Les quelques articles qui suivent constituent une part de la contribution de la section académique de Nantes, organisatrice des Journées Nationales 1989. Nous avons accepté de publier dans le Bulletin les textes de conférences ou les descriptions d'expériences réalisées dans les ateliers, lorsque cela nous paraissait pouvoir intéresser le plus grand nombre.

Vous trouverez dans un prochain Bulletin la suite de ces articles, la plupart consacrés à l'électronique, au niveau du second cycle.

Le rédacteur en chef

Les isotopes au service de la qualité*

par Maryvonne L. MARTIN
Université de Nantes - CNRS, 44072 Nantes Cedex

RÉSUMÉ

Les principaux atomes qui constituent les produits naturels, hydrogène, ^{1}H, carbone, ^{12}C, azote, ^{14}N, oxygène, ^{16}O... sont accompagnés par de faibles quantités de leurs isotopes lourds : ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O... L'eau des océans par exemple, contient environ 156 atomes de deutérium pour 1 million d'atomes d'hydrogène. Ces proportions d'atomes lourds ne sont pas constantes dans l'univers. Ainsi la teneur en deutérium est beaucoup plus importante sur Mars et sur Vénus que sur la Terre. De même, l'eau de l'Équateur est plus pauvre en deutérium que celle des pôles et la teneur totale en carbone-13 du glucose des plantes dépend du mécanisme de la photosynthèse.

La Résonance Magnétique Nucléaire a permis de montrer que le deutérium ne se distribue pas statistiquement sur les sites d'une

* N.D.L.R. : Le texte est celui d'une conférence prononcée aux Journées de Nantes

molécule naturelle. Les teneurs isotopiques spécifiques des différentes positions moléculaires constituent autant de témoins de l'histoire chimique, biochimique et technologique du produit.

Le fractionnement isotopique naturel spécifique (FINS) est ainsi source d'information sur la filiation mécanistique des atomes d'hydrogène. Il renseigne notamment sur l'origine de précurseurs végétaux et sur les conditions écologiques de la biosynthèse.

Appliquées à l'étude de molécules d'intérêt agro-alimentaire, les méthodes isotopiques permettent par exemple d'authentifier l'origine, orge ou maïs, d'un éthanol de whisky ou d'inférer l'origine géographique, Bordeaux ou Bourgogne, d'un vin. Elles sont aussi à l'origine d'une méthode de détection et de quantification de la chaptalisation.

1. LES ISOTOPES DANS L'UNIVERS

Les principaux atomes qui constituent les substances naturelles sont généralement présents sous plusieurs formes isotopiques. Ainsi les isotopes majoritaires de l'hydrogène, ^{1}H, du carbone, ^{12}C, de l'azote, ^{14}N, de l'oxygène, ^{16}O... sont accompagnés de faibles proportions de leurs isotopes stables, plus lourds, ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N et ^{17}O, ^{18}O... On a coutume de dire que le carbone-13 par exemple a une abondance naturelle de 1.1 %, c'est-à-dire que le rapport des nombres d'atomes ^{13}C et ^{12}C, soit $R_C = {}^{13}C / {}^{12}C$, est égal à $11\ 10^{-3}$. De même, les tables indiquent souvent une abondance naturelle de $15\ 10^{-5}$ pour le deutérium, $3.6\ 10^{-3}$ pour l'azote-15, $3.7\ 10^{-4}$ pour l'oxygène-17 et 2.10^{-3} pour l'oxygène-18.

En réalité, les teneurs isotopiques ne sont pas rigoureusement les mêmes dans les différents types de produits et elle varient même, pour une espèce moléculaire donnée, en fonction de la provenance.

