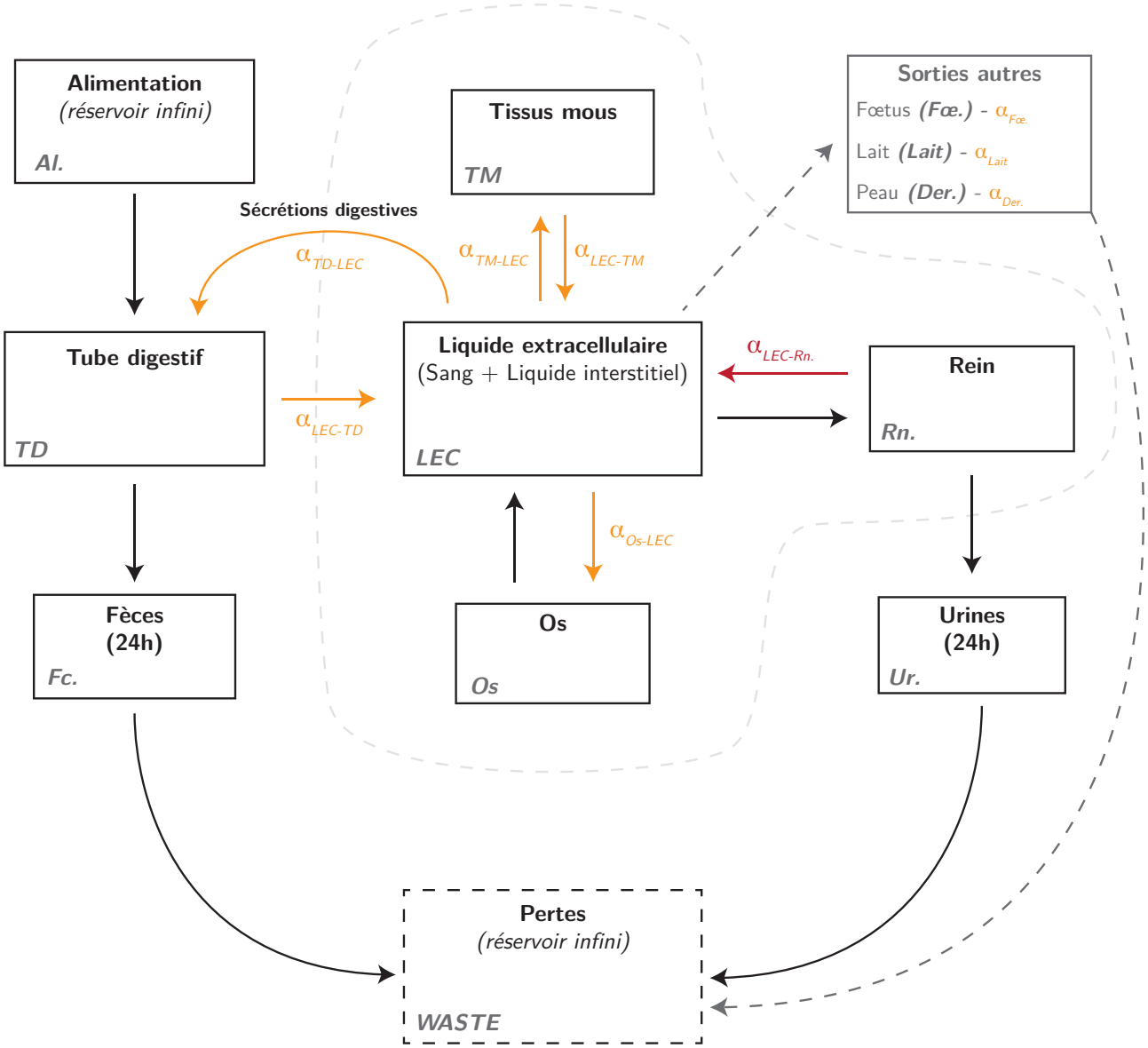

FIGURE 10.2 – **Modèle de boîte de l'organisme humain utilisé pour les estimations des compositions isotopiques des principaux réservoirs.** Boxmodel of human organism used for estimation of isotope compositions in main reservoirs.

L'alimentation est considérée comme un réservoir de taille infinie et de composition isotopique constante égale à 0 ‰. L'ensemble des simulations donneront donc des compositions isotopiques en $\delta^{44/42}Ca$ relativement à l'alimentation. En pratique la masse de Ca contenu par ce réservoir est fixée à 10^{12} g, ce qui est infini au regard de la quantité de Ca contenue dans l'organisme (de l'ordre de 1 g). Par ailleurs, les durées des simulations n'excèdent pas 10^6 j, ce qui pour des apports en Ca alimentaire inférieurs à 1.4 g.j^{-1}, représente une baisse de 0.00014 % de la masse initiale de ce réservoir.

L'ensemble des pertes de Ca par l'organisme sont dirigées vers une boîte "Pertes" ou *"WASTE"* qui ne sera pas étudiée en elle-même mais accumulera le Ca perdu par toutes les voies de sortie.

Le tube digestif se rapporte en réalité principalement à l'intestin. Il est considéré comme une boîte, dans laquelle entre le Ca de l'alimentation et des sécrétions digestives produites plus haut dans le tube digestif. Le Ca en sort par absorption intestinale et par les matières fécales.

Les urines et les fèces sont décrites par des boîtes représentant le Ca excrété en 24h afin de suivre les évolutions de leurs compositions isotopiques au cours du temps.

Les sorties autres (fœtus, lait et peau) sont négligées dans ce modèle à l'état stationnaire.

1 Tailles des réservoirs

Les tailles des réservoirs de l'organisme (LEC, Os, TM et Rein) sont déterminées à partir des estimations de la littérature (Tableau 10.1).

TABLEAU 10.1 – **Masses de Ca fixées ou variables pour chaque réservoir ou boîte.** A titre indicatif, les ordres de grandeur des flux sortants totaux et des temps de résidence du Ca sont donnés également. Les ordres de grandeur pour les tissus mous sont très peu contraints. **Calcium masses set or variable for each reservoir or box.** As an indication, order of magnitudes of total leaving fluxes and residence times of Ca are given as well. Order of magnitudes for soft tissues are very uncertain.

Réservoir (Abrév.)		**Ca (mg)**	**Flux sortants moyens (mg.j-1)**	**Temps de résidence moyens**
Alimentation	Al	Infini (1e15)	-	-
Tube digestif	TD	Variable (= $F_{alim>TD} + F_{LEC>TD}$)	~ 800 mg.j^{-1}	1 jour
Liquide Extracellulaire	LEC	1200	~ 10700 mg.j^{-1}	2-3 heures
Urines (24h)	Ur	Variable (= $F_{Rn>Ur}$)	-	-
Fèces (24h)	Fc	Variable (= $F_{TD>Fc}$)	-	-
Os	Os	1200000	~ 500 mg.j^{-1}	6-7 ans
Rein	Rn	50	~ 10000 mg.j^{-1}	7 mn
Tissus Mous	TM	9000	10-1000 mg.j^{-1}	9 - 900 jours

Les tailles des réservoirs principaux (LEC, Os et Tissus mous) sont les ordres de grandeur présentés en Figure 1.5 en Chapitre 1.

La masse de Ca contenue par les reins est difficile à estimer. Les reins représentent de l'ordre de 240 à 300 g chez l'adulte (Young *et al.* 2009) et les concentrations en Ca y sont de l'ordre de 100 à 200 μg.g^{-1} (Iyengar *et al.* 1978). Les reins contiendraient donc de 24 à 60 mg de Ca. Je fixe donc la quantité de Ca des reins à 50 mg. Cependant ce choix ne porte pas à conséquence. En effet, de la même manière que pour les tissus mous, l'état stationnaire atteint après relaxation du système n'est pas dépendant de la taille des réservoirs internes à l'organisme, et seule la dynamique de la réponse à des perturbations sera affectée.

Les tailles des boîtes à l'interface avec l'environnement (Tube digestif, Fèces et Urines) dépendent des flux quotidiens (en mg.j^{-1}) qui y arrivent et qui en sortent.

2 Modèles de flux de l'organisme à l'état stationnaire

Les flux de Ca entre les réservoirs de l'organisme et entre ce dernier et son environnement sont très variables et dépendent notamment de l'individu, de sa condition physiologique, des apports en Ca alimentaire *etc.*. Ainsi par exemple, les flux de Ca urinaire sont susceptibles d'influencer l'amplitude du fractionnement α_{LEC-Rn}. Par ailleurs, les équilibres entre les entrées et les sorties ou entre les différentes voies de sortie du Ca sont susceptibles d'affecter la composition de l'organisme.

Afin d'explorer la dépendance des distributions à l'état stationnaire aux flux de Ca, 4 séries de 5 modèles de flux à l'état stationnaire ont été testés.

i. La série **S1.** (Tableau 10.2.S1.) rassemble cinq modèles de flux pour lesquels les apports en Ca alimentaire sont constants et de l'ordre de la moyenne occidentale (*e.g.* Leblanc et Sirot 2011). La proportion absorbée de Ca du chyme est constante (300 mg.j^{-1}) soit de l'ordre de 30 %, ce qui est également proche des estimations pour l'adulte (*e.g.* Hunt et Johnson 2007). La perte totale de Ca par le Ca endogène et les urines est égale à l'absorption mais les rapports entre pertes urinaires et pertes par les sécrétions varient entre 2 et 0.50.

Les séries **S2.**, **S3.** et **S4.** qui suivent correspondent à des apports alimentaires changeants avec des réponses physiologiques différentes.

ii. La série **S2.** (Tableau 10.2.S2.) correspond à cinq modèles de flux pour lesquels les apports alimentaires sont variables (de 600 à 1400 mg.j^{-1}), mais les quantités absorbées sont constantes. Les quantités excrétées par les urines et les sécrétions digestives sont par ailleurs constantes et chacune égale à 150 mg.j^{-1}.

iii. La série **S3.** (Tableau 10.2.S3.) rassemble cinq modèles pour lesquels les apports alimentaires varient entre 600 et 1400 mg.j^{-1} et les quantités absorbées sont proportionnelles à ces apports, avec l'absorption d'environ 30 % du Ca ingéré. Les pertes urinaires et des sécrétions digestives compensent l'absorption variable mais sont égales entre elles.

iv. La série **S4.** (Tableau 10.2.S4.) rassemble cinq modèles pour lesquels les apports alimentaires varient

entre 600 et 1400 mg.j^{-1}, et les quantités absorbées sont proportionnelles à ces apports, avec l'absorption d'environ 30 % du Ca ingéré. Les quantités de Ca perdu par les urines et les sécrétions digestives compensent l'absorption variable mais la quantité perdue par les sécrétions digestives est constante et les quantités perdues par voie urinaire sont variables.

3 Facteurs de fractionnements

Les simulations ont été réalisées pour des facteurs de fractionnements d'ampleurs et de localisations variables selon les principales hypothèses énoncées dans le chapitre précédent et résumées dans le Tableau 9.2.

D Principe de la résolution de l'état stationnaire

Pour chaque simulation, les compositions isotopiques initiales de toutes les boîtes sont fixées à 0 ‰. Le principe de la simulation est de calculer les compositions isototopiques des réservoirs de l'état stationnaire vers lequel le système se relaxe. Il est attendu que le temps de relaxation du système soit déterminé par l'os pour lequel le temps de résidence du Ca est le plus grand (Tableau 10.1).

A titre d'exemple, pour la relaxation du système simple en conditions du modèle de type S1.3. (voir Tableau 10.2), et en considérant un fractionnement à la minéralisation de -0.65 ‰ ($\alpha_{Os-LEC} = 0.99935$), on obtient l'évolution présentée en Figure 10.3.

On constate que les $\delta^{44/42}Ca$ de l'os tendent vers la composition attendue de -0.65 ‰ relativement à l'alimentation et que les autres boîtes tendent vers des compositions identiques à celles de l'alimentation. Ceci est tout à fait attendu, puisque l'os est un réservoir "périphérique" et il est à l'équilibre des flux.

On constate que les réservoirs atteignent leur asymptote en un temps de l'ordre de 100 ans, ce qui correspondrait à un temps de résidence du Ca osseux de 17 à 18 ans (méthode de la tangente en 0). Ceci est particulièrement long en comparaison avec le temps de résidence du Ca dans le réservoir dont l'inertie est la plus grande, à savoir l'os (6 à 7 ans).

L'estimation des distributions des isotopes du Ca à l'état stationnaire est donc réalisée en répertoriant les asymptotes des simulations d'évolution des $\delta^{44/42}Ca$ pour chaque boîte. Les simulations ont été réalisées sur 10^6 j, ce qui permet de réaliser une estimation précise mais n'a pas de signification biologique.

Enfin, les résultats des simulations sont comparées aux gammes de variation des compositions observées chez les mammifères. Ces gammes sont tirées des observations décrites en Chapitre 9 et systématiquement représentées par des droites marquant les compositions moyennes et des aires couvrant les intervalles de confiance à 95 %. Ainsi, les compositions de l'os sont de -0.54 $\pm$ 0.08 ‰ relativement à l'alimentation ; les matières fécales présentent des compositions de +0.01 $\pm$ 0.11 ‰ relativement à l'alimentation ; les urines sont enrichies de +1.15 $\pm$ 0.06 ‰ relativement au sang (les incertitudes seront propagées sur les figures

TABLEAU 10.2 – **Description des flux des modèles des séries S1., S2., S3. et S4..**
Description of fluxes for models of series S1., S2., S3. and S4.

	S1 Apports et Absorption constants, Pertes urinaires et endogènes variables					**S2** Apports variables / Absorption constante, Pertes Ur. et Endo. égales et constantes				
Flux (mg.j^{-1})	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
$F_{Al>TD}$	1000	1000	1000	1000	1000	600	800	1000	1200	1400
$F_{TD>Fc}$	800	820	850	880	900	450	650	850	1050	1250
$F_{LEC>TD}$	100	120	150	180	200	150	150	150	150	150
$F_{TD>LEC}$	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
$F_{LEC>Os}$	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
$F_{Os>LEC}$	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
$F_{LEC>TM}$	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
$F_{TM>LEC}$	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
$F_{LEC>Rn}$	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
$F_{Rn>LEC}$	9800	9820	9850	9880	9900	9850	9850	9850	9850	9850
$F_{Rn>Ur}$	200	180	150	120	100	150	150	150	150	150
$F_{Fc>WASTE}$	800	820	850	880	900	450	650	850	1050	1250
$F_{Ur>WASTE}$	200	180	150	120	100	150	150	150	150	150
Rapports de flux										
Ca_{Ur}/Ca_{Endo}	2.00	1.50	1.00	0.67	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ca_{Endo}/Ca_{Alim}	0.10	0.12	0.15	0.18	0.20	0.25	0.19	0.15	0.13	0.11
Ca_{Endo}/Ca_{Fc}	0.13	0.15	0.18	0.20	0.22	0.33	0.23	0.18	0.14	0.12
Ca_{Abs}/Ca_{Alim}	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.50	0.38	0.30	0.25	0.21
$Ca_{Ur}/Ca_{Glom.}$ (%)	2.00	1.80	1.50	1.20	1.00	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50

	S3 Apports variables / Absorption proportionnelle, Pertes Ur. et Endo. variables mais égales					**S4** Apports variables / Absorption proportionnelle, Pertes Endo. constantes et Ur. variables				
Flux (mg.j^{-1})	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
$F_{Al>TD}$	600	800	1000	1200	1400	600	800	1000	1200	1400
$F_{TD>Fc}$	500	660	835	1000	1165	550	670	820	950	1080
$F_{LEC>TD}$	100	140	165	200	235	150	150	150	150	150
$F_{TD>LEC}$	200	280	330	400	470	200	280	330	400	470
$F_{LEC>Os}$	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
$F_{Os>LEC}$	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
$F_{LEC>TM}$	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
$F_{TM>LEC}$	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
$F_{LEC>Rn}$	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
$F_{Rn>LEC}$	9900	9860	9835	9800	9765	9950	9870	9820	9750	9680
$F_{Rn>Ur}$	100	140	165	200	235	50	130	180	250	320
$F_{Fc>WASTE}$	500	660	835	1000	1165	550	670	820	950	1080
$F_{Ur>WASTE}$	100	140	165	200	235	50	130	180	250	320
Rapports de flux										
Ca_{Ur}/Ca_{Endo}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.33	0.87	1.20	1.67	2.13
Ca_{Endo}/Ca_{Alim}	0.17	0.18	0.17	0.17	0.17	0.25	0.19	0.15	0.13	0.11
Ca_{Endo}/Ca_{Fc}	0.20	0.21	0.20	0.20	0.20	0.27	0.22	0.18	0.16	0.14
Ca_{Abs}/Ca_{Alim}	0.33	0.35	0.33	0.33	0.34	0.33	0.35	0.33	0.33	0.34
$Ca_{Ur}/Ca_{Glom.}$ (%)	1.00	1.40	1.65	2.00	2.35	0.50	1.30	1.80	2.50	3.20

présentées ci-après) ; le sang est enrichi de $+0.15 \pm 0.16$ ‰ relativement à l'os (croisement des différentes estimations).

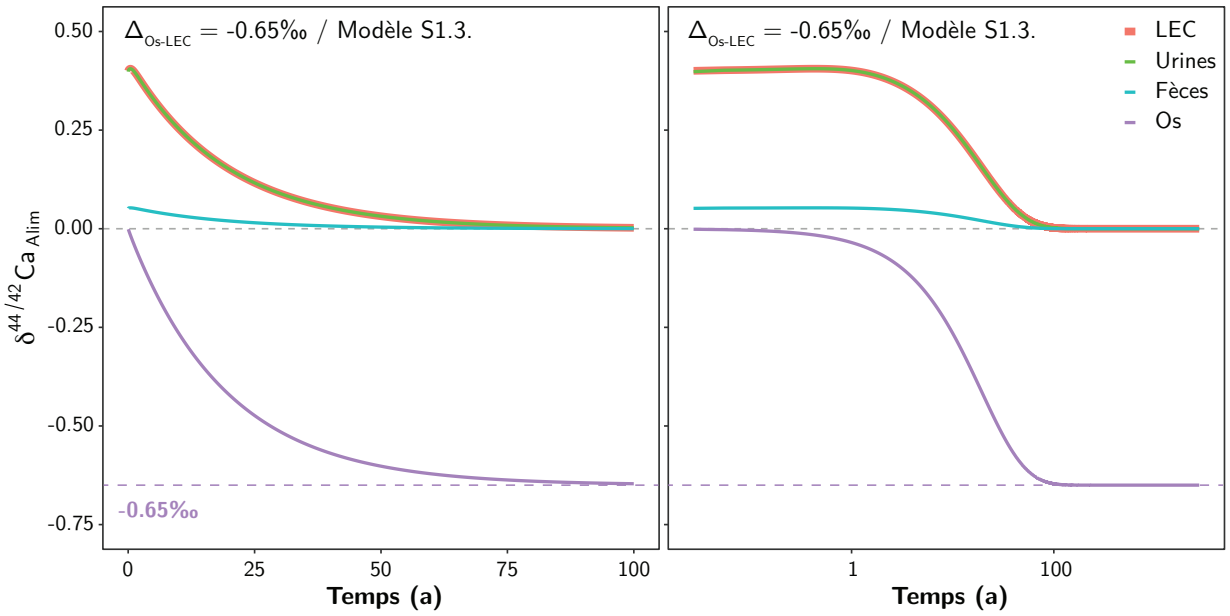

FIGURE 10.3 – **Relaxation des compositions isotopiques ($\delta^{44/42}Ca$, ‰, rel. *Alimentation*) depuis un état initial à 0 ‰ pour tous les réservoirs et vers l'état stationnaire, pour un fractionnement à la minéralisation de -0.65 ‰ (α_{Os-LEC} = 0.99935) et le modèle de flux S1.3..** Les urines et le LEC sont superposés. **Relaxation of isotope compositions ($\delta^{44/42}Ca$, ‰, rel. to *Alimentation*) from a 0 ‰ initial state and tending to steady state, for a fractionation at mineralisation of -0.65 ‰ (α_{Os-LEC} = 0.99935) and a flux model S1.3.** Urines and LEC are overlapping.

III Résultats et discussion

A Les fractionnements à la minéralisation suffisent-ils ?

Les résultats des simulations pour des facteurs de fractionnements isotopiques à la minéralisation seuls (α_{Os-LEC}) sont donnés pour les différents modèles de type **S1.** en Figure 10.4.

Comme attendu et préalablement supposé (Skulan et DePaolo 1999), des fractionnements à la minéralisation seuls se traduisent par des compositions isotopiques des os appauvris relativement à l'alimentation avec des amplitudes $\Delta_{Os-Alim.}$ égales aux Δ_{Os-LEC}, et donc des compositions isotopiques des autres boîtes égales à celle de l'alimentation. Par ailleurs, les différents modèles de flux n'influencent pas ces compositions à l'état stationnaire, ce qui est également attendu dans cette configuration.