Des variations considérables des rapports isotopiques existent à l'échelle de l'Univers. Ainsi le rapport D/H du nombre de deutériums, $^{2}H \equiv D$, au nombre de protiums, ^{1}H, exprimé en parties par million, est de 150 ppm dans «l'eau du robinet» de Nantes alors qu'il atteint 900 ppm sur Mars et 16 000 ppm, soit près de 2 %, sur Vénus. Les variations de teneurs isotopiques sont beaucoup plus réduites à l'échelle de la Terre. Cependant, le rapport isotopique D/H de l'eau, voisin de

156 ppm aux environs de l'équateur, décroit considérablement vers les pôles. Il n'est plus que de 129 ppm à la station de Thule au Groënland par exemple. Les variations observées dans les teneurs en deutérium et en oxygène-18 de l'eau s'expliquent par les phénomènes de fractionnement associés aux transformations physiques qui interviennent aux cours des processus d'évaporation et de condensation accompagnant le transport de l'eau par les nuages. Dans une situation d'équilibre thermodynamique liquide-vapeur de l'eau par exemple, le deutérium a une légère préférence pour l'état liquide et le rapport α_e des paramètres isotopiques $(D / H)_v$ de l'état vapeur et $(D / H)_l$ de l'état liquide est voisin de 0.927 à une température de 25°C.

$$\alpha_e = \frac{(D/H)_v}{(D/H)_l} \qquad (1)$$

Lors de la formation des nuages, la vapeur d'eau est donc allégée par rapport à l'eau de l'océan. Elle continue à s'appauvrir lorsque les nuages se déplacent vers l'intérieur des continents car la fraction d'eau perdue au cours des précipitations est elle-même enrichie en deutérium lors de la condensation. D'autre part, les valeurs des facteurs de fractionnement isotopique, α_e, augmentent lorsque la température diminue. L'eau évaporée à température plus basse subissant un plus fort appauvrissement en isotope lourd, les précipitations deviennent plus légères vers les régions polaires. Cet effet de température se traduit aussi par une légère diminution de la teneur en deutérium lorsque l'altitude augmente.

Les plantes consomment donc, lors de la photosynthèse, des eaux dont les teneurs isotopiques dépendent du site considéré. D'autre part, diverses étapes de fractionnement isotopique interviennent au cours de l'ensemble complexe de phénomènes physiques et de transformations biochimiques qui président à la biosynthèse en conditions naturelles. Des différences notables de teneur moléculaire globale en carbone-13 ou en deutérium ont été observées dans de nombreux produits. Ainsi la biomasse terrestre est globalement appauvrie en carbone-13 par rapport au gaz carbonique de l'atmosphère. L'importance de la discrimination qui se produit lors de l'assimilation du carbone dépend du mécanisme de la photosynthèse. Les constituants des plantes dites C_3, qui constituent la majorité des espèces croissant en pays tempérés, sont appauvries en C-13 par rapport à leurs homologues des plantes dites C_4 qui résultent d'une adaptation à des conditions de sécheresse. Dans les plantes C_3, le gaz carbonique est directement introduit par la ribulose

1-5-biphosphate carboxylase dans un cycle de réactions dit cycle de Calvin. L'étape de carboxylation qui conduit à un squelette à 3 carbones (C_3), le phosphoglycérate, s'accompagne d'une discrimination notable à l'égard du carbone-13. En revanche, dans les plantes C_4, la première étape d'assimilation du carbone qui fait intervenir la phosphoenolpyruvate carboxylase et conduit à des composés à 4 carbones (C_4), n'introduit qu'un faible fractionnement. En conséquence, les sucres de plantes C_4, comme la canne à sucre, sont systématiquement plus riches en C-13 que les sucres issus de plantes C_3 comme la betterave à sucre, le blé, l'orge, etc... Cette propriété a été abondamment exploitée pour identifier l'origine C_3 ou C_4 des produits naturels. Les figures 1 et 2 illustrent les gammes de teneurs isotopiques globables en ^{13}C et ^{2}H rencontrées dans différents types de produits.