Cette interprétation ne suffit donc pas à expliquer les compositions appauvries de l'os relativement à l'alimentation.

B Les fractionnements à la minéralisation et à l'excrétion urinaire sont-ils compatibles ?

Un total de 9 séries de 5 simulations ont été réalisées (Modèles de la série **S1.**, voir Tableau 10.2) pour des fractionnements à la minéralisation variables et un fractionnement rénal constant.

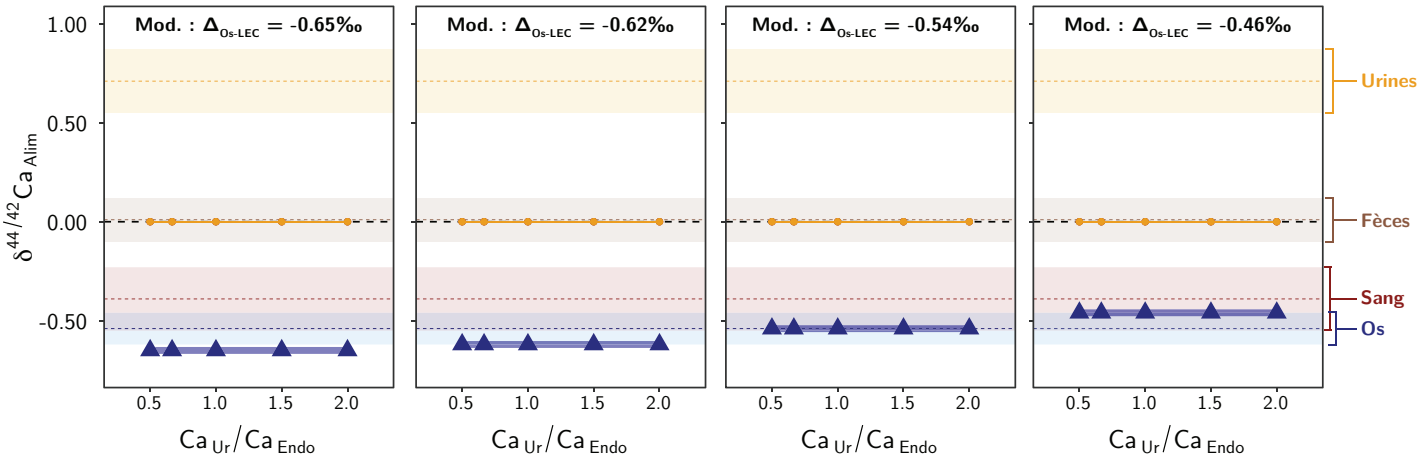

FIGURE 10.4 – **Compositions des modèles à l'état stationnaire pour des fractionnements à la minéralisation α_{Os-LEC} uniquement** ($\delta^{44/42}Ca$, ‰, rel. *Alimentation*) en fonction du rapport entre le Ca urinaire (Ca_{Ur}) et le Ca sécrété dans le tube digestif (Ca_{Endo}) (Modèles de la série **S1.**, voir Tableau 10.2). Les compositions isotopiques des urines, du LEC et des fèces sont confondues en une ligne et présentent des valeurs de $\delta^{44/42}Ca_{Alim.}$ nulles. Les aires colorées correspondent aux gammes des valeurs observées chez les mammifères. **Steady state model isotope compositions for fractionation at mineralisation only** ($\delta^{44/42}Ca$, ‰, rel. *Alimentation*) as a function of ratio between urinary Ca (Ca_{Ur}) and Ca secreted in gastro-intestinal tract (Ca_{Endo}) (Models of the **S1.** series, see Table 10.2). Isotope compositions of urines, ECF and feces are undistinguishable from 0 ‰ ($\delta^{44/42}Ca_{Alim.}$). Colored areas correspond to the values observed in mammals.

Les simulations suggèrent que les distributions des isotopes du Ca sont fortement affectées par le fractionnement rénal (Figure 10.5). Les valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des urines sont séparées de +1.15 ‰ relativement au LEC, ce qui est attendu pour des modèles où un fractionnement rénal force la relation entre ces deux réservoirs. Il était également attendu que les compositions du LEC soient appauvries en isotopes lourds relativement à l'alimentation du fait de l'excrétion de Ca lourd par les urines. Cependant, l'amplitude de la différence entre le LEC et l'alimentation est particulièrement marquée. Le LEC tendrait vers des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ plus négatives que ceux observés chez les organismes modèles, voire plus négatifs que les valeurs de l'os observées chez ces mêmes organismes.

Les compositions isotopiques de l'os prédites par les simulations impliquant des fractionnements de plus de -0.30 ‰ sont par ailleurs particulièrement appauvries relativement aux valeurs observées chez les mammifères. Ceci suggère à nouveau que les fractionnements à la minéralisation sont plus limités que ce qui était supposé dans la littérature.

Par ailleurs, la balance entre les flux sortants par la voie des sécrétions digestives et par voie urinaire joue un rôle important dans la composition du sang, des urines et de l'os. Les modèles pour lesquels l'excrétion urinaire est plus importante que les sécrétions digestives prédisent des compositions isotopiques du LEC particulièrement appauvries en isotopes lourds, ce qui semble logique du fait de l'excrétion accentuée du Ca enrichi en isotopes lourds *via* les urines. Inversement, des pertes de Ca orientées principalement vers les

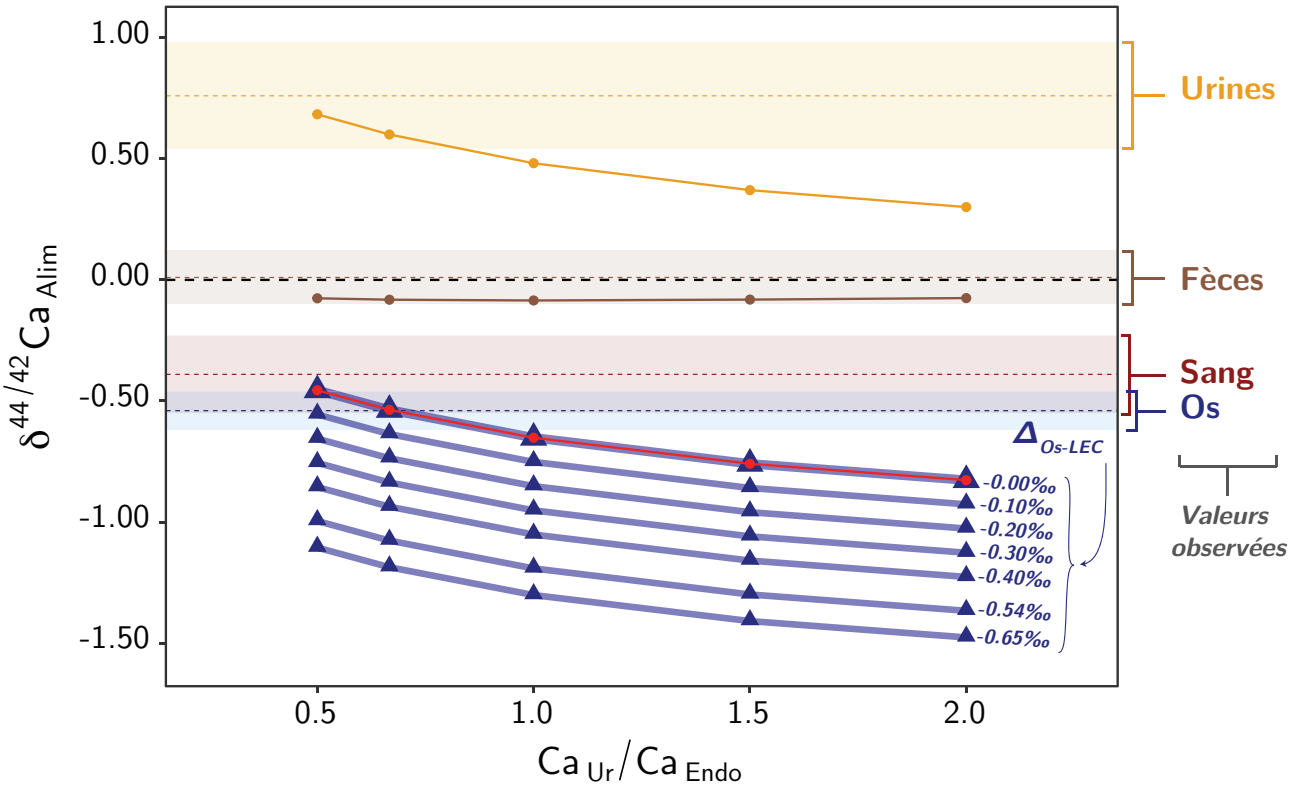

FIGURE 10.5 – **Compositions des modèles à l'état stationnaire pour des fractionnements à la minéralisation α_{Os-LEC} variables et des fractionnements urinaires constants (Δ_{LEC-Rn} = -1.15 ‰)** en fonction du rapport entre le Ca urinaire (Ca_{Ur}) et le Ca sécrété dans le tube digestif (Ca_{Endo}) (Modèles de la série **S1.**, voir Tableau 10.2). Les simulations prédisent des compositions des urines indépendantes des fractionnements à la minéralisation et il en va de même pour le LEC et les fèces. **Steady state model isotope compositions for varying fractionation at mineralisation α_{Os-LEC} and constant urinary fractionation (Δ_{LEC-Rn} = -1.15 ‰)** as a function of ratio between urinary Ca (Ca_{Ur}) and Ca secreted in gastro-intestinal tract (Ca_{Endo}) (Models of the **S1.** series, see Table 10.2). All these runs predict isotope compositions of urines independant from fractionation at mineralization and the same holds for feces and ECF (blood).

sécrétions digestives tendent à augmenter la composition du LEC et donc des boîtes qui en dépendent.

Les simulations pour des rapports Ca_{Ur}/Ca_{Endo} inférieurs à 1 et des fractionnements à la minéralisation inférieurs ou égaux à -0.20 ‰ se rapprochent des domaines des valeurs observées chez les mammifères. Les rapports Ca_{Ur}/Ca_{Endo} sont plutôt proches de 1 chez l'humain (Heaney et Abrams 2004). Ceci suggère que les simulations pour des rapports Ca_{Ur}/Ca_{Endo} égaux à 1 des modèles dont les valeurs de Δ_{Os-LEC} sont de -0.20 et -0.10 ‰ (Figure 10.5) prédisent des compositions trop appauvries relativement aux observations. En revanche, en l'absence de fractionnement à la minéralisation (Figure 10.5 pour $\Delta_{Os-LEC} = 0$ ‰), les valeurs approchent les valeurs basses des compositions observées (-0.65 ‰ pour l'os et le LEC, relativement à l'alimentation).

On constate enfin que les compositions des matières fécales, qui sont un mélange de Ca alimentaire et de Ca endogène, sont légèrement appauvries par rapport à l'alimentation mais restent dans le domaine des

valeurs observées.

En somme, ces simulations suggèrent une première fois que les appauvrissements en isotopes lourds de l'os et du LEC observés chez les mammifères sont en grande partie voire entièrement déterminés par les pertes de Ca urinaire. Un fractionnement à la minéralisation appauvrirait encore l'os en isotopes lourds, et l'éloignerait des domaines des valeurs observées.

Cependant, les équilibres entre les flux de Ca pourraient grandement influencer les compositions à l'état stationnaire. Par ailleurs, les variations de la réabsorption fractionnelle du Ca urinaire pourraient faire varier les amplitudes du fractionnement rénal selon une distillation de Rayleigh. Pour la suite du raisonnement, les fractionnements à la minéralisation sont supposés inexistants. Cependant, ils n'influencent que la composition isotopique de l'os et toutes les modélisations qui suivent peuvent être lues avec la possibilité que l'os soit plus appauvri en isotopes lourds que le Ca du LEC.

C Les effets du fractionnement rénal peuvent-ils être modérés par d'autres paramètres ?

1 Effets d'une possible distillation de Rayleigh à la réabsorption tubulaire

La réabsorption tubulaire pourrait induire une distillation de Rayleigh des isotopes du Ca au cours de la réabsorption de ce dernier (Chapitre 9). Selon cette interprétation, l'amplitude du fractionnement rénal dans son ensemble serait dépendante de la quantité de Ca réabsorbé (ou excrété) ramenée à la quantité de Ca filtré par le glomérule.

Les effets de ces fractionnements dépendants de la quantité de Ca excrété ont été modélisés en utilisant la série **S3.** des modèles de flux (voir Tableau 10.2). Cette série correspond à des fractions de Ca excrété variables associées à des apports en Ca changeants et des absorptions intestinales proportionnelles. Les rapports Ca_{Ur}/Ca_{Endo}, qui induisent par ailleurs des variations des compositions des réservoirs (Figure 10.5), sont maintenus constants.

Les amplitudes (Δ_{LEC-Rn}) ou facteurs de fractionnements (α_{LEC-Rn}) à la réabsorption rénale sont calculés sur la base d'un facteur de fractionnement à la réabsorption transépithéliale $\alpha_{LEC-Ur.I.}$ de 0.999705, obtenu en considérant une excrétion de 2 % du Ca filtré par le glomérule et une amplitude associée Δ_{LEC-Rn} de -1.15 ‰ (Chapitre 9). Les résultats de ces simulations sont présentés en Figure 10.6.

Les simulations suggèrent que les distributions des compositions isotopiques seraient affectées par des excrétions fractionnelles variables dans le cas où la réabsorption rénale est régie par une distillation de Rayleigh. Une faible excrétion (équivalente à une réabsorption intense) enrichit l'os et le LEC en isotopes légers et les urines en isotopes lourds. Inversement, une excrétion fractionnelle importante tend à rapprocher les compositions des os et du LEC vers les domaines des valeurs observées.

Dans l'hypothèse d'une distillation de Rayleigh, la variabilité interindividuelle des réabsorptions frac-

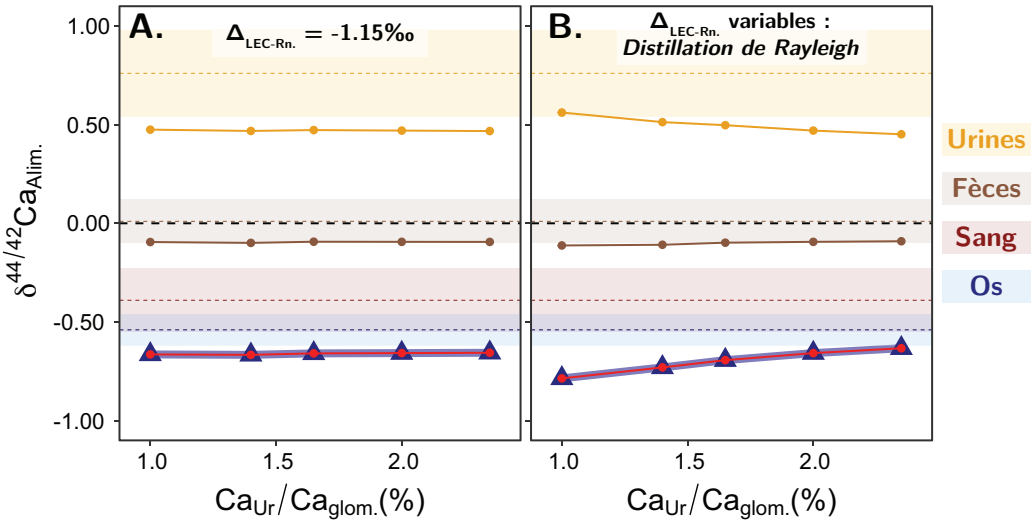

FIGURE 10.6 – **Compositions des modèles à l'état stationnaire pour des fractionnements à la réabsorption rénale constants (A.) et régis par une distillation de Rayleigh (B.) en fonction des rapports de Ca urinaire ($Ca_{Ur.}$) sur le Ca filtré par le glomérule ($Ca_{glom.}$)** (Modèles de la série **S3.**, voir Tableau 10.2) **Steady state model isotope compositions for constant (A.) and Rayleigh type (B.) renal fractionation as function of ratio of urinary Ca ($Ca_{Ur.}$) sur le Ca filtré par le glomérule ($Ca_{glom.}$)** (Models of the **S3.** series, see Table 10.2)

tionnelles du Ca des urines primaires pourrait donc participer à la variabilité des compositions isotopiques de l'organisme au sein d'une population.

Cependant, la considération d'une distillation de Rayleigh ne semble pas remettre en cause le fait que les simulations prédisent que le fractionnement rénal détermine totalement ou majoritairement l'appauvrissement de l'os en isotopes lourds.

2 Effets de la variabilité des cycles du Ca

Afin d'estimer la robustesse de la prédiction d'une rétroaction aussi marquée du fractionnement rénal sur le reste de l'organisme, des simulations ont été réalisées pour des cycles variés du Ca de l'organisme (Modèles des séries **S1.**, **S2.**, **S3.** et **S4.**, voir Tableau 10.2). Les résultats de ces simulations sont présentés en Figure 10.7.

On constate que les séries **S1.** et **S2.** suggèrent des variations des compositions isotopiques pour des Ca_{Ur}/Ca_{Endo} variables (séries de modèles **S1.** et **S4.**), comme il a été montré plus haut (Figure 10.5). Contrairement aux modèles de la série **S1.**, ceux de la série **S4.** impliquent des apports alimentaires variables (entre 600 et 1400 mg.j^{-1}), des pertes digestives constantes et des absorptions intestinales proportionnelles aux apports alimentaires. Cependant l'influence des rapports Ca_{Ur}/Ca_{Endo} est identique à celui observé pour la série **S1.**. De faibles pertes urinaires relativement aux pertes digestives tendraient à enrichir l'organisme en isotopes lourds. Les cycles moyens du Ca chez l'humain sont caractérisés par des pertes digestives et urinaires d'intensités comparables, ce qui indiquerait que les simulations prédisent des compositions des

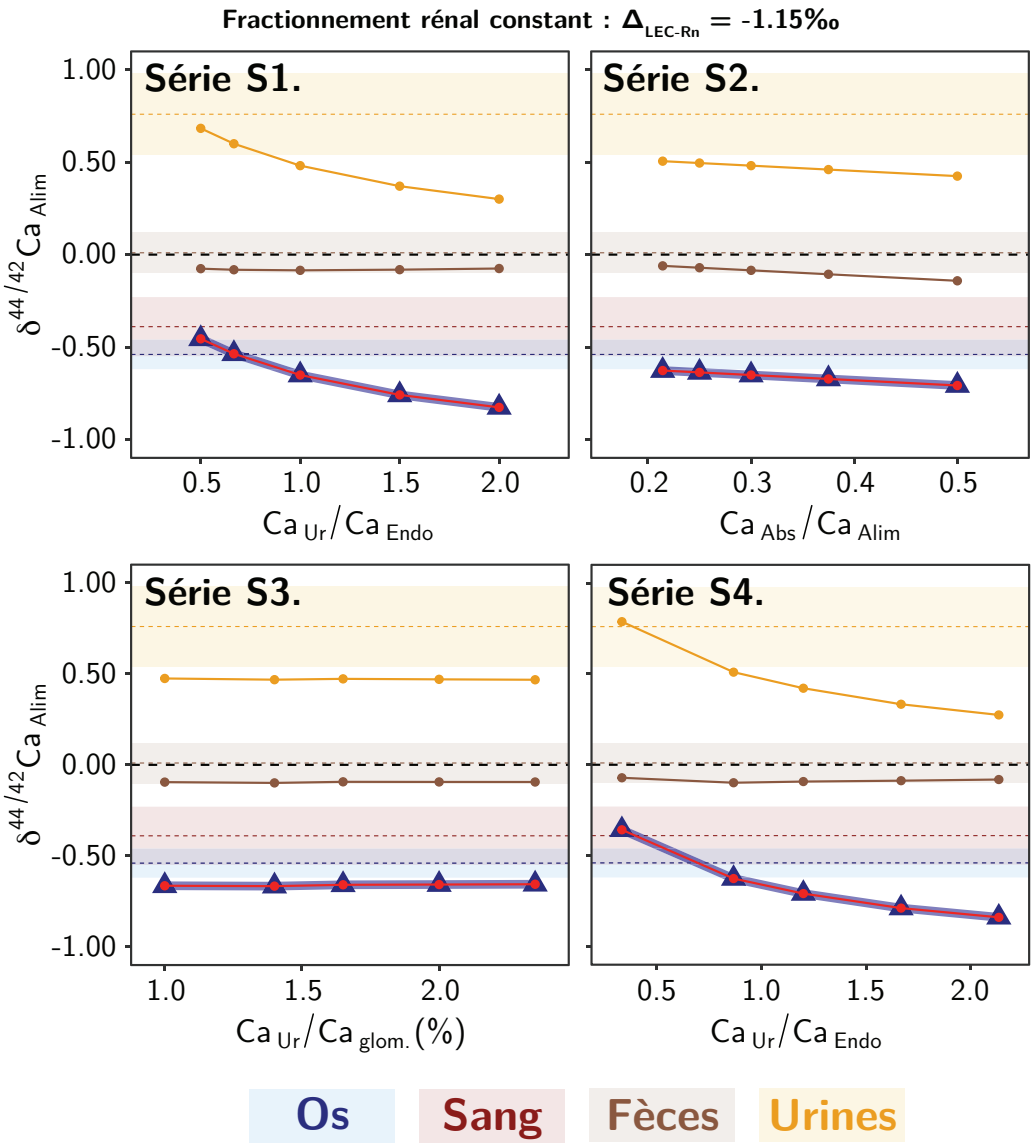

FIGURE 10.7 – **Compositions des modèles à l'état stationnaire pour des fractionnements à la réabsorption rénale constants selon les modèles de flux élémentaires S1., S2., S3. et S4. (voir Tableau 10.2).** Steady state model isotope compositions for constant renal reabsorption isotope fractionation under Ca cycling models S1., S2., S3. and S4. (see Table 10.2).

réservoirs encore trop appauvris relativement aux observations.

La série **S2.** décrit des apports alimentaires variables et des absorptions constantes en valeurs absolues. Les proportions de Ca absorbé sont donc variables pour des pertes urinaires et digestives équilibrées et constantes. Les simulations semblent indiquer une légère augmentation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des réservoirs pour des proportions de Ca absorbé décroissantes. Les faibles proportions de Ca absorbées sont en fait dues ici aux apports importants de Ca alimentaire pour une absorption constante. L'augmentation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ peut être mise sur le compte d'une proportion de Ca endogène réabsorbée qui décroît à mesure que la quantité du Ca alimentaire du chyme augmente. Ceci semble logique car le Ca endogène de ces simulations présente les mêmes compositions que le Ca du LEC (il n'y a pas de fractionnement à

la sécrétion vers le tube digestif) et la réabsorption de Ca appauvri en isotopes lourds réduit la proportion de Ca léger perdu par l'organisme. En d'autres termes, la perte de Ca léger du LEC par les sécrétions digestives devrait participer à l'enrichissement du reste de l'organisme en isotopes lourds ; ce qui est limité par la réabsorption d'une partie du Ca endogène. En somme, cet effet ne semble pas être marqué dans ces conditions et ne permet probablement pas d'expliquer des valeurs significativement plus proches des domaines des compositions observées chez les mammifères.

La série **S3.** correspond à des apports alimentaires variables, des quantités de Ca absorbées qui leurs sont proportionnelles et des pertes digestives et urinaires égales entre elles mais qui compensent l'absorption. Aucune variation ne semble être observable. Cette série de modèle ne semble pas pouvoir expliquer des distributions plus proches des domaines de compositions observées.

En conclusion, malgré les différentes configurations de flux explorées, l'effet du fractionnement rénal est tel qu'il explique un appauvrissement très marqué en isotopes lourds de l'os et du LEC, au-delà des valeurs observées. Il sera nécessaire à l'avenir de poursuivre les explorations des configurations de flux mais ce résultat semble résister aux variabilités des cycles élémentaires du Ca.

3 Effets de possibles fractionnements à la sécrétion des fluides digestifs

Les observations décritent dans le chapitre précédent suggèrent que les sécrétions digestives pourraient être associées à des fractionnements des isotopes du Ca, conduisant à un appauvrissement en isotopes lourds de l'ordre de -0.30 ‰ depuis le LEC vers les sécrétions. Cette hypothèse a été testée en réalisant les mêmes simulations que précédemment auxquelles ont été ajouté un fractionnement α_{TD-LEC} égal à 0.9997 (Δ_{TD-LEC} = -0.30 ‰). Les résultats de ces simulations sont donnés en Figure 10.8.

L'ajout d'un fractionnement associé aux sécrétions digestives de -0.30 ‰ décale l'ensemble des simulations vers des valeurs enrichies en isotope lourds de l'ordre de +0.10 ‰. Ainsi, les effets de ces fractionnements à la sécrétion des fluides digestifs pourraient expliquer un enrichissement en isotopes lourds du Ca de l'ensemble des boîtes, ce qui rend les simulations compatibles avec les observations. En considérant par exemple des rapports Ca_{Ur}/Ca_{Endo} proches de 1, les compositions isotopiques des urines, des fèces et des os se trouvent dans la gamme de compositions observées.

En l'absence de fractionnement à la minéralisation, l'os et le sang (ou LEC ici) sont de compositions isotopiques identiques, ce qui n'est pas exclu par les observations. Comme il a été montré précédemment, l'existence d'un fractionnement à la minéralisation d'une amplitude donnée abaisserait d'autant toutes les compositions de l'os, ce qui tendrait à l'éloigner des domaines des valeurs observées. Ainsi l'accomodation d'un fractionnement à la minéralisation dans ce modèle nécessiterait de trouver des mécanismes expliquant un enrichissement des compositions isotopiques du Ca utilisé pour former l'os (le Ca du LEC), ce qui paraît difficile au delà de 0.10 à 0.20 ‰ au regard des données disponibles et de l'effet majeur du fractionnement

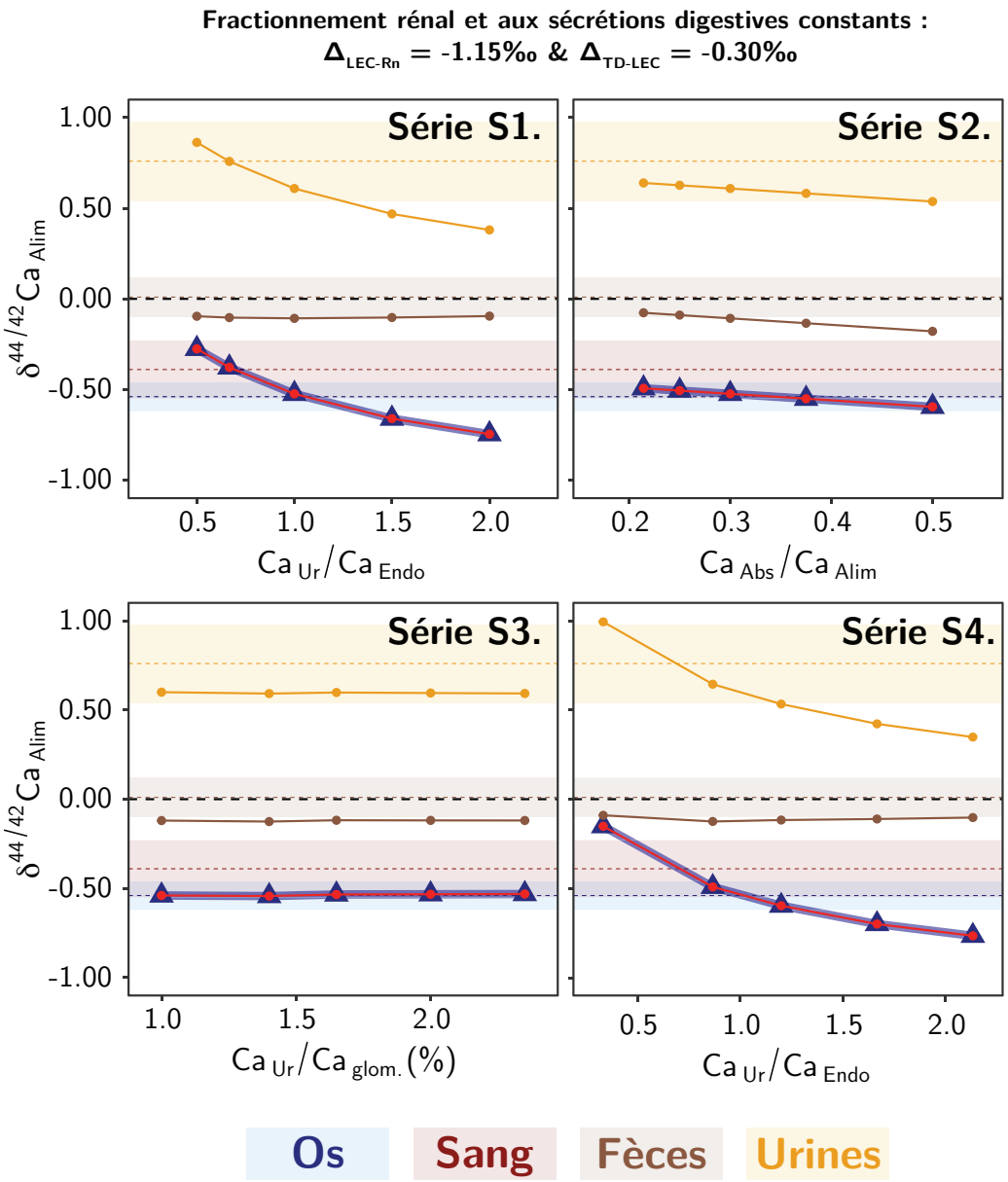

FIGURE 10.8 – **Compositions des modèles à l'état stationnaire pour des fractionnements à la réabsorption rénale et à l'excrétion des sécrétions digestives constants, selon les modèles de flux élémentaires S1., S2., S3. et S4. (voir Tableau 10.2).** Steady state model isotope compositions for constant renal reabsorption isotope fractionation and digestive secretion fractionation under Ca cycling models S1., S2., S3. and S4. (see Table 10.2).

rénal.

En conclusion, les simulations démontrent que le fractionnement rénal exerce une rétroaction très significative sur le reste de l'organisme, qui provoque l'appauvrissement du LEC et de l'os en isotopes lourds, avec une baisse de l'ordre de -0.65 ‰ des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ relativement à l'alimentation, pour des cycles de Ca moyens (*e.g.* Modèle 3 de la série S1., voir Tableau 10.2). Les effets de ce fractionnement à la réabsorption rénale pourraient être compensés par des fractionnements lors des sécrétions des fluides digestifs. Ceci pourrait expliquer la totalité des distributions des isotopes du Ca à travers les principaux

réservoirs de l'organisme. La conclusion associée est qu'il est peu probable que des fractionnements à la minéralisation significatifs ne déterminent la composition en isotopes du Ca l'os.

Naturellement, les fractionnements à la sécrétion des fluides digestifs sont encore peu décrits et nécessiteraient des explorations plus systématiques. Il est possible qu'ils soient plus ou moins intenses. Il est également possible que le Ca endogène ne soit pas réabsorbé avec la même efficacité que le Ca alimentaire. Ainsi, par exemple le Ca endogène pourrait être plus disponible que le Ca alimentaire, et sa réabsorption favoriserait l'appauvrissement en isotopes lourds des réservoirs de l'organisme. A l'inverse, une biodisponibilité inférieure à celle du Ca alimentaire favoriserait sa sortie par les matières fécales et participerait à l'enrichissement des réservoirs de l'organisme en isotopes lourds.

Enfin, il est possible que des fractionnements à l'absorption intestinale existent, bien qu'il n'aient pas encore été mis en évidence. Si, à l'instar d'autres transports transépithéliaux, l'absorption intestinale du Ca favorisait le transport des isotopes légers, cela aurait pour effet d'appauvrir encore les réservoirs de l'organisme en isotopes lourds. Ceci tendrait à éloigner les compositions isotopiques des réservoirs des domaines des observations. Si un tel fractionnement est avéré, il pourrait donc contrebalancer les effets des fractionnements à la sécrétion des fluides digestifs. Il sera donc nécessaire d'en estimer l'importance à l'avenir.

D Comment expliquer les dérives des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ sanguins et urinaires lors de la perte osseuse induite ?

Ces résultats soulèvent cependant une question. Dans l'hypothèse où aucun fractionnement significatif à la minéralisation ne détermine les compositions isotopiques de l'os, comment expliquer que les pertes osseuses induites chez l'humain lors d'expériences d'alitement se traduisent par des baisses des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ des urines et du sang de l'ordre de -0.20 à -0.30 ‰ (Skulan *et al.* 2007, Morgan *et al.* 2012a, Channon *et al.* 2015) ?

Les expériences d'alitement peuvent conduire à la perte de l'ordre de 1 % de la masse osseuse en 90 jours d'après les mesures de densité minérale osseuse (Smith *et al.* 2002; 2005, Shackelford *et al.* 2004, Whedon et Rambaut 2006, Spector *et al.* 2009), ce qui correspond à une moyenne de Ca perdu de 100 à 150 mg.j^{-1}. L'excrétion urinaire de Ca augmente conjointement de 50 à plus de 150 mg.j^{-1} (*e.g.* Whedon et Rambaut 2006, Morgan *et al.* 2012b).

A titre exploratoire, la réponse de plusieurs modèles à l'augmentation de l'excrétion urinaire a été testée avec un fractionnement rénal constant ou suivant une loi de distillation de Rayleigh et avec soit *i)* aucun autre fractionnement, *ii)* un fractionnement à la sécrétion des fluides digestifs ou *iii)* un fractionnement à la minéralisation de -0.10 ‰. Les conditions initiales ont été fixées par les compositions isotopiques de l'état stationnaire pour le modèle de flux **S1.3.** (voire Tableau 10.2). Les simulations ont ensuite consisté à déséquilibrer les flux osseux de sorte que la perte de Ca osseux atteigne 50, 100 ou 150 mg.j^{-1} et que ce déséquilibre soit évacué par l'augmentation de l'excrétion urinaire. Les résultats sont donnés en Figures 10.9 pour 50 mg.j^{-1} de Ca osseux perdu, 10.10 pour 50 mg.j^{-1} et 10.11 pour 50 mg.j^{-1}.

A travers ces simulations, on constate que l'augmentation de l'excrétion urinaire à elle seule (Figures 10.9.A., 10.10.A. et 10.11.A.) peut expliquer des baisses de $\delta^{44/42}Ca$ des urines et du sang. L'amplitude de la diminution des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ augmente avec la quantité de Ca excrété et dériverait de -0.07, -0.13 et -0.19 ‰ pour 50, 100 et 150 mg.j^{-1} de Ca osseux excrété respectivement, en plus des 150 mg.j^{-1} de l'état stationnaire. On remarque par ailleurs que des fractionnements suivant une loi de distillation de Rayleigh provoqueraient des dérives des compositions isotopiques accentuées pour les urines, et atténuées pour le LEC.

L'existence d'un fractionnement à la sécrétion du Ca endogène dans le tube digestif ne changerait apparemment pas cette observation, bien qu'il faudrait explorer la possibilité de pertes fécales accrues en cas de perte osseuse.

Enfin, l'existence d'un fractionnement à la minéralisation de -0.10 ‰, pouvant être accommodé dans le modèle à l'état stationnaire, ne semble pas affecter fortement l'amplitude de la dérive des urines dans le cas de fractionnements constants, mais justifierait de dérives plus marquées que pour les deux autres modèles dans le cas d'un fractionnement rénal suivant une loi de distillation de Rayleigh.

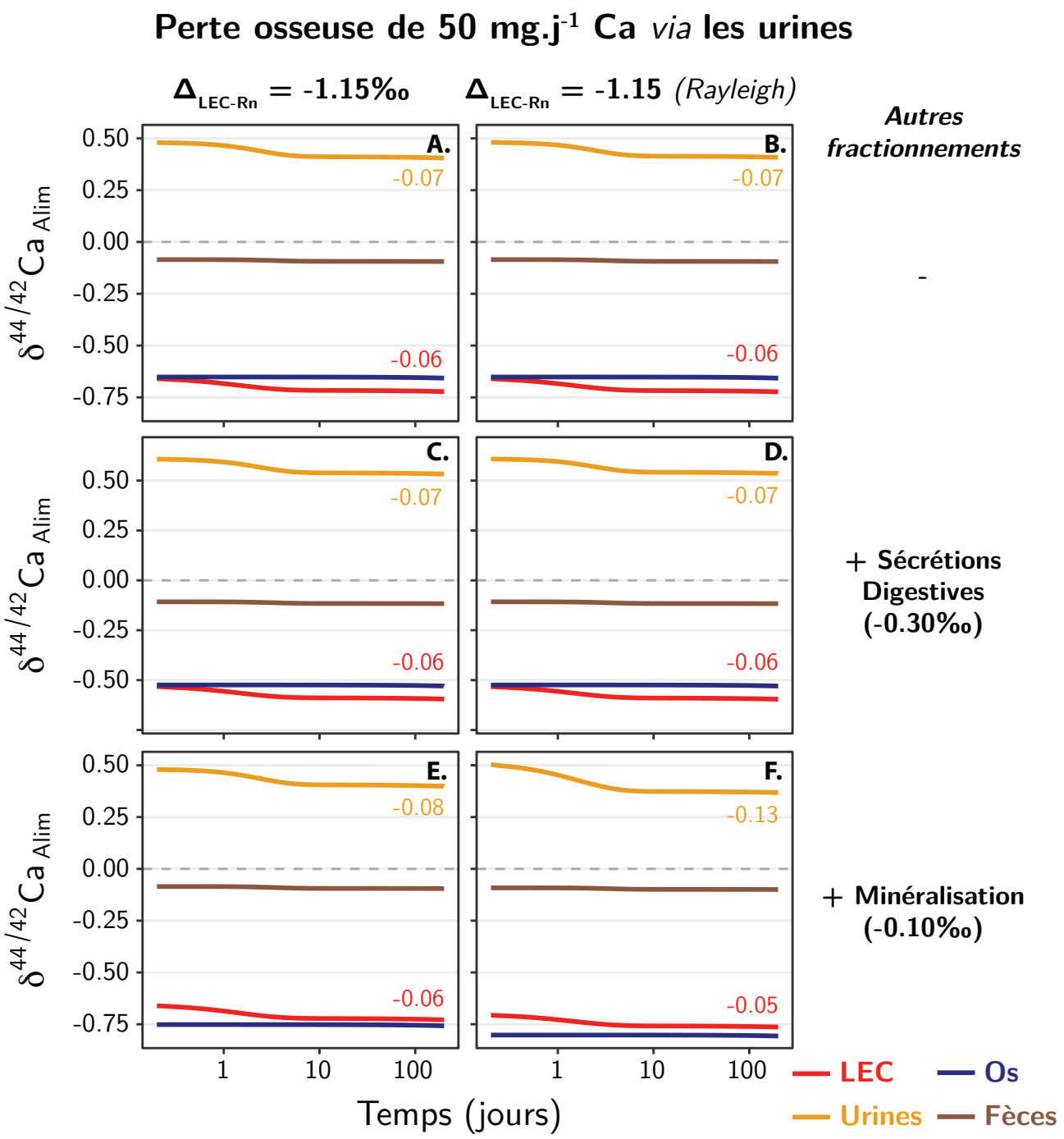

FIGURE 10.9 – **Evolution des compositions des principales boîtes pour une perte osseuse de 50 mg.j^{-1} évacuée par l'excrétion urinaire** (Dérivé de la perturbation du modèle **S1.3.**, voir Tableau 10.2). Les valeurs indiquées correspondent à la dérive depuis l'état initial jusqu'au 30ème jour, pour les urines en **jaune** et le LEC en **rouge**. **Evolution of compositions of main boxes for bone loss of 50 mg.d^{-1} *via* urinary Ca** (Derived from perturbation of model **S1.3.**, see Table 10.2) Values indicated on graphs are drifts from initial state to day 30, for urines in **yellow** and extracellular fluids in **red**.

Le fait que les urines et le LEC aient des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ qui baissent dans le cas d'une perte accrue de Ca urinaire peut être expliqué par l'augmentation des pertes de Ca enrichi en isotopes lourds.