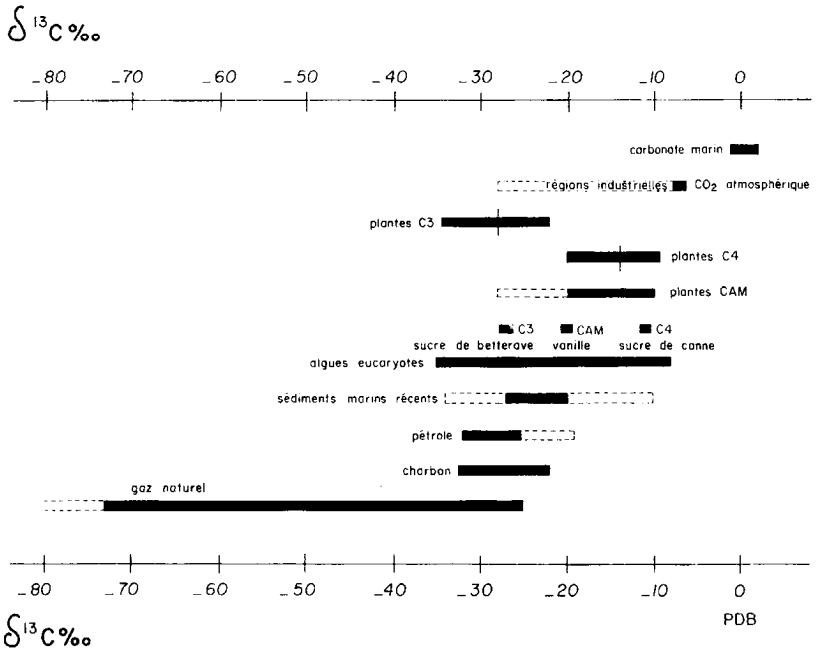


Figure 1 : Gammes de variations des teneurs isotopiques du carbone en abondance naturelle. Le paramètre relatif $\delta^{13}C$ ‰ est défini par l'équation 2. Dans les zones de forte concentration industrielle, une partie du gaz carbonique atmosphérique provient de la combustion de carburants fossiles appauvris en carbone-13. Le paramètre $\delta^{13}C$ ‰ du CO_2 de l'atmosphère est donc plus faible dans ces régions.

La teneur en carbone-13 par exemple est généralement déterminée par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI) sur le gaz

carbonique résultant de la combustion de l'échantillon. Le paramètre mesuré représente donc la teneur isotopique globale du produit. Les résultats sont le plus souvent exprimés dans l'échelle dite delta. Dans cette échelle, le rapport isotopique total du produit, $(^{13}C / {}^{12}C)_P$, est comparé à celui d'une substance de référence, un carbonate dit PDB :

$$\delta^{13}C\ ‰ = \frac{(^{13}C/^{12}C)_P - (^{13}C/^{12}C)_{PDB}}{(^{13}C/^{12}C)_{PDB}} 1000 \qquad (2)$$

On constate sur la figure 1 que les paramètres $\delta^{13}C$ des composés naturels s'étendent sur une gamme de l'ordre de 50 ‰.

Dans le cas de l'hydrogène, les teneurs isotopiques totales sont mesurées par SMRI sur l'hydrogène obtenu par réduction de l'eau de combustion du produit. La référence internationale est alors l'eau de l'océan dite SMOW (Standard Mean Ocean Water). Exprimée sur l'échelle δ la gamme de variation atteint 400 ‰ (figure 2).