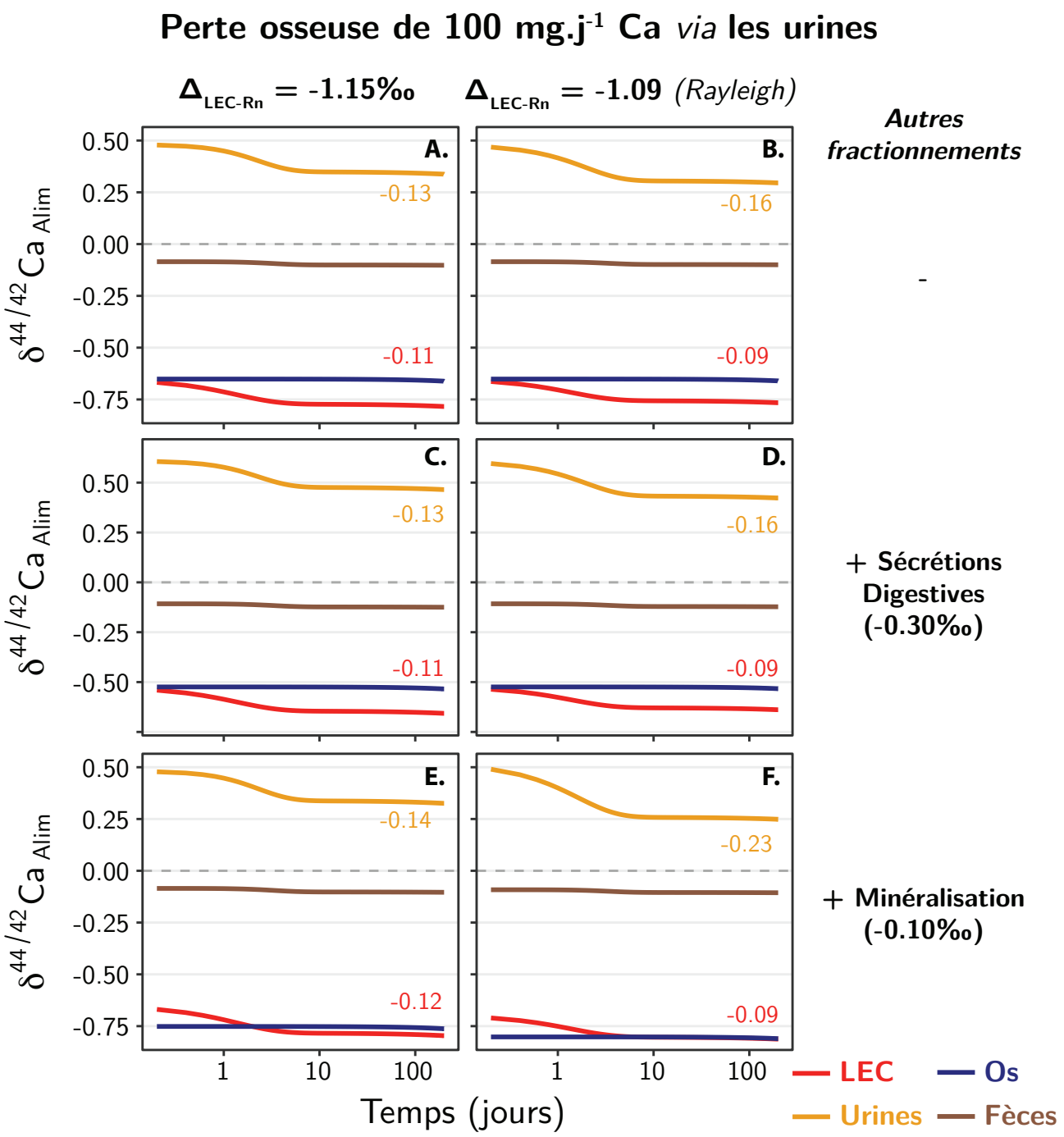

FIGURE 10.10 – **Evolution des compositions des principales boîtes pour une perte osseuse de 100 mg.j^{-1} évacuée par l'excrétion urinaire** (Dérivé de la perturbation du modèle **S1.3.**, voir Tableau 10.2). Les valeurs indiquées correspondent à la dérive depuis l'état initial jusqu'au 30ème jour, pour les urines en **jaune** et le LEC en **rouge**. **Evolution of compositions of main boxes for bone loss of 100 mg.d^{-1} *via* urinary Ca** (Derived from perturbation of model **S1.3.**, see Table 10.2) Values indicated on graphs are drifts from initial state to day 30, for urines in **yellow** and extracellular fluids in **red**.

Ceci a pour effet d'appauvrir rapidement en isotopes lourds le réservoir du LEC qui fournit à son tour un Ca appauvri en isotopes lourds pour l'excrétion urinaire.

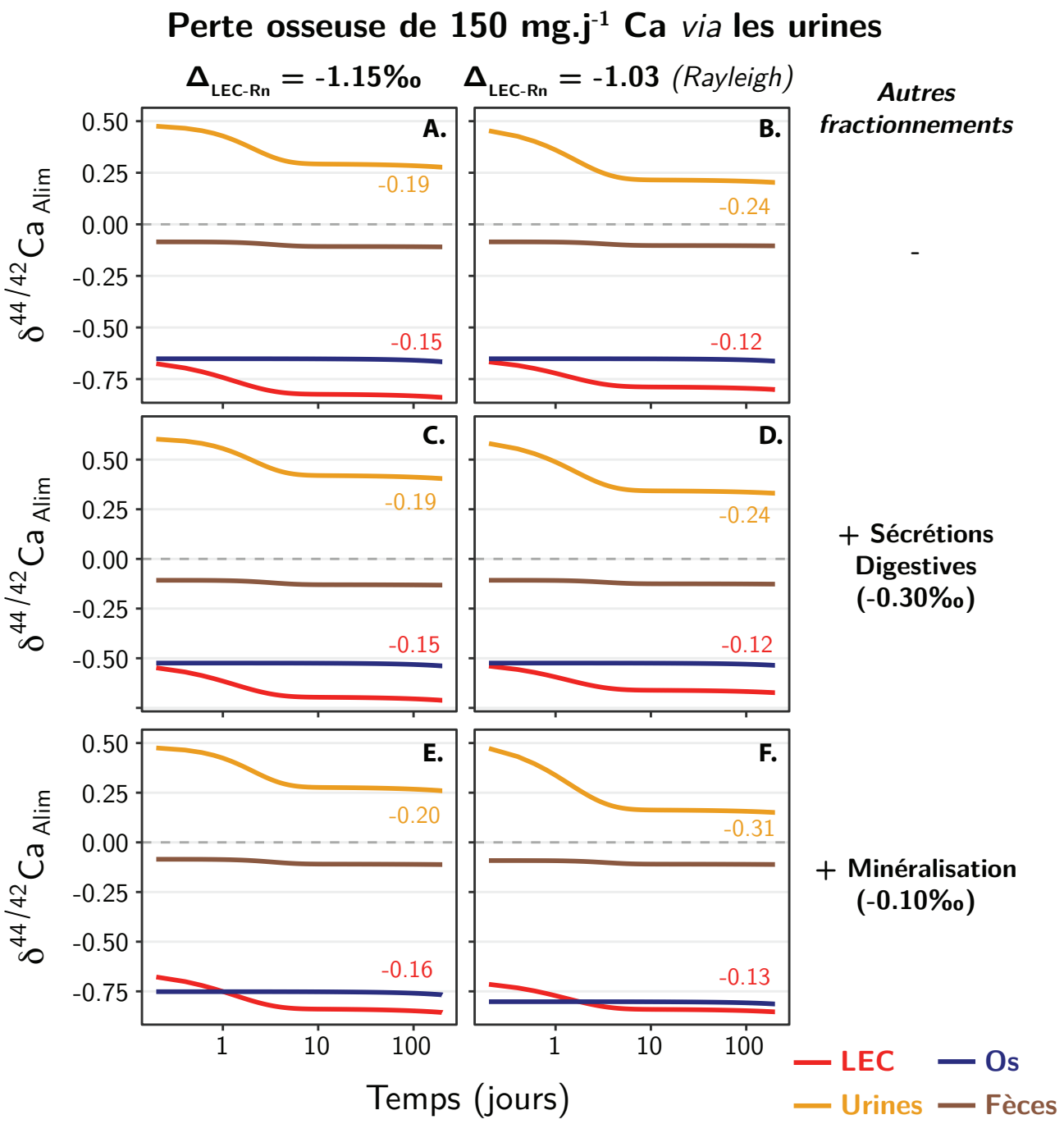

FIGURE 10.11 – **Evolution des compositions des principales boîtes pour une perte osseuse de 150 mg.j^{-1} évacuée par l'excrétion urinaire** (Dérivé de la perturbation du modèle **S1.3.**, voir Tableau 10.2). Les valeurs indiquées correspondent à la dérive depuis l'état initial jusqu'au 30ème jour, pour les urines en **jaune** et le LEC en **rouge**. **Evolution of compositions of main boxes for bone loss of 510 mg.d^{-1} *via* urinary Ca** (Derived from perturbation of model **S1.3.**, see Table 10.2) Values indicated on graphs are drifts from initial state to day 30, for urines in **yellow** and extracellular fluids in **red**.

Ces résultats sont donc compatibles avec les observations de baisses de valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ du sang et des urines au cours des expériences d'alitement. Il est possible qu'un fractionnement à la minéralisation participe à cette dérive, mais l'augmentation de l'excrétion urinaire en explique une partie importante.

Ceci remet donc en question la possibilité du suivi des pertes osseuses par les dérives des compositions isotopiques des urines et du sang, puisque ces dérives seraient déterminées en partie ou totalement par la quantité de Ca excrété qui peut être estimée par la simple mesure de la calciurie des urines de 24 h. Malheureusement, jusqu'ici les données d'expériences d'alitement de $\delta^{44/42}Ca$ dans les urines ne sont pas publiées conjointement au Ca urinaire, ce qui ne permet pas de tester cette hypothèse.

Conclusion de la Partie III

L'étude des compositions en isotopes du Ca des réservoirs et excrétions de Ca des mammifères sains a permis de dégager un modèle conceptuel à jour, intégrant les relations entre l'alimentation et les tissus et organes des mammifères que sont le sang, les os, les tissus mous mais aussi entre le sang et les excrétions de Ca, par les glandes digestives, mammaires ou les urines.

Des mécanismes de fractionnements ont été discutés. Il est probable que les transports transpithéliaux du Ca induisent des fractionnements isotopiques de l'ordre de -0.30 ‰, en faveur des isotopes légers du Ca. Le fractionnement rénal est décrit et pourrait être expliqué par une distillation de Rayleigh, provoquée par la réabsorption fractionnelle de Ca à travers l'épithélium du néphron. Les observations ne permettent pas de conclure quant à l'existence ou non d'un fractionnement à la minéralisation, mais celui-ci ne semble pas pouvoir être supérieur à -0.30 ‰, depuis le sang vers l'os.

Un modèle mathématique de boîte est développé à partir du programme informatique *Isopybox* conçu préalablement et ayant pour vocation d'être maniable et utilisable sans maîtrise spécifique de la programmation informatique.

Le modèle de boîte présenté dans le chapitre 10 est le premier modèle de mammifère pour l'étude du cycle des isotopes du Ca à l'état stationnaire. Les simulations montrent que les compositions isotopiques du Ca de l'organisme sont déterminées au premier ordre par la fonction rénale. Les compositions isotopiques appauvries de l'os relativement à l'alimentation peuvent être entièrement expliquées par l'existence d'un fractionnement à la réabsorption rénale. Le rein exerce une rétroaction sur les compositions isotopiques du reste de l'organisme, pouvant expliquer une baisse des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de -0.65 ‰ relativement à l'alimentation. Cette amplitude est du même ordre de grandeur que la différence observée entre le Ca osseux et le Ca alimentaire chez les mammifères (-0.54 $\pm$ 0.08 ‰). Le fractionnement à la minéralisation, considéré jusqu'ici comme la cause principale sinon unique des compositions de l'os appauvries en isotopes lourds, est remis en question. Son amplitude ne peut pas être supérieure à -0.30 voire -0.20 ‰ depuis le sang jusqu'à l'os. Les simulations ainsi que les observations chez les mammifères laissent penser que celui-ci est compris entre 0 et -0.10 ‰.

D'autres fractionnements isotopiques du Ca au cours de son transport vers l'intérieur ou l'extérieur de l'organisme pourraient participer, au second ordre, à la détermination des compositions isotopiques des réservoirs de l'organisme. Les fractionnements possibles au cours de la sécrétion de Ca par les glandes digestives pourraient atténuer l'amplitude de -0.65 ‰ expliquée par le rein, en augmentant les compositions de l'organisme de l'ordre de +0.10 ‰.

Combinés, les fractionnements dûs à la fonction rénale et aux sécrétions digestives constituent la vision la plus parcimonieuse pour expliquer la distribution des isotopes du Ca dans l'organisme.

Il sera nécessaire à l'avenir d'explorer plus systématiquement les causes secondaires possibles de la redistribution des isotopes du Ca à travers les différents réservoirs, en adaptant le modèle présenté ici et en complétant les observations par l'étude systématiques des flux et des compositions des organismes à l'état stationnaire. Il sera également possible d'explorer la dynamique de ce système en testant l'espace des paramètres du modèle et en comparant ses prédictions avec des observations d'expériences contrôlées.

Il sera alors possible d'étudier des systèmes à l'état stationnaire ou non, perturbés par exemple par des situations physiologiques changeantes ou particulières (grossesse, allaitement, croissance, vieillissement, changements de régime alimentaire), des maladies affectant l'homéostasie calcique ou encore des physiologies animales caractérisées par des homéostasies particulières (fonction rénale variable, milieu hypo-hypertonique, *etc.*).

Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse avaient pour but d'explorer la variabilité des compositions isotopiques du Ca chez les mammifères depuis la population jusqu'à l'organisme et de dégager les principaux mécanismes responsables des distributions des isotopes du Ca à travers les tissus qui le composent.

Dans un premier temps, une méthode a été développée pour l'analyse des compositions isotopiques du Ca des fluides ainsi que des tissus mous et minéralisés des mammifères par spectrométrie de masse à torche plasma et multi-collection. Cette méthode permet la mesure juste et précise des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de matériaux biologiques de compositions chimiques diverses, et présentant notamment des teneurs en éléments alcalins très supérieures à celles en Ca.

L'analyse de plusieurs standards de référence ou secondaires a permis de : *i)* d'évaluer la précision et la justesse des mesures de $\delta^{44/42}Ca$ atteintes grâce au protocole développé ; *ii)* proposer la poursuite de l'utilisation d'un standard de tissus minéralisés (SRM1486) et l'adoption d'un second (SRM1400) pour les analyses en solution ; *iii)* de développer la systématisation des conversions des données produites et de la littérature suite à la construction d'une base de donnée étendue, permettant la comparaison des compositions isotopiques de la littérature aux données produites.

Deux méthodes d'analyse pour l'amélioration de la résolution spatiale des mesures de $\delta^{44/42}Ca$ de tissus minéralisés ont été comparées. Une méthode de mesure des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ par ablation laser dans l'émail dentaire a été développée et démontre la possibilité de réaliser des suivis de variations de la composition isotopique dans ce tissu à des résolutions spatiales de l'ordre de 300-500 μm. Cette méthode de mesure est cependant intrinsèquement moins précise que l'autre technique évaluée : le microéchantillonnage d'émail par microfraisage dont la résolution spatiale est comparable. Cette deuxième méthode a été préférée pour la suite de ces travaux.

Dans un second temps, trois études d'écosystèmes actuels et anciens ont permis de confirmer que les compositions isotopiques du Ca comportent des informations relatives à la position trophique des espèces animales. Ceci confirme que les sources alimentaires participent à la détermination des compositions isotopique de l'organisme. Cependant des variabilités secondaires demeurent pour les mammifères et celles-ci pourraient être mises sur le compte de leur physiologie.

Une estimation de la composition isotopique moyenne de l'alimentation humaine est proposée. Un modèle de mélange permet de mettre en avant la variabilité des compositions isotopiques de celle-ci, qui participe probablement à la diversité des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ observée au sein de groupes humains pris un à un. Il est montré que la consommation plus ou moins prononcée de produits laitiers peut expliquer des variations de $\delta^{44/42}Ca$ de plus de 0.50 ‰.

Il est également démontré que les transitions nutritionnelles précoces que sont la naissance et l'arrêt de la consommation de lait maternel chez le nourrisson induisent des augmentations systématiques des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de l'ordre de $+$0.30 à $+$0.50 ‰. Ces variations de compositions isotopiques donnent une indication de la durée de l'allaitement et ouvre des perspectives quant à la reconstruction des pratiques du sevrage chez les populations humaines passées et chez les hominines.

Dans un troisième temps, une étude des compositions isotopiques des réservoirs et des flux de Ca prépondérants dans l'homéostasie calcique chez les mammifères a été menée. A travers des observations réalisées chez l'humain ainsi que d'autres mammifères, il est confirmé que la fonction rénale induit un fractionnement majeur des isotopes du Ca entre le sang et les urines excrétées. Ce fractionnement a probablement lieu au cours de la réabsorption du Ca par le néphron.

L'étude de la relation entre la composition isotopique du sang et de l'os a permis de réviser l'hypothèse prévalant jusqu'alors. Le fractionnement à la minéralisation, depuis le Ca sanguin jusqu'au Ca de l'os, n'induit pas de baisse des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ de -0.65 ‰ mais des baisses de $\delta^{44/42}Ca$ d'amplitudes inférieures à -0.30 ‰ voire aucune modification de la composition isotopique du Ca sanguin. D'autre part, les données produites ainsi que les compositions isotopiques publiées dans la littérature suggèrent que les transports transépithéliaux du Ca induisent des fractionnements isotopiques de l'ordre de -0.30 ‰, en faveur des isotopes légers.

Enfin, une modélisation mathématique de l'organisme humain est proposée grâce au développement d'un programme informatique. Les simulations réalisées suggèrent fortement que la fonction rénale explique à elle seule une diminution des compositions isotopiques de l'organisme de l'ordre de -0.65 ‰, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que la différence observée entre l'alimentation et l'os. Autrement dit, le rein serait responsable au premier ordre de l'appauvrissement en isotopes lourds de l'organisme, remettant en cause de fait l'hypothèse d'un fractionnement à la minéralisation et les applications qui auraient pu en découler, comme le suivi de la perte osseuse. L'amélioration et l'utilisation de ce modèle pourrait ouvrir des perspectives pour l'étude des états stationnaires et transitoires vécus par les mammifères et l'humain en particulier.

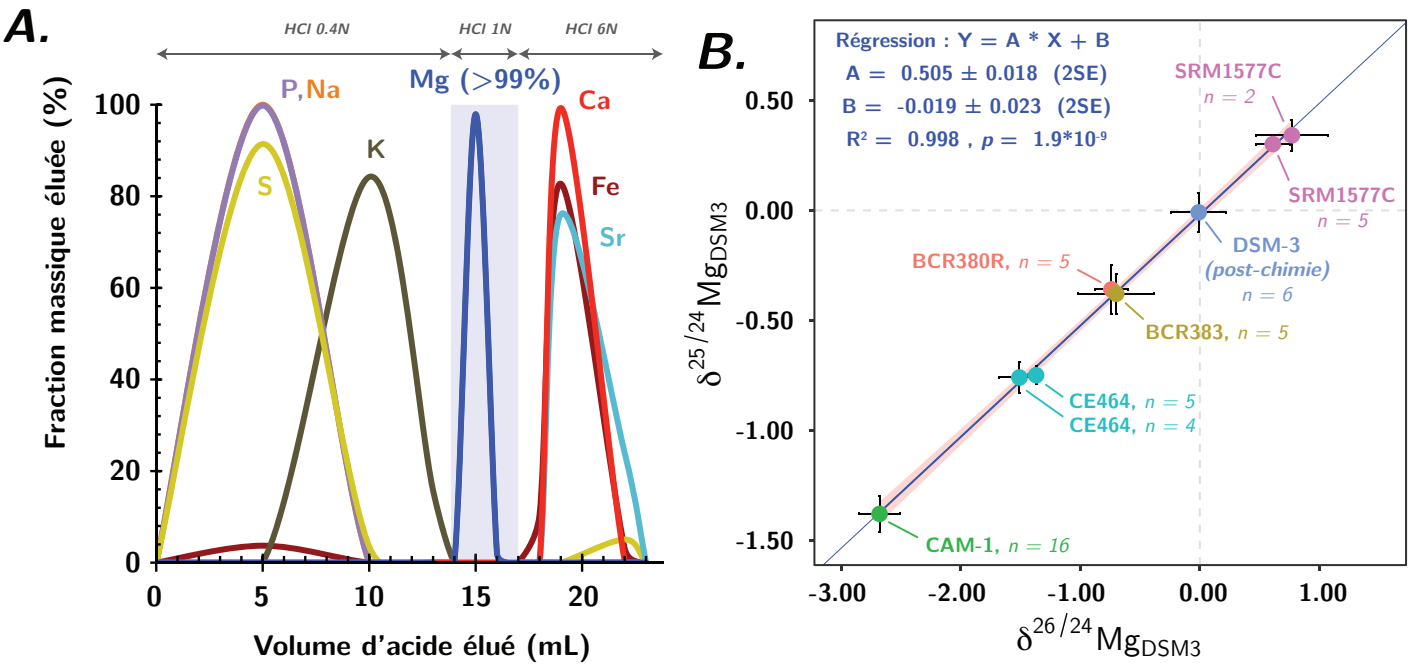

FIGURE 10.12 – **Résultats préliminaires du développement d'un protocole d'analyse des compositions isotopiques du Mg de tissus animaux par MC-ICP-MS. A. Profil d'élution** de la purification du Mg d'un standard d'os (SRM1486) sur résine échangeuse de cations. Cette étape peut être combinée au protocole de purification du Ca des échantillons biologiques (Tacail *et al.* 2014). **B. Diagramme à trois isotopes montrant la dépendance en masse des mesures dans des tissus biologiques** de $\delta^{26/24}Mg$ et de $\delta^{25/24}Mg$ (‰, rel. *DSM-3*) pour des standards minéraux et biologiques standards : DSM-3 après chimie (standard de référence), CAM-1 (standard secondaire dont la valeur publiée est d'environ -2.58 ± 0.14 ‰, 2SD d'après Galy *et al.* (2003)), SRM1577C (foie de bœuf standard), BCR383 (poudre standard de haricots verts), BCR380-R (standard de lait de vache en poudre), CE464 (poudre standard de thon). **Preliminary results for development of analytical procedure for measurement of Mg isotope compositions in animal tissues using MC-ICP-MS. A. Elution profile of Mg purification** in bone standard SRM1486, using cation exchange resin. This step might be combined with previously developped biological Ca purification protocole (Tacail *et al.* 2014). **B. Three isotopes diagram showing mass dependency of measurement in biological tissues** of $\delta^{26/24}Mg$ and $\delta^{25/24}Mg$ (‰, rel. to *DSM-3*) for mineral and biological standards : DSM-3 after chemical processing (reference standard), CAM-1 (secondary standard expected to lie around -2.58 ± 0.14 ‰ after Galy *et al.* (2003)), SRM1577C (bovine liver standard), BCR383 (green beans powder standard), BCR380-R (cow milk powder standard), CE464 (tuna fish powder standard).

Les avancées dans la compréhension des causes premières de variation des compositions isotopiques du Ca chez les mammifères permettront probablement de dégager de nouveaux axes de recherche en (paléo-)écologie et en biologie des mammifères.

Le développement d'un modèle de boîte adapté à la modélisation dynamique de l'organisme permettrait ainsi de prédire les évolutions d'organismes dont l'alimentation ou l'homéostasie calcique évoluent. La croissance, le vieillissement ou encore les périodes de grossesse ou d'allaitement pourraient être étudiés, tout comme des situations pathologiques affectant l'homéostasie calcique globale (maladies osseuses, rénales etc.). Néanmoins, il serait judicieux de poursuivre les explorations pour identifier les mécanismes responsables de variations intra- et interindividuelles, comme le vieillissement ou l'évolution pathologique de la fonction rénale. Les mécanismes moléculaires responsables des principaux fractionnements pourront également être étudiés, en comparant les transports transcellulaires et paracellulaires au niveau des épithéliums par exemple, ou encore en s'intéressant à l'influence de la chimie des urines ou du sang sur les fractionnements des isotopes du Ca.

Enfin, le développement de méthodes d'analyse permettant les mesures des rapports isotopiques d'autres éléments alcalins ou alcalino-terreux aux fonctions biologiques similaires ou complémentaires pourrait enrichir encore la compréhension des cycles de ces éléments et l'élaboration de nouveaux outils d'étude de la physiologie des organismes ou de leurs écologies.

Ainsi, l'étude du magnésium, dont les rapports d'isotopes stables ($\delta^{26/24}Mg$) sont affectés par l'alimentation et la physiologie des mammifères (Martin *et al.* 2014a;b), pourrait apporter une approche complémentaire à l'étude des isotopes du Ca en physiologie ou en écologie. Des travaux préliminaires réalisés en parallèle de cette thèse ont d'ailleurs abouti au développement d'une méthode d'analyse des compositions isotopiques du Mg des tissus biologiques, pour lesquels les premiers résultats sont prometteurs (Figure 10.12).

De la même manière, les isotopes stables du strontium ($\delta^{88/86}Sr$) sont affectés par la physiologie des mammifères (Knudson *et al.* 2010, Lewis *et al.* 2017) et l'étude des causes biologiques des variations de ces rapports pourrait permettre de dégager des applications complémentaires à celle des isotopes du Ca.

Enfin, le potassium est un élément essentiel pour l'organisme et il possède deux isotopes stables dont les rapports d'abondances ($^{41}K/^{39}K$) sont susceptibles d'être affectés par la physiologie de l'organisme également. Cependant, la mesure de ces rapports par MC-ICP-MS est rendue difficile par l'argon 40, de masse proche, et le développement de méthodes d'analyse de $\delta^{41/39}K$ sera tributaire des évolutions des technologies de spectrométrie de masse.

Annexes

Annexe A

Suppléments à l'article *A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples*

http://doi.org/10.1039/C3JA50337B

Annexe B

Suppléments au Chapitre 4

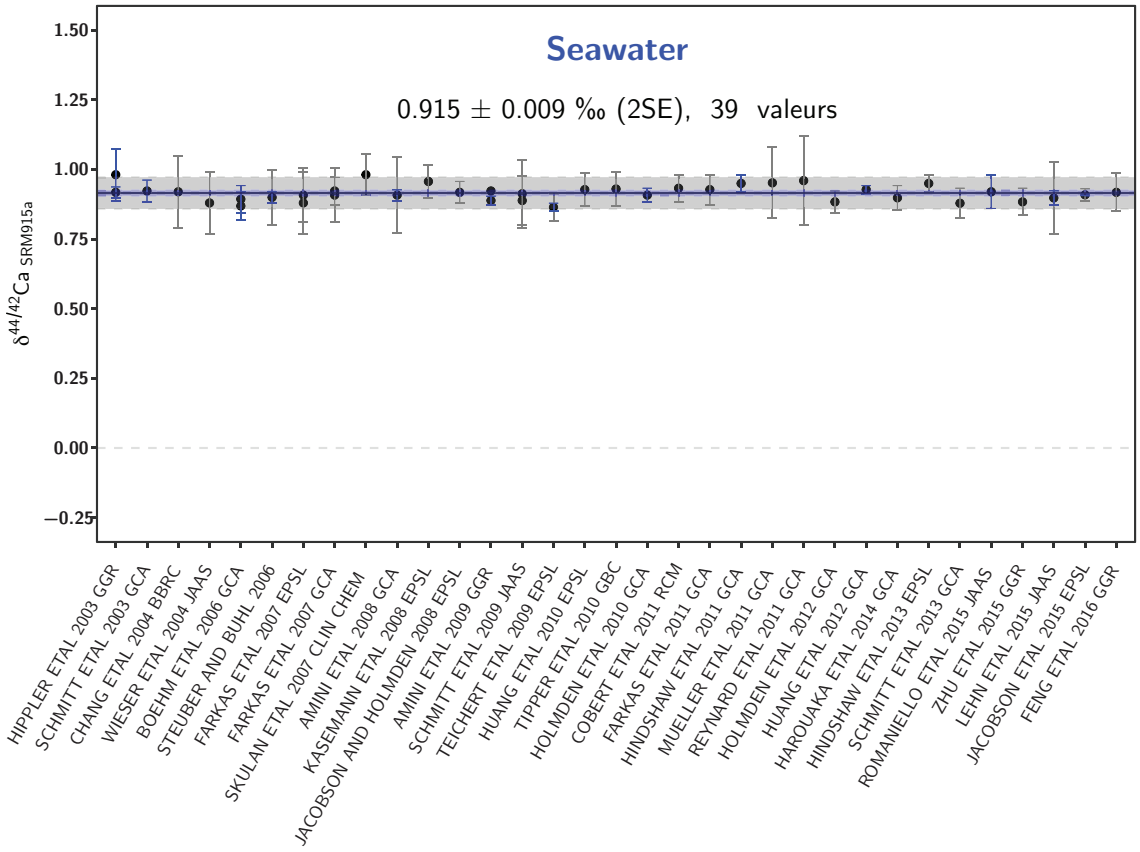

FIGURE B.1 – **Compilation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *SRM915a*) d'eau de mer (Seawater et Seawater IAPSO)**. Les barres d'erreurs noires et bleues sont les 2SD et 2SE respectivement, fournies dans l'article considéré. La droite noire est la moyenne des 39 valeurs, la zone grisée délimite le double de l'écart-type, la zone bleutée délimite l'intervalle de confiance à 95% donné par le t-test de Student.

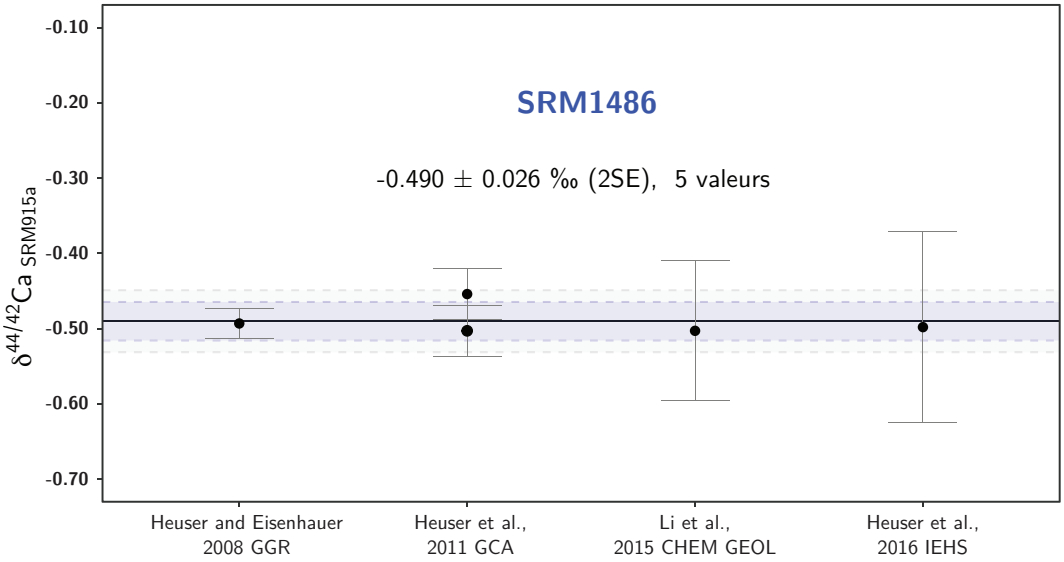

FIGURE B.2 – **Compilation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *SRM915a*) de SRM1486**. Les barres d'erreurs noires et bleues sont les 2SD et 2SE respectivement, fournies dans l'article considéré. La droite noire est la moyenne des 4 valeurs, la zone grisée délimite le double de l'écart-type, la zone bleutée délimite l'intervalle de confiance à 95% donné par le t-test de Student.

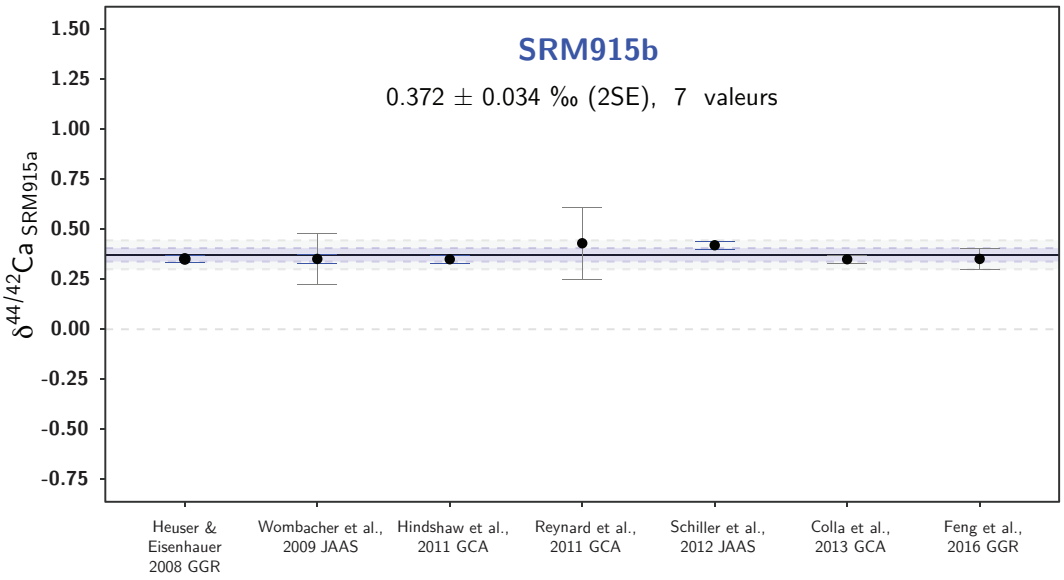

FIGURE B.3 – **Compilation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *SRM915a*) de SRM1486**. Les barres d'erreurs noires et bleues sont les 2SD et 2SE respectivement, fournies dans l'article considéré. La droite noire est la moyenne des 7 valeurs, la zone grisée délimite le double de l'écart-type, la zone bleutée délimite l'intervalle de confiance à 95% donné par le t-test de Student.

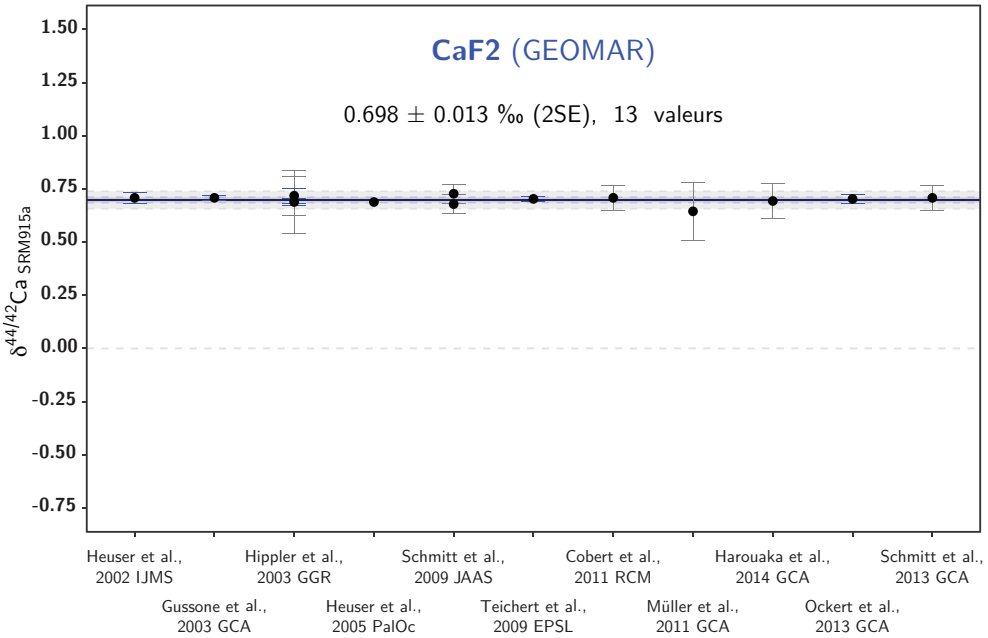

FIGURE B.4 – **Compilation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *SRM915a*) de CaF_2 (GEOMAR)**. Les barres d'erreurs noires et bleues sont les 2SD et 2SE respectivement, fournies dans l'article considéré. La droite noire est la moyenne des 13 valeurs, la zone grisée délimite le double de l'écart-type, la zone bleutée délimite l'intervalle de confiance à 95% donné par le t-test de Student.

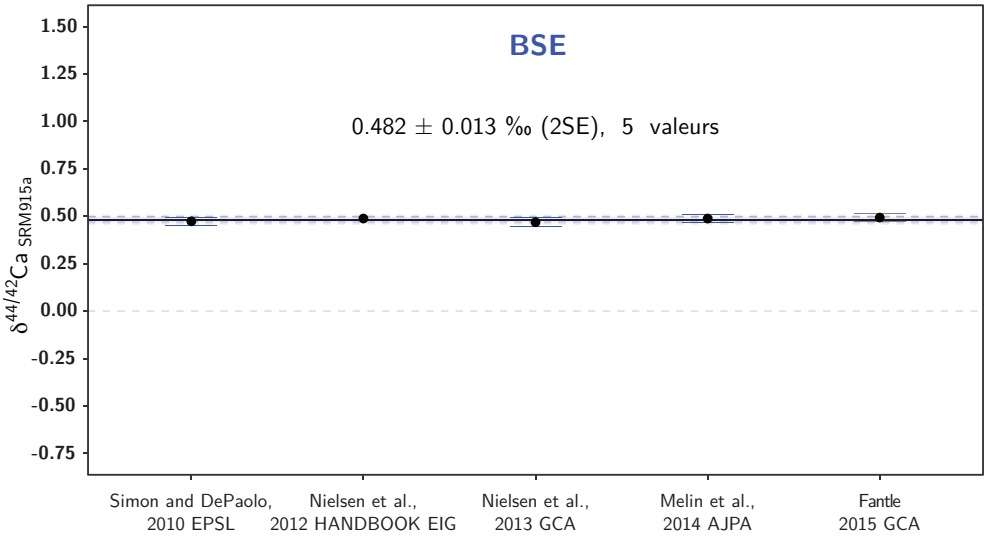

FIGURE B.5 – **Compilation des valeurs de $\delta^{44/42}Ca$ (‰, rel. *SRM915a*) de BSE**. Les barres d'erreurs noires et bleues sont les 2SD et 2SE respectivement, fournies dans l'article considéré. La droite noire est la moyenne des 5 valeurs, la zone grisée délimite le double de l'écart-type, la zone bleutée délimite l'intervalle de confiance à 95% donné par le t-test de Student.

Annexe C

Article

Spatial distribution of trace element Ca-normalized ratios in primary and permanent human tooth enamel

DOI : 10.1016/j.scitotenv.2017.06.021

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/s0048969717314250

Annexe D

Suppléments à l'article

Precise analysis of calcium stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MCICPMS

https://doi.org/10.1039/C5JA00239G

Annexe E

Article

Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs

DOI : 10.1016/j.chemgeo.2015.09.011

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/s0009254115300322

Annexe F

Article

Calcium Isotopic Evidence for Vulnerable Marine Ecosystem Structure Prior to the K/Pg Extinction

DOI : 10.1016/j.cub.2017.04.043

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/s0960982217304876

Annexe G

Article

Non-traditional isotope perspectives in vertebrate palaeobiology

http://doi.org/10.1111/pala.12300

Annexe H

Figure S4 de l'article

Assessing Human Weaning Practices using Calcium isotopes in tooth enamel

http://doi.org/10.1073/pnas.1704412114

Annexe I

Suppléments au Chapitre 9

Tableau I.1 – **Description et compositions isotopiques (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) des échantillons de rats élevés en conditions contrôlées.** Les urines sont des collectes de 24h en cages métaboliques la veille de la collecte du sang et de l'os. **Description and isotope compositions (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) of samples from rats kept in controled conditions.** Urines are 24h collection, the day before blood and bone sampling.