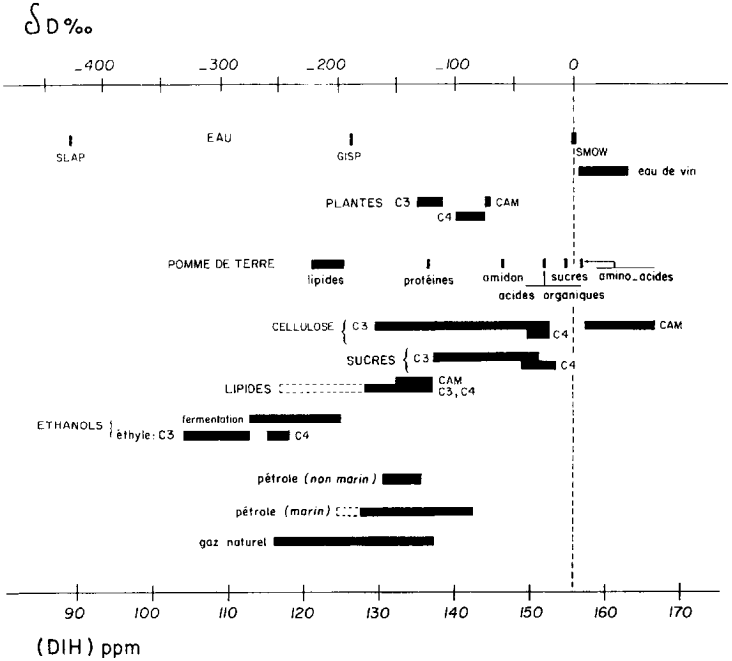


Figure 2 : Gammes de teneurs isotopiques naturelles de l'hydrogène dans différents

types de produits. D/H représente le rapport des nombres totaux d'atomes de deuterium et de protium. Ce rapport est exprimé en parties par million. Les teneurs isotopiques relatives sont aussi définies sur l'échelle δ ‰.

$$\delta D\ ‰ = \frac{(D/H)_{produit} - (D/H)_{ref}}{(D/H)_{ref}} 1000$$

la référence étant un échantillon d'eau des océans (SMOW - Standard Mean Ocean Water). Les sigles SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation) et GISP (Greenland Ice Sheet Precipitation) désignent des étalons d'eaux internationaux.

2. LE FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE NATUREL SPÉCIFIQUE (FINS)

Parmi les thèmes de discussion qu'affectionnent les chercheurs, figure souvent celui d'un antagonisme possible entre recherche dite «fondamentale» et recherche dite «appliquée» et celui des dangers d'un «pilotage par l'aval» de la recherche. Nous verserons un élément supplémentaire à ces querelles sémantiques en présentant les développements fondamentaux ouverts par l'étude du fractionnement isotopique naturel spécifique à partir du problème très concret qui les a initiés. En 1980, la question était posée, sous forme de concours publié dans la presse nationale, de l'invention d'une méthode permettant de détecter la chaptalisation des vins. Pour le chimiste (sacrilège en la matière !), un vin sec se réduit à plus de 96 % m/m, à un mélange d'eau et d'éthanol. Un vin titrant 11 degrés par exemple contient 11 % v/v d'espèces moléculaires CH_3CH_2OH. L'éthanol résulte en principe de la fermentation des sucres de raisin mais lorsque du sucre de betterave par exemple a été ajouté au moût avant fermentation, les molécules d'éthanol ont une double origine, raisin et betterave. Si tout le sucre a été fermenté, les principales espèces chimiques, éthanol ou eau, contenues dans le vin sont a priori identiques quelle que soit leur provenance. D'autre part, en raison des progrès réalisés dans les techniques de raffinage, il devient difficile de détecter l'addition de sucres exogènes par la présence de constituants en trace apportés par ces sucres. Nous avons donc recherché des critères de caractérisation portant sur les produits majoritaires, éthanol et eau, en postulant l'existence d'une répartition non statistique du deuterium quantifiable par Résonance Magnétique Nucléaire.