				Os				Sang				Urine			
Année	**Individu**	**Âge**	**Sexe**	**Type**	$\delta^{44/42}$**Ca**	± **2SD**	**n**	**Type**	$\delta^{44/42}$**Ca**	± **2SD**	**n**	**Urine**	$\delta^{44/42}$**Ca**	± **2SD**	**n**
2014	1	15-16 sem.	M	Fémur	-0.97	0.25	3	Plasma	-0.87	0.10	3	Urine 24h	0.44	0.13	3
	2	15-16 sem.	M	Fémur	-1.04	0.24	3	Plasma	-0.87	0.29	3	Urine 24h	0.12	-	1
	3	15-16 sem.	M	Fémur	-0.88	0.20	3	Plasma	-0.87	0.30	3	Urine 24h	0.24	0.09	2
	4	15-16 sem.	M	Fémur	-1.11	0.26	3	Plasma	-1.21	0.16	3	Urine 24h	0.05	0.04	3
2016	C1	15-16 sem.	M	Fémur	-0.82	0.15	3	Plasma	-0.81	0.32	3	-	-	-	-
	C2	15-16 sem.	M	Fémur	-0.74	0.04	3	Plasma	-0.94	0.09	2	-	-	-	-
	C3	15-16 sem.	M	Fémur	-0.82	0.17	3	Plasma	-0.60	0.23	3	Urine 24h	0.71	0.16	2
	C4	15-16 sem.	M	Fémur	-0.91	0.09	3	Plasma	-0.60	0.18	3	-	-	-	-
	C5	15-16 sem.	M	Fémur	-1.06	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C6	15-16 sem.	M	Fémur	-0.78	0.06	2	-	-	-	-	-	-	-	-
2017	CC1	15-16 sem.	M	Fémur	-0.77	0.15	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	CC2	15-16 sem.	M	Fémur	-1.04	-	1	-	-	-	-	Urine 24h	0.20	0.31	2
	CC3	15-16 sem.	M	Fémur	-0.71	0.12	2	-	-	-	-	Urine 24h	0.76	0.21	2

TABLEAU I.2 – **Description et compositions isotopiques (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) de l'ensemble des échantillons de sang, urines et autres de volontaires sains. Description and isotope compositions (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*)** of all blood, urines and other type samples from healthy volunteers. BMI : Body mass index (indice de masse corporelle)

					Sang					Urines				Autres					
Individu	**Sexe**	**Âge**	**BMI**	**Région**	**Type**	**Heure**	**Statut nutritionnel**	**$\delta^{44/42}$Ca ± 2SD**	**n**	**Période de collecte**	**$\delta^{44/42}$Ca ± 2SD**		**n**	**Substance**	**Heure**	**Statut nutritionnel**	**$\delta^{44/42}$Ca ± 2SD**		**n**
ES1	M	28	27.4	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.54	0.25	3	1 à 2 heures - miction unique	-0.34	0.18	3						
ES2	F	42	24.7	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.62	0.24	5	1 à 2 heures - miction unique	-0.04	-	1						
ES3	M	46	29.5	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.65	0.07	2										
ES4	M	46	27.2	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.33	0.09	4										
ES5	M	49	25.4	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.35	0.03	3	1 à 2 heures - miction unique	-0.39	0.06	3						
ES6	F	44	31.1	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.49	0.13	3	1 à 2 heures - miction unique	-0.42	0.01	2						
ES7	F	26	29.5	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.24	-	1										
ES8	F	38	27.4	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.34	0.16	3	1 à 2 heures - miction unique	0.26	0.00	2						
ES9	F	29	25.3	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.30	0.12	2	1 à 2 heures - miction unique	0.01	0.07	2						
ES10	M	25	29.8	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.71	0.02	3	1 à 2 heures - miction unique	-0.30	0.03	3						
ES11	F	22	30.1	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.52	0.12	3	1 à 2 heures - miction unique	0.15	0.03	2						
ES12	F	33	25.8	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.12	0.10	3										
ES13	M	25	27.5	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.76	0.05	4										
ES14	M	43	25.7	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 7 et 9h	jeûne de 12h depuis la veille	-1.64	0.09	4										
Vlt_D	M	54	23	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 9h et 12h	Après petit déjeûner	-1.97	0.13	1	urines des 12h (20h-8h)	-0.56	0.13	1						
		54	23	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 9h et 12h	Après petit déjeûner	-1.80	0.13	1	urines des 12h (20h-8h)	-0.64	0.13	1						
							Moyenne	**-1.89**	**0.24**	**(2SD)**	**Moyenne**	**-0.60**	**0.11**	**(2SD)**						
Vlt_E	F	37	18.3	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 9h et 12h	Après petit déjeûner	-1.80	0.13	1	urines des 12h (20h-8h)	-0.60	0.13	1						
		39	18.3	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 9h et 12h	Après petit déjeûner	-1.44	0.10	12										
		39	18.3	Rhône-Âlpes, France	Plasma	9h30	Après petit déjeûner	-1.47	0.11	4	urines des 12h (20h-8h)	-0.55	0.09	2	**Salive**	9h30	After breakfast	-1.90	0.13	4
							Moyenne	**-1.57**	**0.40**	**(2SD)**	**Moyenne**	**-0.58**	**0.07**	**(2SD)**						
Vlt_F	F	25	21.2	Rhône-Âlpes, France	Plasma	9h30	Après petit déjeûner	-1.33	0.11	3	urines des 12h (20h-8h)	0.00	0.03	3	**Salive**	9h30	After breakfast	-1.65	0.15	5
Vlt_P	M	47	27.4	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 10h et 11h	Après petit déjeûner	-1.56	0.13	1	urines des 12h (20h-8h)	-0.44	0.13	1						
		50	27.4	Rhône-Âlpes, France	Plasma	9h30	Après petit déjeûner	-1.40	0.07	4	urines des 12h (20h-8h)	-0.14	0.01	2	**Salive**	9h30	After breakfast	-1.72	0.08	4
							Moyenne	**-1.48**	**0.22**	**(2SD)**	**Moyenne**	**-0.29**	**0.42**	**(2SD)**						
Vlt_S	F	35	21	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 10h et 11h	Après petit déjeûner	-1.24	0.13	1	urines des 12h (20h-8h)	-0.24	0.13	1	**Lait maternel**	-	04/10/14	-1.55	0.13	1
																-	12/11/14	-1.56	0.13	1
																-	12/01/14	-1.65	0.13	1
																-	13/02/14	-1.63	0.13	1
																	Moyenne	**-1.60**	**0.10**	**(2SD)**
Vlt_T	M	24	26	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 10h et 11h	Après petit déjeûner	-1.80	0.13	1	urines des 12h (20h-8h)	-0.78	0.13	1						
		26	26	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 10h et 11h	Après petit déjeûner	-1.39	0.10	4	urines des 12h (20h-8h)	-0.38	0.08	2	**Salive**	9h30	After breakfast	-1.70	0.10	4
		26	26	Rhône-Âlpes, France	Plasma	Entre 10h et 11h	Après petit déjeûner	-1.33	0.15	7										
							Moyenne	**-1.51**	**0.51**	**(2SD)**	**Moyenne**	**-0.58**	**0.56**	**(2SD)**						

Tableau I.3 – **Description et compositions isotopiques (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) des échantillons d'urines collectées séquentiellement pour des périodes de 3 à 5 jours chez trois volontaires sains. Description and isotope compositions (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) of urines samples collected in a sequential manner during 3 to 5 days in three healthy volunteers.** BMI : Body mass index (indice de masse corporelle)

Individu	Sexe	Âge	BMI	Région	Jour n°	Partie de journée	Heure de dernière collecte	Durée de collecte	Identifiant	Volume (ml)	Ca (mg/L)	$\delta^{44/42}$Ca (‰)	± 2SD	n
Vlt_E	F	39	18.3	Rhône-Alpes, France	0	Soirée	23h20	2h00	Vlt_E1	300	63	**0.86**	**0.14**	6
					1	Nuit	7h30	8h10	Vlt_E2	235	259	**-0.48**	**0.09**	5
					1	Matinée	12h30	5h00	Vlt_E3	460	71	**0.62**	**0.11**	3
					1	Après-midi	22h30	10h00	Vlt_E4	795	113	**-0.10**	**0.06**	4
					1	Soirée	23h30	1h00	Vlt_E5	200	91	**-0.59**	**0.05**	5
					2	Nuit	7h30	8h00	Vlt_E6	425	163	**-0.54**	**0.05**	3
					2	Matinée	12h30	5h00	Vlt_E7	255	108	**0.70**	**0.08**	6
					2	Après-midi	20h00	7h30	Vlt_E8	750	128	**perdu**		
					2	Soirée	23h30	3h30	Vlt_E9	600	122	**-0.73**	**0.09**	2
					3	Nuit	7h30	8h00	Vlt_E10	150	323	**-0.65**	**0.08**	3
					3	Matinée	12h30	5h00	Vlt_E11	175	104	**0.69**	**0.13**	2
					3	Après-midi	23h00	10h30	Vlt_E12	675	213	**-0.65**	**0.07**	4
Vlt_T	M	26	26	Rhône-Alpes, France	0	Soirée	23h59	3h00	Vlt_T1	196	213	**-0.53**	**0.03**	4
					1	Nuit	8h24	8h24	Vlt_T2	289	448	**-0.49**	**0.06**	5
					1	Matinée	12h15	3h51	Vlt_T3	168.5	323	**-0.62**	**0.09**	3
					1	Après-midi	17h27	5h12	Vlt_T4	220	313	**-0.77**	**0.09**	3
					1	Soirée	23h40	6h13	Vlt_T5	200	405	**-0.58**	**0.06**	4
					2	Nuit	8h30	8h50	Vlt_T6	250	601	**-0.55**	**0.08**	4
					2	Matinée	12h30	4h00	Vlt_T7	155	300	**-0.59**	**0.10**	5
					2	Après-midi	17h47	5h17	Vlt_T8	352	356	**-0.71**	**0.13**	5
					2	Soirée	22h00	4h13	Vlt_T9	100	244	**-0.57**	**0.09**	4
					3	Nuit	8h50	10h50	Vlt_T10	318	519	**-0.54**	**0.09**	4
					3	Matinée	11h11	2h21	Vlt_T11	90	318	**-0.60**	**0.08**	5
					3	Après-midi	16h00	4h49	Vlt_T12	325	382	**-0.74**	**0.02**	4
Vlt_C	M	41	23.3	Rhône-Alpes, France	0	Jour	20h00	12h00	Vlt_C1	875	77	**-0.51**	**0.13**	1
					1	Nuit	8h00	12h00	Vlt_C2	915	110	**-0.45**	**0.13**	1
					1	Jour	20h00	12h00	Vlt_C3	1505	41	**-0.63**	**0.13**	1
					2	Nuit	8h00	12h00	Vlt_C4	615	94	**-0.42**	**0.13**	1
					2	Jour	20h00	12h00	Vlt_C5	1140	40	**-0.61**	**0.13**	1
					3	Nuit	8h00	12h00	Vlt_C6	470	144	**-0.45**	**0.13**	1
					3	Jour	20h00	12h00	Vlt_C7	1740	70	**-0.67**	**0.13**	1
					4	Nuit	8h00	12h00	Vlt_C8	555	100	**-0.41**	**0.13**	1
					4	Jour	20h00	12h00	Vlt_C9	660	87	**-0.49**	**0.13**	1
					5	Nuit	8h00	12h00	Vlt_C10	315	173	**-0.31**	**0.13**	1

Tableau I.4 – **Description et compositions isotopiques (‰, rel. *ICP Ca Lyon*) de l'ensemble des échantillons d'autopsies humaines.** Description and isotope compositions (‰, rel. to *ICP Ca Lyon*) of human autopsy samples.

				Os					Sang				
Individu	**Sexe**	**Âge**	**Région**	**Identifiant**	**Type**	**$\delta^{44/42}$Ca**	**± 2SD**	**n**	**Identifiant**	**Type**	**$\delta^{44/42}$Ca**	**± 2SD**	**n**
A	M	53	Rhône-Alpes, France	A3	Fémur	-1.70	0.06	2	A7	Sérum	-1.68	0.28	4
B	M	81	Rhône-Alpes, France	B1	Fémur	-1.87	0.14	2	-	-	-	-	-
C	M	23	Rhône-Alpes, France	C2	Fémur	-1.45	0.03	2	C6	Sérum	-1.66	0.06	2
D	M	37	Rhône-Alpes, France	D2	Fémur	-1.48	0.25	3	D6	Sérum	-1.43	0.20	2
F	M	61	Rhône-Alpes, France	F2	Fémur	-1.68	-	1	F7	Sérum	-1.82	0.09	2
G	M	50	Rhône-Alpes, France	G4	Fémur	-1.94	0.09	2	G6	Sérum	-2.01	0.14	3

Annexe J

Article

Calcium isotope evidence for dramatic increase of continental weathering during the Toarcian oceanic anoxic event (Early Jurassic)

DOI : 10.1016/j.epsl.2014.11.028

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/s0012821x14007201

Bibliographie

Abrams, S. A. (2010). Calcium absorption in infants and small children : Methods of determination and recent findings. *Nutrients*, 2(4):474–480.

Albarède, F. (1995). *Introduction to Geochemical Modeling*. Cambridge University Press, Cambridge.

Albarède, F. et Beard, B. (2004). Analytical methods for non-traditional isotopes. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 55:113–152.

Albarède, F., Télouk, P. et Balter, V. (2017). Medical Applications of Isotope Metallomics. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 82(1):851–885.

Alevizaki, C. C., Ikkos, D. G. et Singhelakis, P. (1973). Progressive decrease of true intestinal calcium absorption with age in normal man. *J Nucl Med*, 14:760–762.

Aloia, J. F., Chen, D.-g., Yeh, J. K. et Chen, H. (2010). Serum vitamin D metabolites and intestinal calcium absorption efficiency in women 1 – 3. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92:835–840.

AlQahtani, S., Hector, M. et Liversidge, H. (2010). Brief communication : The London atlas of human tooth development and eruption. *American Journal of Physical Anthropology*, 142(3):481–490.

Amini, M., Eisenhauer, A., Böhm, F., Fietzke, J., Bach, W., Garbe-Schönberg, D., Rosner, M., Bock, B., Lackschewitz, K. S. et Hauff, F. (2008). Calcium isotope (δ44/40Ca) fractionation along hydrothermal pathways, Logatchev field (Mid-Atlantic Ridge, 14°45'N). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(16):4107–4122.

Amini, M., Eisenhauer, A., Böhm, F., Holmden, C., Kreissig, K., Hauff, F. et Jochum, K. P. (2009). Calcium Isotopes (δ 44/40 Ca) in MPI-DING Reference Glasses, USGS Rock Powders and Various Rocks : Evidence for Ca Isotope Fractionation in Terrestrial Silicates. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 33(2):231–247.

Anderson, J. J. B. (2001). Calcium Requirements during Adolescence to Maximize Bone Health. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2):186S–191S.

Bading, H. (2013). Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9):593–608.

Bagard, M.-L., Schmitt, A.-D., Chabaux, F., Pokrovsky, O. S., Viers, J., Stille, P., Labolle, F. et Prokushkin, A. S. (2013). Biogeochemistry of stable Ca and radiogenic Sr isotopes in a larch-covered permafrost-dominated watershed of Central Siberia. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 114: 169–187.

Bailey, D. a., Martin, a. D., McKay, H. a., Whiting, S. et Mirwald, R. (2000). Calcium accretion in girls and boys during puberty : a longitudinal analysis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 15(11):2245–2250.

Balter, V., Zazzo, A., Moloney, A. P., Moynier, F., Schmidt, O., Monahan, F. J. et Albarède, F. (2010). Bodily variability of zinc natural isotope abundances in sheep. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 24:605–612.

Bechon, L., Balter, V., Martin, J. E. et Tacail, T. (2015). Mesure des variations isotopiques du calcium dans les œufs de poule et de caille. Rapport technique.

Bélanger, L. F. (1969). Osteocytic osteolysis. *Calcified Tissue Research*, 4(1):1–12.

Berridge, M. J., Lipp, P. et Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1):11–21.

Bigeleisen, J. et Mayer, M. G. (1947). Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 15(5):261.

Black, J. R., Kavner, A. et Schauble, E. A. (2011). Calculation of equilibrium stable isotope partition function ratios for aqueous zinc complexes and metallic zinc. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(3): 769–783.

Blanchard, A., Jeunemaitre, X., Coudol, P., Dechaux, M., Froissart, M., May, A., Demontis, R., Fournier, A., Paillard, M. et Houillier, P. (2001). Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney International*, 59(6):2206–2215.

Blanchard, M., Balan, E. et Schauble, E. A. (2017). Equilibrium Fractionation of Non-traditional Isotopes : a Molecular Modeling Perspective. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 82(1):27–63.

Blättler, C. L., Miller, N. R. et Higgins, J. a. (2015). Mg and Ca isotope signatures of authigenic dolomite in siliceous deep-sea sediments. *Earth and Planetary Science Letters*, 419:32–42.

Bleich, M., Shan, Q. et Himmerkus, N. (2012). Calcium regulation of tight junction permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1):93–99.

Böhm, F., Gussone, N., Eisenhauer, A., Dullo, W. C., Reynaud, S. et Paytan, A. (2006). Calcium isotope fractionation in modern scleractinian corals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17):4452–4462.

Bonhommeau, S., Dubroca, L., Le Pape, O., Barde, J., Kaplan, D. M., Chassot, E. et Nieblas, A.-E. (2013). Eating up the world's food web and the human trophic level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51):20617–20620.

Bonjour, J.-P. (2011). Calcium and Phosphate : A Duet of Ions Playing for Bone Health. *Journal of the American College of Nutrition*, 30(sup5):438S–448S.

Bonjour, J. P., Theintz, G., Law, F., Slosman, D. et Rizzoli, R. (1994). Peak bone mass. *Osteoporosis International*, 4(S1):S7–S13.

Bookchin, R. M. et Lew, V. L. (1980). Progressive inhibition of the Ca pump and Ca : Ca exchange in sickle red cells. *Nature*, 284(5756):561–563.

Boonrungsiman, S. (2012). The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35):14170–14175.

Bootman, M. D. (2012). Calcium Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7):a011171–a011171.

Bouillon, R. et Suda, T. (2014). Vitamin D : calcium and bone homeostasis during evolution. *BoneKEy reports*, 3(JANUARY):480.

Brini, M., Calì, T., Ottolini, D. et Carafoli, E. (2013). Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling. volume 12, pages 119–168.

Brown, E. M. (2013). Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(3):333–343.

Brown, E. M. et MacLeod, R. J. (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiological Reviews*, 81(1):239–297.

Buchowski, M. S. (2016). CHAPTER 1. Calcium in the Context of Dietary Sources and Metabolism. *In Calcium - Chemistry, Analysis, Function and Effects*, pages 3–20.

Bullamore, J., Wilkinson, R., Gallagher, J., Nordin, B. et Marshall, D. (1970). Effect of age on calcium absorption. *The lancet*, 296(7672):535–537.

Carafoli, E. (2002). Calcium signaling : A tale for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3):1115–1122.

Case, R. M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S. et Verkhratsky, A. (2007). Evolution of calcium homeostasis : From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium*, 42(4-5):345–350.

Ceccarelli, B., Clemente, F. et Meldolesi, J. (1975). Secretion of calcium in pancreatic juice. *The Journal of physiology*, 245(3):617–638.

Cenki-Tok, B., Chabaux, F., Lemarchand, D., Schmitt, A.-D., Pierret, M.-C., Viville, D., Bagard, M.-L. et Stille, P. (2009). The impact of water–rock interaction and vegetation on calcium isotope fractionation in soil-and stream waters of a small, forested catchment (the Strengbach case). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(8):2215–2228.

Chang, V. T.-C., Williams, R., Makishima, A., Belshawl, N. S. et O'Nions, R. K. (2004). Mg and Ca isotope fractionation during CaCO3 biomineralisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(1):79–85.

Channon, M. B., Gordon, G. W., Morgan, J. L., Skulan, J. L., Smith, S. M. et Anbar, A. D. (2015). Using natural, stable calcium isotopes of human blood to detect and monitor changes in bone mineral balance. *Bone*, 77:69–74.

Chu, N.-C., Henderson, G. M., Belshaw, N. S. et Hedges, R. E. (2006). Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Applied Geochemistry*, 21(10):1656–1667.

Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, 80(2):259–268.

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3 Suppl 3:131–139.

Clementz, M. T., Holden, P. et Koch, P. L. (2003). Are calcium isotopes a reliable monitor of trophic level in marine settings ? *International Journal of Osteoarchaeology*, 13(1-2):29–36.

Cobert, F., Schmitt, A.-D., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Lemarchand, D., Collignon, C., Chabaux, F. et Stille, P. (2011). Biotic and abiotic experimental identification of bacterial influence on calcium isotopic signatures. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 25(19):2760–8.

Colla, C. a., Wimpenny, J., Yin, Q.-Z., Rustad, J. R. et Casey, W. H. (2013). Calcium-isotope fractionation between solution and solids with six, seven or eight oxygens bound to Ca(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 121:363–373.

Collet, P., Uebelhart, D., Vico, L., Moro, L., Hartmann, D., Roth, M. et Alexandre, C. (1997). Effects of 1- and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans. *Bone*, 20(6):547–551.

Courbebaisse, M. et Souberbielle, J.-C. (2011). Équilibre phosphocalcique : régulation et explorations. *Néphrologie & Thérapeutique*, 7(2):118–138.

Cross, B. M., Breitwieser, G. E., Reinhardt, T. A. et Rao, R. (2014). Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer : from physiology to pathology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(6):C515–26.

Curry, A. (2013). The milk revolution. *Nature*, pages 20–22.

Dauphas, N. et Schauble, E. A. (2016). Mass Fractionation Laws, Mass-Independent Effects, and Isotopic Anomalies. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 44:709–783.

De La Rocha, C. L. et DePaolo, D. J. (2000). Isotopic evidence for variations in the marine calcium cycle over the Cenozoic. *Science*, 289:1176–1178.

Del Valle, H. B., Yaktine, A. L., Taylor, C. L. et Ross, A. C. (2011). *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*, volume 32. National Academies Press, Washington, D.C.

Deniro, M. et Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45(3):341–351.

DePaolo, D. (2004). Calcium isotopic variations produced by biological, kinetic, radiogenic and nucleosynthetic processes. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 55:255–288.

Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418(6898):700–707.

Doherty, A. H., Ghalambor, C. K. et Donahue, S. W. (2015). Evolutionary Physiology of Bone : Bone Metabolism in Changing Environments. *Physiology*, 30(1):17–29.

Domagal-Goldman, S. D. et Kubicki, J. D. (2008). Density functional theory predictions of equilibrium isotope fractionation of iron due to redox changes and organic complexation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(21):5201–5216.

Domagal-Goldman, S. D., Paul, K. W., Sparks, D. L. et Kubicki, J. D. (2009). Quantum chemical study of the Fe(III)-desferrioxamine B siderophore complex-Electronic structure, vibrational frequencies, and equilibrium Fe-isotope fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(1):1–12.

Du Vivier, A. D. C., Jacobson, A. D., Lehn, G. O., Selby, D., Hurtgen, M. T. et Sageman, B. B. (2015). Ca isotope stratigraphy across the Cenomanian-Turonian OAE 2 : Links between volcanism, seawater geochemistry, and the carbonate fractionation factor. *Earth and Planetary Science Letters*, 416:121–131.

Dupont, G., Combettes, L., Bird, G. S. et Putney, J. W. (2011). Calcium Oscillations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3):a004226–a004226.

Eastell, R., Yergey, A. L., Vieira, N. E., Cedel, S. L., Kumar, R. et Riggs, B. L. (2009). Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function, and age in women : Evidence of an age-related intestinal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D action. *Journal of Bone and Mineral Research*, 6(2):125–132.

Ebeling, P. R., Atley, L. M., Guthrie, J. R., Burger, H. G., Dennerstein, L., Hopper, J. L. et Wark, J. D. (1996). Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(9):3366–3371.

Eiler, J. M., Bergquist, B., Bourg, I., Cartigny, P., Farquhar, J., Gagnon, A., Guo, W., Halevy, I., Hofmann, A., Larson, T. E., Levin, N., Schauble, E. A. et Stolper, D. (2014). Frontiers of stable isotope geoscience. *Chemical Geology*, 372:119–143.

Elderfield, H. et Schultz, a. (1996). Mid-Ocean Ridge Hydrothermal Fluxes and the Chemical Composition of the Ocean. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 24(1):191–224.

Elton, C. S. (1927). *Animal Ecology*. Sidgwick and Jackson, London.

Evershed, R. P., Payne, S., Sherratt, A. G., Copley, M. S., Coolidge, J., Urem-Kotsu, D., Kotsakis, K., Özdoğan, M., Özdoğan, A. E., Nieuwenhuyse, O., Akkermans, P. M. M. G., Bailey, D., Andeescu, R.-R., Campbell, S., Farid, S., Hodder, I., Yalman, N., Özbaşaran, M., Biçakci, E., Garfinkel, Y., Levy, T. et Burton, M. M. (2008). Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature*, 455(7212):528–531.

Ewing, S., Yang, W. et DePaolo, D. (2008). Non-biological fractionation of stable Ca isotopes in soils of the Atacama Desert, Chile. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72:1096–1110.

Fantle, M. S. (2015). Calcium isotopic evidence for rapid recrystallization of bulk marine carbonates and implications for geochemical proxies. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 148:378–401.

Farkaš, J., Böhm, F., Wallmann, K., Blenkinsop, J., Eisenhauer, A., van Geldern, R., Munnecke, A., Voigt, S. et Veizer, J. (2007a). Calcium isotope record of Phanerozoic oceans : Implications for chemical evolution of seawater and its causative mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(21):5117–5134.

Farkaš, J., Buhl, D., Blenkinsop, J. et Veizer, J. (2007b). Evolution of the oceanic calcium cycle during the late Mesozoic : Evidence from δ44/40Ca of marine skeletal carbonates. *Earth and Planetary Science Letters*, 253(1-2):96–111.

Farkaš, J., Déjeant, A., Novák, M. et Jacobsen, S. B. (2011). Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca2+ in a base-poor forest : A new concept of combining stable (δ44/42Ca) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(22):7031–7046.

Feng, L.-p., Zhou, L., Yang, L., DePaolo, D. J., Tong, S.-Y., Liu, Y.-S., Owens, T. L. et Gao, S. (2016). Calcium Isotopic Compositions of Sixteen USGS Reference Materials. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 2016(4):1–14.

Fietzke, J., Eisenhauer, a., Gussone, N., Bock, B., Liebetrau, V., Nägler, T. F., Spero, H. J., Bijma, J. et Dullo, C. (2004). Direct measurement of 44Ca/40Ca ratios by MC-ICP-MS using the cool plasma technique. *Chemical Geology*, 206:11–20.

Flik, G., Verbost, P. M. et Bonga, S. E. W. (1995). Calcium Transport Processes in Fishes. *In* Wood, C. M. et Shuttleworth, T. J., éditeurs : *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*, pages 317–342. Academic Press.

Fujii, T. et Albarède, F. (2012). Ab Initio Calculation of the Zn Isotope Effect in Phosphates, Citrates, and Malates and Applications to Plants and Soil. *PLoS ONE*, 7(2):e30726.

Fujii, T., Moynier, F., Abe, M., Nemoto, K. et Albarède, F. (2013). Copper isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low temperature geochemistry and biology. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 110:29–44.

Fujii, T., Moynier, F., Blichert-Toft, J. et Albarède, F. (2014). Density functional theory estimation of isotope fractionation of Fe, Ni, Cu, and Zn among species relevant to geochemical and biological environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 140:553–576.

Gallagher, J. C., Riggs, B. L., Eisman, J., Hamstra, A., Arnaud, S. B. et DeLuca, H. F. (1979). Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients : effect of age and dietary calcium. *The Journal of clinical investigation*, 64(3):729–36.

Galy, A., Yoffe, O., Janney, P. E., Williams, R. W., Cloquet, C., Alard, O., Halicz, L., Wadhwa, M., Hutcheon, I. D., Ramon, E. et Carignan, J. (2003). Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18(11):1352.

Garnero, P., Hausherr, E., Chapuy, M. C., Marcelli, C., Grandjean, H., Muller, C., Cormier, C., Bréart, G., Meunier, P. J. et Delmas, P. D. (1996). Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women : the EPIDOS Prospective Study. *Journal of bone and mineral research*, 11(10):1531–1538.

Glimcher, M. J. (2006). Bone : Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64(1):223–282.

Goldschmied, A., Modan, B., Greenberg, R. A., Zurkowski, S. et Modan, M. (1975). Urinary calcium excretion in relation to kidney function in the adult. *Journal of the American Geriatrics Society*, 23(4):155–60.

Gordon, G. W., Monge, J., Channon, M. B., Wu, Q., Skulan, J. L., Anbar, A. D. et Fonseca, R. (2014). Predicting multiple myeloma disease activity by analyzing natural calcium isotopic composition. *Leukemia*, 28(10):2112–2115.

Greenspan, S. L., Maitland, L. A., Myers, E. R., Krasnow, M. B. et Kido, T. H. (1994). Femoral bone loss progresses with age : a longitudinal study in women over age 65. *J Bone Miner Res*, 9(12):1959–1965.

Guéguen, L. et Pointillart, a. (2000). The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(2 Suppl):119S–136S.

Gussone, N., Böhm ;, F., Eisenhauer, A., Dietzel, M., Heuser, A., Teichert, B. M., Reitner, J., Wörheide, G. et Dullo, W. C. (2005). Calcium isotope fractionation in calcite and aragonite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(18):4485–4494.

Gussone, N., Eisenhauer, A., Heuser, A., Dietzel, M., Bock, B., Böhm, F., Spero, H. J., Lea, D. W., Bijma, J. et Nägler, T. F. (2003). Model for kinetic effects on calcium isotope fractionation (δ44Ca) in inorganic aragonite and cultured planktonic foraminifera. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(7):1375–1382.

Gussone, N. et Heuser, A. (2016). Biominerals and Biomaterial. *In Calcium Stable Isotope Geochemistry*, pages 111–144. Springer Berlin Heidelberg.

Gussone, N., Langer, G., Thoms, S., Nehrke, G., Eisenhauer, A., Riebesell, U. et Wefer, G. (2006). Cellular calcium pathways and isotope fractionation in Emiliania huxleyi. *Geology*, 34(8):625–628.

Gussone, N., Schmitt, A.-D., Heuser, A., Wombacher, F., Dietzel, M., Tipper, E. et Schiller, M. (2016). *Calcium Stable Isotope Geochemistry*. Advances in Isotope Geochemistry. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Halicz, L., Galy, A., Belshaw, N. S. et O'Nions, R. K. (1999). High-precision measurement of calcium isotopes in carbonates and related materials by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14(12):1835–1838.

Halliday, A. N., Lee, D. C., Christensen, J. N., Walder, A. J., Freedman, P. A., Jones, C. E., Hall, C. M., Yi, W. et Teagle, D. (1995). Recent developments in inductively coupled plasma magnetic sector multiple collector mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 146-147(C):21–33.

Hannan, M. T., Felson, D. T. et Anderson, J. J. (1992). Bone mineral density in elderly men and women : results from the Framingham osteoporosis study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(5):547–53.

Harouaka, K., Eisenhauer, A. et Fantle, M. S. (2014). Experimental investigation of Ca isotopic fractionation during abiotic gypsum precipitation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 129:157–176.

Heaney, R. P., Abrams, S., Dawson-Hughes, B., Looker, A., Looker, A., Marcus, R., Matkovic, V. et Weaver, C. (2001). Peak Bone Mass. *Osteoporosis International*, 11(12):985–1009.

Heaney, R. P. et Abrams, S. A. (2004). Improved estimation of the calcium content of total digestive secretions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(3):1193–1195.

Heaney, R. P., Recker, R. R., Stegman, M. R. et Moy, A. J. (1989). Calcium absorption in women : Relationships to Calcium intake, Estrogen status, and age. *Journal of Bone and Mineral Research*, 4(4):469–475.

Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E. V., Jönsson, B. et Kanis, J. A. (2013). Osteoporosis in the European Union : Medical management, epidemiology and economic burden : A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of Osteoporosis*, 8(1-2):136.

Heuser, A. (2016). Biomedical Application of Ca Stable Isotopes. *In Calcium Stable Isotope Geochemistry*, pages 247–260. Springer Berlin Heidelberg.

Heuser, A. et Eisenhauer, A. (2008). The Calcium Isotope Composition (δ 44/40 Ca) of NIST SRM 915b and NIST SRM 1486. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 32(3):311–315.

Heuser, A. et Eisenhauer, A. (2010). A pilot study on the use of natural calcium isotope (44Ca/40Ca) fractionation in urine as a proxy for the human body calcium balance. *Bone*, 46(4):889–96.

Heuser, A., Eisenhauer, A., Böhm, F., Wallmann, K., Gussone, N., Pearson, P. N., Nägler, T. F. et Dullo, W. C. (2005). Calcium isotope (δ44/40Ca) variations of Neogene planktonic foraminifera. *Paleoceanography*, 20(2):1–13.

Heuser, A., Eisenhauer, A., Gussone, N., Bock, B., Hansen, B. et Nägler, T. (2002). Measurement of calcium isotopes (dCa) using a multicollector TIMS technique. *International Journal of Mass Spectrometry*, 220(3):385–397.

Heuser, A., Eisenhauer, A., Scholz-Ahrens, K. E. et Schrezenmeir, J. (2016a). Biological fractionation of stable Ca isotopes in Göttingen minipigs as a physiological model for Ca homeostasis in humans. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 52(6):633–648.

Heuser, A., Schmitt, A.-D., Gussone, N. et Wombacher, F. (2016b). Analytical Methods. *In Calcium Stable Isotope Geochemistry*, pages 23–73. Springer Berlin Heidelberg.

Heuser, A., Tütken, T., Gussone, N. et Galer, S. J. (2011). Calcium isotopes in fossil bones and teeth — Diagenetic versus biogenic origin. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(12):3419–3433.

Hewish, N. A., Neilson, G. W. et Enderby, J. E. (1982). Environment of Ca2+ ions in aqueous solvent.

Hindshaw, R. S., Bourdon, B., a.E. Pogge von Strandmann, P., Vigier, N. et Burton, K. W. (2013a). The stable calcium isotopic composition of rivers draining basaltic catchments in Iceland. *Earth and Planetary Science Letters*, 374:173–184.

Hindshaw, R. S., Reynolds, B. C., Wiederhold, J. G., Kiczka, M., Kretzschmar, R. et Bourdon, B. (2013b). Calcium isotope fractionation in alpine plants. *Biogeochemistry*, 112(1-3):373–388.

Hindshaw, R. S., Reynolds, B. C., Wiederhold, J. G., Kretzschmar, R. et Bourdon, B. (2011). Calcium isotopes in a proglacial weathering environment : Damma glacier, Switzerland. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(1):106–118.

Hippler, D., Schmitt, A.-D., Gussone, N., Heuser, A., Stille, P., Eisenhauer, A. et Nägler, T. F. (2003). Calcium Isotopic Composition of Various Reference Materials and Seawater. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 27(1):13–19.

Hippler, D., Witbaard, R., van Aken, H. M., Buhl, D. et Immenhauser, A. (2013). Exploring the calcium isotope signature of Arctica islandica as an environmental proxy using laboratory- and field-cultured specimens. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 373:75–87.

Hirata, T., Tanoshima, M., Suga, A., Tanaka, Y.-k., Nagata, Y., Shinohara, A. et Chiba, M. (2008). Isotopic analysis of calcium in blood plasma and bone from mouse samples by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 24(11):1501–7.

Hoenderop, J. (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiological reviews*, pages 373–422.

Holmden, C. et Bélanger, N. (2010). Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74:995–1015.

Holmden, C., Papanastassiou, D. A., Blanchon, P. et Evans, S. (2012). d44/40Ca variability in shallow water carbonates and the impact of submarine groundwater discharge on Ca-cycling in marine environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 83:179–194.

Homann, V., Kinne-Saffran, E., Arnold, W. H., Gaengler, P. et Kinne, R. K. H. (2006). Calcium transport in human salivary glands : A proposed model of calcium secretion into saliva. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(5):583–591.

Huang, S., Farkaš, J. et Jacobsen, S. B. (2010). Calcium isotopic fractionation between clinopyroxene and orthopyroxene from mantle peridotites. *Earth and Planetary Science Letters*, 292(3-4):337–344.

Huang, S., Farkaš, J., Yu, G., Petaev, M. I. et Jacobsen, S. B. (2012). Calcium isotopic ratios and rare earth element abundances in refractory inclusions from the Allende CV3 chondrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 77:252–265.

Hunt, C. D. et Johnson, L. A. K. (2007). Calcium requirements : New estimations for men and women by cross-sectional statistical analyses of calcium balance data from metabolic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86(4):1054–1063.

Husson, J. M., Higgins, J. A., Maloof, A. C. et Schoene, B. (2015). Ca and Mg isotope constraints on the origin of Earth's deepest d13C excursion. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 160:243–266.

Ilich, J. Z. et Kerstetter, J. E. (2000). Nutrition in Bone Health Revisited : A Story Beyond Calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(6):715–737.

Iyengar, G., Kollmer, W. et Bowen, H. (1978). *The Elemental Composition of Human Tissues and Body Fluids A compilation of values for adults*.

Jackson, B. P., Liba, A. et Nelson, J. (2015). Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 00:1–5.

Jacobson, A. D. et Holmden, C. (2008). δ44Ca evolution in a carbonate aquifer and its bearing on the equilibrium isotope fractionation factor for calcite. *Earth and Planetary Science Letters*, 270(3-4):349–353.

Jaiswal, J. K. (2001). Calcium — how and why ? *Journal of Biosciences*, 26(3):357–363.

Jalilehvand, F., Spångberg, D., Lindqvist-Reis, P., Hermansson, K., Persson, I. et Sandström, M. (2001). Hydration of the calcium ion. An EXAFS, large-angle x-ray scattering, and molecular dynamics simulation study. *Journal of the American Chemical Society*, 123(3):431–441.

Jaouen, K., Szpak, P. et Richards, M. P. (2016). Zinc Isotope Ratios as Indicators of Diet and Trophic Level in Arctic Marine Mammals. *Plos One*, 11(3):e0152299.

Kalkwarf, H. (1999). Hormonal and dietary regulation of changes in bone density during lactation and after weaning in women. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(3):319–29.

Karsenty, G. et Ferron, M. (2012). The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature*, 481(7381):314–20.

Kasemann, S. A., Schmidt, D. N., Pearson, P. N. et Hawkesworth, C. J. (2008). Biological and ecological insights into Ca isotopes in planktic foraminifers as a palaeotemperature proxy. *Earth and Planetary Science Letters*, 271(1-4):292–302.

Katz, A. K., Glusker, J. P., Beebe, S. A. et Bock, C. W. (1996). Calcium Ion Coordination : A Comparison with That of Beryllium, Magnesium, and Zinc. *Journal of the American Chemical Society*, 118(24):5752–5763.

Kenny, A. M. et Prestwood, K. M. (2000). Osteoporosis : Pathogenesis, DIagnosis and Treatment in Older Adults. *Rheumatic Disease Clinics Of North America*, 26(3).

Knudson, K. J., Williams, H. M., Buikstra, J. E., Tomczak, P. D., Gordon, G. W. et Anbar, A. D. (2010). Introducing δ88/86Sr analysis in archaeology : a demonstration of the utility of strontium isotope fractionation in paleodietary studies. *Journal of Archaeological Science*, 37(9):2352–2364.

Kovacs, C. S. et Fuleihan, G. E. H. (2006). Calcium and bone disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 35(1):21–51.

Leblanc, J. et Sirot, V. (2011). Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 1 - Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines et phyto-estrogènes. *Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*, 2006-SA-03(Eat 2):346.

Lee, H. B. et Blaufox, M. D. (1985). Blood volume in the rat. *Journal of Nuclear Medicine*, 26(1):72–76.

LeGeros, R. Z. et Legeros, J. P. (1984). Phosphate Minerals in Human Tissues. *In Photosphate Minerals*, pages 351–385. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Lehn, G. O. et Jacobson, A. D. (2015). Optimization of a 48 Ca– 43 Ca double-spike MC-TIMS method for measuring Ca isotope ratios (δ 44/40 Ca and δ 44/42 Ca) : limitations from filament reservoir mixing. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(7):1571–1581.

Lewis, J., Pike, A. W. G., Coath, C. D. et Evershed, R. P. (2017). Strontium concentration, radiogenic (⁸⁷ Sr/ ⁸⁶ Sr) and stable (δ ⁸⁸ Sr) strontium isotope systematics in a controlled feeding study. *STAR : Science & Technology of Archaeological Research*, 3(1):53–65.

Li, Q., Thirlwall, M. et Müller, W. (2016). Ca isotopic analysis of laser-cut microsamples of (bio)apatite without chemical purification. *Chemical Geology*, 422:1–12.

Lomashvili, K. A., Narisawa, S., Millán, J. L. et O'Neill, W. C. (2014). Vascular calfcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney international*, 85(6):1351–6.

Long, F. (2011). Building strong bones : molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(1):27–38.

Maréchal, C., Télouk, P. et Albarède, F. (1999). Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology*.

Marenzana, M., Shipley, A. M., Squitiero, P., Kunkel, J. G. et Rubinacci, A. (2005). Bone as an ion exchange organ : Evidence for instantaneous cell-dependent calcium efflux from bone not due to resorption. *Bone*, 37(4):545–554.

Martin, J. E., Tacail, T., Adnet, S., Girard, C. et Balter, V. (2015). Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs. *Chemical Geology*, 415:118–125.

Martin, J. E., Tacail, T. et Balter, V. (2017a). Non-traditional isotope perspectives in vertebrate palaeobiology. *Palaeontology*, 60(4):485–502.

Martin, J. E., Vance, D. et Balter, V. (2014a). Magnesium stable isotope ecology using mammal tooth enamel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2).

Martin, J. E., Vance, D. et Balter, V. (2014b). Natural variation of magnesium isotopes in mammal bones and teeth from two South African trophic chains. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 130:12–20.

Martin, J. E., Vincent, P., Tacail, T., Khaldoune, F., Jourani, E., Bardet, N. et Balter, V. (2017b). Calcium Isotopic Evidence for Vulnerable Marine Ecosystem Structure Prior to the K/Pg Extinction. *Current Biology*, 27(11):1641–1644.e2.

Melin, A. D., Crowley, B. E., Brown, S. T., Wheatley, P. V., Moritz, G. L., Yit Yu, F. T., Bernard, H., DePaolo, D. J., Jacobson, A. D. et Dominy, N. J. (2014). Calcium and carbon stable isotope ratios as paleodietary indicators. *American journal of physical anthropology*, 154(4):633–43.

Moore, J., Jacobson, A. D., Holmden, C. et Craw, D. (2013). Tracking the relationship between mountain uplift, silicate weathering, and long-term CO2 consumption with Ca isotopes : Southern Alps, New Zealand. *Chemical Geology*, 341:110–127.

Morgan, J. L. L., Gordon, G. W., Arrua, R. C., Skulan, J. L., Anbar, A. D. et Bullen, T. D. (2011). High-precision measurement of variations in calcium isotope ratios in urine by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 83(18):6956–62.

Morgan, J. L. L., Skulan, J. L., Gordon, G. W., Romaniello, S. J., Smith, S. M. et Anbar, A. D. (2012a). Rapidly assessing changes in bone mineral balance using natural stable calcium isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25):9989–9994.

Morgan, J. L. L., Zwart, S. R., Heer, M., Ploutz-snyder, R., Ericson, K. et Smith, S. M. (2012b). Bone metabolism and nutritional status during 30-day head-down-tilt bed rest. *Journal of applied physiology*, 113(10):1519–1529.

Moynier, F. et Fujii, T. (2017). Calcium isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low-temperature geochemistry, biology and medicine. *Scientific Reports*, 7(December 2016):44255.

Müller, M. N., Kisakürek, B., Buhl, D., Gutperlet, R., Kolevica, A., Riebesell, U., Stoll, H. et Eisenhauer, A. (2011). Response of the coccolithophores Emiliania huxleyi and Coccolithus braarudii to changing seawater Mg2+ and Ca2+ concentrations : Mg/Ca, Sr/Ca ratios and δ44/40Ca, δ26/24Mg of coccolith calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(8):2088–2102.

Nagaraja, M. P. et Risin, D. (2013). The current state of bone loss research : Data from spaceflight and microgravity simulators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(5):1001–1008.

Nazare, J.-A., de Rougemont, A., Normand, S., Sauvinet, V., Sothier, M., Vinoy, S., Désage, M. et Laville, M. (2010). Effect of postprandial modulation of glucose availability : short- and long-term analysis. *British Journal of Nutrition*, 103(10):1461–1470.

Nielsen, L. C. et DePaolo, D. J. (2013). Ca isotope fractionation in a high-alkalinity lake system : Mono Lake, California. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 118:276–294.

Nielsen, L. C., DePaolo, D. J. et De Yoreo, J. J. (2012). Self-consistent ion-by-ion growth model for kinetic isotopic fractionation during calcite precipitation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 86:166–181.

Nordin, B. E. C., Wishart, J. M., Clifton, P. M., McArthur, R., Scopacasa, F., Need, A. G., Morris, H. A., O'Loughlin, P. D. et Horowitz, M. (2004). A longitudinal study of bone-related biochemical changes at the menopause. *Clinical Endocrinology*, 61(1):123–130.

Ockert, C., Gussone, N., Kaufhold, S. et Teichert, B. (2013). Isotope fractionation during Ca exchange on clay minerals in a marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 112:374–388.

O'Neill, W. (2007). The fallacy of the calcium-phosphorus product. *Kidney International*, 72(7):792–796.

Orwoll, E. S., Oviatt, S. K., McClung, M. R., Deftos, L. J. et Sexton, G. (1990). The rate of bone mineral loss in normal men and the effects of calcium and cholecalciferol supplementation. *Annals of Internal Medicine*, 112(1):29–34.

Page, B., Bullen, T. et Mitchell, M. (2008). Influences of calcium availability and tree species on Ca isotope fractionation in soil and vegetation. *Biogeochemistry*, 88:1–13.

Parfitt, A. M. (2003). Misconceptions (3) : Calcium leaves bone only by resorption and enters only by formation. *Bone*, 33(3):259–263.

Pauly, D., Trites, A. W., Capuli, E., Christensen Pauly, V. et to Pauly, C. D. (1998). Diet composition and trophic levels of marine mammals. *ICES Journal of Marine Science*, 55(1983):467–481.

Peacock, M. (2010). Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(Supplement 1):S23–S30.

Pearson, O. M. et Lieberman, D. E. (2004). The aging of Wolff's "law" : Ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. *Yearbook of Physical Anthropology*, 47:63–99.

Perakis, S., Maguire, D. et Bullen, T. (2006). Coupled nitrogen and calcium cycles in forests of the Oregon Coast Range. *Ecosystems*, 9:63–74.

Peterson, M. C. et Riggs, M. M. (2010). A physiologically based mathematical model of integrated calcium homeostasis and bone remodeling. *Bone*, 46(1):49–63.

Pirklbauer, M. et Mayer, G. (2011). The exchangeable calcium pool : Physiology and pathophysiology in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(8):2438–2444.

Polis, G. A. et Strong, D. R. (1996). Food Web Complexity and Community Dynamics. *The American Naturalist*, 147(5):813–846.

Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, 70(1):11–25.

R Core Team (2016). R : A Language and Environment for Statistical Computing.

Raposo, J. F., Sobrinho, L. G. et Ferreira, H. G. (2002). A minimal mathematical model of calcium homeostasis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(9):4330–4340.

Rathod, A., Bonny, O., Guessous, I., Suter, P. M., Conen, D., Erne, P., Binet, I., Gabutti, L., Gallino, A., Muggli, F., Hayoz, D., Pechere-Bertschi, A., Paccaud, F., Burnier, M. et Bochud, M. (2015). Association of Urinary Calcium Excretion with Serum Calcium and Vitamin D Levels. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(3):452–462.

Rege, R. V. (2002). THE ROLE OF BILIARY CALCIUM IN GALLSTONE PATHOGENESIS. *Frontiers in Bioscience*, 7:315–325.

Reynard, L. M., Day, C. et Henderson, G. (2011a). Large fractionation of calcium isotopes during cave-analogue calcium carbonate growth. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(13):3726–3740.

Reynard, L. M., Henderson, G. M. et Hedges, R. E. M. (2010). Calcium isotope ratios in animal and human bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(13):3735–3750.

Reynard, L. M., Henderson, G. M. et Hedges, R. E. M. (2011b). Calcium isotopes in archaeological bones and their relationship to dairy consumption. *Journal of Archaeological Science*, 38(3):657–664.

Reynard, L. M., Pearson, J., Henderson, G. M. et Hedges, R. E. (2013). Calcium Isotopes in Juvenile Milk-Consumers. *Archaeometry*, 55(5):946–957.

Richter, F. M., Dauphas, N. et Teng, F. Z. (2009). Non-traditional fractionation of non-traditional isotopes : Evaporation, chemical diffusion and Soret diffusion. *Chemical Geology*, 258(1-2):92–103.

Riggs, B. L., O'Fallon, W. M., Muhs, J., O'Connor, M. K., Kumar, R. et Melton, L. J. (1998). Long-term effects of calcium supplementation on serum parathyroid hormone level, bone turnover, and bone loss in elderly women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13(2):168–174.

Rizzuto, R. et Pozzan, T. (2006). Microdomains of Intracellular Ca 2+ : Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological reviews*, 86(1):369–408.

Rodan, G. A. et Martin, T. J. (1981). Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-A hypothesis. *Calcified Tissue International*, 33(1):349–351.

Romaniello, S. J., Field, M. P., Smith, H. B., Gordon, G. W., Kim, M. H. et Anbar, A. D. (2015). Fully automated chromatographic puri fi cation of Sr and Ca for isotopic analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 00:1–7.

Rozenberg, S., Body, J. J., Bruyère, O., Bergmann, P., Brandi, M. L., Cooper, C., Devogelaer, J. P., Gielen, E., Goemaere, S., Kaufman, J. M., Rizzoli, R. et Reginster, J. Y. (2016). Effects of Dairy Products Consumption on Health : Benefits and Beliefs—A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. *Calcified Tissue International*, 98(1):1–17.

Russell, W., Papanastassiou, D. et Tombrello, T. (1978). Ca isotope fractionation on the Earth and other solar system materials. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(1973):1075–1090.

Russo, R. (2014). Beginning to see the light. *The Analytical Scientist*, 0214:24–30.

Rustad, J. R., Casey, W. H., Yin, Q.-Z., Bylaska, E. J., Felmy, A. R., Bogatko, S. a., Jackson, V. E. et Dixon, D. a. (2010). Isotopic fractionation of Mg2+(aq), Ca2+(aq), and Fe2+(aq) with carbonate minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(22):6301–6323.

Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M. et Evershed, R. P. (2012). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature*, 493(7433):522–525.

Sansalone, V., Kaiser, J., Naili, S. et Lemaire, T. (2013). Interstitial fluid flow within bone canaliculi and electro-chemo-mechanical features of the canalicular milieu : A multi-parametric sensitivity analysis. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12(3):533–553.

Saotome, K., Singh, A. K., Yelshanskaya, M. V. et Sobolevsky, A. I. (2016). Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature*, 534(7608):506–511.

Schauble, E. (2004). Applying stable isotope Fractionation Theory to New Systems. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 55:65–111.

Schiller, M., Paton, C. et Bizzarro, M. (2012). Calcium isotope measurement by combined HR-MC-ICPMS and TIMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(1):38.

Schmitt, A., Bracke, G., Stille, P. et Kiefel, B. (2001). The calcium isotope composition of modern seawater determined by thermal ionisation mass spectrometry. *Geostandards Newsletter*, 25:267–275.

Schmitt, A., Chabaux, F. et Stille, P. (2003a). The calcium riverine and hydrothermal isotopic fluxes and the oceanic calcium mass balance. *Earth and Planetary Science Letters*, 213:503–518.

Schmitt, A.-D. (2016). Earth-Surface Ca Isotopic Fractionations. *In Calcium Stable Isotope Geocehmistry*, volume 105, pages 145–172. Springer Berlin Heidelberg.

Schmitt, A.-D., Cobert, F., Bourgeade, P., Ertlen, D., Labolle, F., Gangloff, S., Badot, P.-M., Chabaux, F. et Stille, P. (2013). Calcium isotope fractionation during plant growth under a limited nutrient supply. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 110:70–83.

Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Cobert, F., Lemarchand, D., Stille, P. et Chabaux, F. (2009). High performance automated ion chromatography separation for Ca isotope measurements in geological and biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24(8):1089.

Schmitt, A. D., Stille, P. et Vennemann, T. (2003b). Variations of the 44Ca/40Ca ratio in seawater during the past 24 million years : Evidence from δ44Ca and δ18O values of Miocene phosphates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(14):2607–2614.

Seeman, E. (2003). Reduced bone formation and increased bone resorption : rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International*, 14(S3):2–8.

Seo, J. H., Lee, S. K. et Lee, I. (2007). Quantum chemical calculations of equilibrium copper (I) isotope fractionations in ore-forming fluids. *Chemical Geology*, 243(3-4):225–237.

Shackelford, L. C., LeBlanc, a. D., Driscoll, T. B., Evans, H. J., Rianon, N. J., Smith, S. M., Spector, E., Feeback, D. L. et Lai, D. (2004). Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 97(1):119–129.

Shemarova, I. V. et Nesterov, V. P. (2007). Evolution of mechanisms of Ca2+-signaling. Significance of Ca2+-messenger systems during transition of organisms to multicellularity. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 43(2):135–144.

Sherman, D. M. (2013). Equilibrium isotopic fractionation of copper during oxidation/reduction, aqueous complexation and ore-forming processes : Predictions from hybrid density functional theory. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 118:85–97.

Shroff, R., Long, D. a. et Shanahan, C. (2013). Mechanistic Insights into Vascular Calcification in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(2):179–89.

Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S. et Lifton, R. P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption. *Science*, 285(5424):103–106.

Simon, J. I. et DePaolo, D. J. (2010). Stable calcium isotopic composition of meteorites and rocky planets. *Earth and Planetary Science Letters*, 289(3-4):457–466.

Skulan, J. et DePaolo, D. J. (1999). Calcium isotope fractionation between soft and mineralized tissues as a monitor of calcium use in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24):13709–13713.

Skulan, J., DePaolo, D. J. et Owens, T. L. (1997). Biological control of calcium isotopic abundances in the global calcium cycle. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(12):2505–2510.

Skulan, J. L. (1999). *Calcium isotopes and the evolution of terrestrial reproduction in vertebrates*. Thèse de doctorat, University of California, Berkeley.

Skulan, J. L., Bullen, T. D., Anbar, A. D., Puzas, J. E., Shackelford, L. C., LeBlanc, A. et Smith, S. M. (2007). Natural Calcium Isotopic Composition of Urine as a Marker of Bone Mineral Balance. *Clinical chemistry*, 53(6):1153–5.

Smith, S. M., Uchakin, P. N. et Tobin, B. W. (2002). Space flight nutrition research : Platforms and analogs. *Nutrition*, 18(10):926–929.

Smith, S. M., Wastney, M. E., O'Brien, K. O., Morukov, B. V., Larina, I. M., Abrams, S. a., Davis-Street, J. E., Oganov, V. et Shackelford, L. C. (2005). Bone markers, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the mir space station. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(2):208–18.

Spector, E. R., Smith, S. M. et Sibonga, J. D. (2009). Skeletal Effects of Long-Duration Head-Down Bed Rest. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 80(5):23–28.

Steuber, T. et Buhl, D. (2006). Calcium-isotope fractionation in selected modern and ancient marine carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(22):5507–5521.

Tacail, T., Albalat, E., Télouk, P. et Balter, V. (2014). A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29(3):529–535.

Tacail, T., Kovačiková, L., Brůžek, J. et Balter, V. (2017a). Spatial distribution of trace element Ca-normalized ratios in primary and permanent human tooth enamel. *Science of the Total Environment journal*, 604:308–318.

Tacail, T., Télouk, P. et Balter, V. (2016). Precise Analysis of Calcium Stable Isotope Variations in Biological Apatites using Laser Ablation MC-ICPMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31:152–162.

Tacail, T., Thivichon-Prince, B., Martin, J. E., Charles, C., Viriot, L. et Balter, V. (2017b). Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24):6268–6273.

Tang, N. et Skibsted, L. H. (2016). Calcium binding to amino acids and small glycine peptides in aqueous solution : Toward peptide design for better calcium bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(21):4376–4389.

Taylor, E. N. et Curhan, G. C. (2009). Demographic, dietary, and urinary factors and 24-h urinary calcium excretion. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(12):1980–1987.

Teichert, B. M. A., Gussone, N. et Torres, M. E. (2009). Controls on calcium isotope fractionation in sedimentary porewaters. *Earth and Planetary Science Letters*, 279(3-4):373–382.

Teitelbaum, S. L. (2000). Bone Resorption by Osteoclasts. *Science*, 289(5484):1504–1508.

TENG, F.-Z., DAUPHAS, N. et WATKINS, J. M. (2017). Non-traditional stable isotopes : Retrospective and prospective. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 82(1):1–26.

TETI, A. et ZALLONE, A. (2009). Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis ? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone*, 44(1):11–16.

TIPPER, E., GAILLARDET, J. et GALY, A. (2010). Calcium isotope ratios in the world's largest rivers : A constraint on the maximum imbalance of oceanic calcium fluxes. *Global Biogeochemical Cycles*, 24:1–13.

TIPPER, E. T., SCHMITT, A. D. et GUSSONE, N. (2016). Global Ca Cycles : Coupling of Continental and Oceanic Processes. *In Calcium Stable Isotope Geochemistry*, pages 173–222. Springer Berlin Heidelberg.

TRÉMILLON, B. (1965). *Les séparations par les résines échangeuses d'ions*. Gauthier-Villars, Paris.

TRUSWELL, A. S. (2017). *Essentials of Human Nutrition , FIFTH EDITION*. Oxford University Press.

TSAI, K. S., HEATH, H., KUMAR, R. et RIGGS, B. L. (1984). Impaired vitamin D metabolism with aging in women. Possible role in pathogenesis of senile osteoporosis. *Journal of Clinical Investigation*, 73(6):1668–1672.

UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., AKATSU, T., TANAKA, H., SASAKI, T., NISHIHARA, T., KOGA, T., MARTIN, T. J. et SUDA, T. (1990). Origin of osteoclasts : mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18):7260–4.

UREY, H. C. (1947). The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society*, pages 562–581.

VATANPARAST, H., BAILEY, D. A., BAXTER-JONES, A. D. G. et WHITING, S. J. (2010). Calcium requirements for bone growth in Canadian boys and girls during adolescence. *British Journal of Nutrition*, 103(04):575.

VIGNE, J.-D. et HELMER, D. (2007). Was milk a "secondary product" in the Old World Neolithisation process ? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. *Anthropozoologica*, 42(2):9–40.

WATKINS, J. M., DEPAOLO, D. J. et WATSON, E. B. (2017). Kinetic Fractionation of Non-Traditional Stable Isotopes by Diffusion and Crystal Growth Reactions. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 82(1):85–125.

WEAVER, C. et HEANEY, R. (2006). Calcium. *In* SHILS, M., SHIKE, M., ROSS, A., CABELLERO, B. et COUSINS, R., éditeurs : *Modern Nutrition in Health and Disease, 10th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins.

WEYER, S. et SCHWIETERS, J. (2003). High precision Fe isotope measurements with high mass resolution MC-ICPMS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 226(3):355–368.

WHEDON, G. D. et RAMBAUT, P. C. (2006). Effects of long-duration space flight on calcium metabolism : Review of human studies from Skylab to the present. *Acta Astronautica*, 58(2):59–81.

Wiegand, B. A., Chadwick, O. A., Vitousek, P. M. et Wooden, J. L. (2005). Ca cycling and isotopic fluxes in forested ecosystems in Hawaii. *Geophysical Research Letters*, 32(11):1–4.

Wieser, M. E., Buhl, D., Bouman, C. et Schwieters, J. (2004). High precision calcium isotope ratio measurements using a magnetic sector multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19(7):844.

Wombacher, F., Eisenhauer, A., Heuser, A. et Weyer, S. (2009). Separation of Mg, Ca and Fe from geological reference materials for stable isotope ratio analyses by MC-ICP-MS and double-spike TIMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24(5):627.

Wombacher, F., Schmitt, A.-D., Gussone, N. et Heuser, A. (2016). Introduction. *In Calcium Stable Isotope Geocehmistry*, pages 1–22. Springer Berlin Heidelberg.

Xue, Y. et Fleet, J. C. (2009). Intestinal Vitamin D Receptor Is Required for Normal Calcium and Bone Metabolism in Mice. *Gastroenterology*, 136(4):1317–1327.e2.

Yáñez, M., Gil-Longo, J. et Campos-Toimil, M. (2012). Calcium binding proteins. *In Advances in Experimental Medicine and Biology*, volume 740, pages 461–482. Springer Netherlands.

Yeun, J. Y., Ornt, D. B. et Depner, T. A. (2012). Brenner and Rector's The Kidney. *In Brenner & Rector's The Kidney*, pages 2294–2346. Elsevier Health Sciences.

Young, E., Galy, A. et Nagahara, H. (2002). Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(6):1095–1104.

Young, J. F., Luecke, R. H., Pearce, B. A., Lee, T., Ahn, H., Baek, S., Moon, H., Dye, D. W., Davis, T. M. et Taylor, S. J. (2009). Human Organ/Tissue Growth Algorithms that Include Obese Individuals and Black/White Population Organ Weight Similarities from Autopsy Data. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(8):527–540.

Zazzo, A., Moloney, A., Monahan, F. J., Scrimgeour, C. M. et Schmidt, O. (2008). Effect of age and food intake on dietary carbon turnover recorded in sheep wool. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 22:2937–2945.

Zhu, B. L., Ishikawa, T., Quan, L., Li, D. R., Zhao, D., Michiue, T. et Maeda, H. (2005). Evaluation of postmortem serum calcium and magnesium levels in relation to the causes of death in forensic autopsy. *Forensic Science International*, 155(1):18–23.

Zhu, H. L., Zhang, Z. F., Liu, Y. F., Liu, F., Li, X. et Sun, W. D. (2015). Calcium Isotopic Fractionation during Ion-Exchange Column Chemistry and Thermal Ionisation Mass Spectrometry (TIMS) Determination. *Geostandards and Geoanalytical Research*, pages n/a–n/a.

Zhu, P. et Macdougall, J. D. (1998). Calcium isotopes in the marine environment and the oceanic calcium cycle. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62(10):1691–1698.

Résumé

L'environnement et la physiologie déterminent les compositions isotopiques du Ca de l'organisme des vertébrés et des mammifères en particulier. Ces constats ont permis de dégager des applications possibles de l'étude des isotopes du Ca, en biologie médicale pour le suivi de l'équilibre osseux chez les mammifères et en (paléo-)écologie pour l'étude des régimes alimentaires actuels et passés des vertébrés. Ces applications sont tributaires d'une meilleure compréhension fondamentale des causes de ces variations. Cette thèse a pour but de déterminer les principales causes de variabilité des compositions isotopiques du Ca chez les mammifères et l'humain. Un protocole d'analyse en solution par MC-ICP-MS est d'abord présenté puis deux méthodes d'échantillonnage sont comparées afin de réaliser des mesures de résolution spatiale accrue dans les tissus minéralisés. L'influence des sources alimentaires de Ca est ensuite discutée. La composition isotopique de l'alimentation humaine est variable du fait des compositions diverses des sources primaires de Ca et dépend particulièrement des proportions de produits laitiers dans l'alimentation. Il est démontré que les transitions nutritionnelles précoces, comme le sevrage du lait maternel, peuvent être tracées par les compositions de l'émail des dents de lait humaines. Les mécanismes des fractionnements isotopiques sont discutés sur la base d'observations chez l'humain et l'animal. Un modèle mathématique permet de dégager des mécanismes expliquant la distribution des isotopes du Ca à travers les tissus et les fluides de l'organisme et met en lumière le rôle prépondérant du rein dans la détermination de la composition isotopique de l'os.

Abstract

Environment influences the isotope compositions of body Ca and vertebrate physiology affects these compositions in turn. These observations have allowed recognition of possible applications for Ca isotopes, in the field of medical biology, with the assessment of bone mineral balance in human, and in (palaeo-)ecology for the study of past and present day diets in vertebrates. These applications depend on a better fundamental understanding of causes for these variations. This thesis aims at identifying the main mechanisms responsible for variability of Ca isotope compositions in mammals and human. A solution mode analysis protocol was first developed for MC-ICP-MS. Two methods for microsampling of tooth enamel were then compared in order to increase spatial resolution of mineralized tissues analysis. The influence of dietary Ca sources has been discussed. Isotope composition of human diet is variable because of the diversity of Ca primary sources but also due to variations in dairy products proportions in diet. Early dietary transitions, such as weaning, can be studied using the Ca isotope compositions of human deciduous tooth enamel. Based on observations in human and other mammals, the mechanisms responsible for Ca isotope fractionations are discussed. A mathematical model was developed, allowing the identification of some mechanisms responsible for Ca isotope distribution across organism reservoirs, and sheds light on the crucial role of kidney in determination of bone isotope compositions.