De ce point de vue, un échantillon d'éthanol pur est constitué à près de 99 % de molécules $^{12}C^{1}H_3\ ^{12}C\ ^{1}H_2\ ^{16}O\ ^{1}H$. Toutefois, il

contient aussi de faibles quantités des isotopomères suivants ($H \cong {}^{1}H$ et $D \cong {}^{2}H$) :

$^{12}CH_2\,D\,^{12}CH_2\,^{16}OH$ (I), $^{12}CH_3\,^{12}CHD\,^{16}OH$ (II), $^{12}CH_3\,^{12}CH_2\,^{16}OD$ (III)

$^{13}CH_3\,^{12}CH_2\,^{16}OH$, $^{12}CH_3\,^{13}CH_2\,^{16}OH$

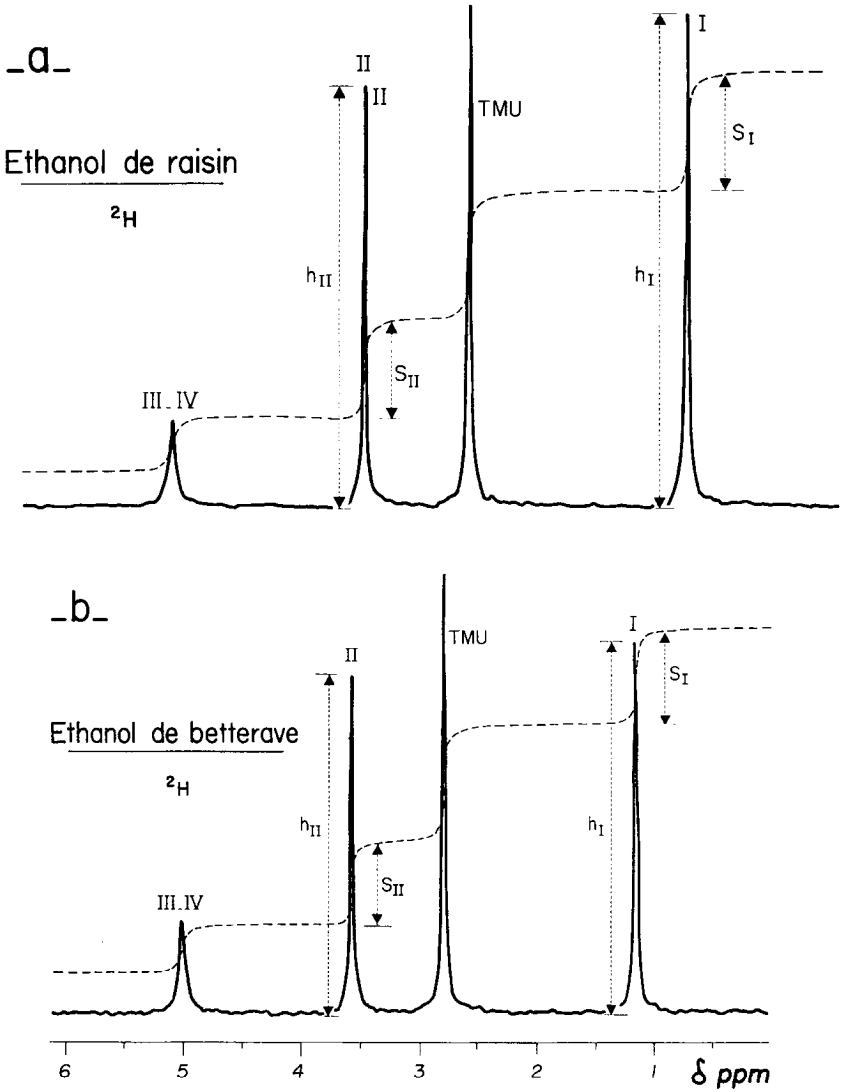
$^{12}CH_3\,^{12}CH_2\,^{17}OH$, $^{12}CH_3\,^{12}CH_2\,^{18}OH$

En présence d'eau majoritairement sous forme $^{16}OH_2$, on doit aussi tenir compte des isotopomères

$$H\,^{16}OD\ (IV),\ H\,^{17}OH \text{ et } H\,^{18}OH$$

En raison de la faible abondance naturelle des isotopes de masse supérieure, les proportions d'espèces comportant deux noyaux lourds, par exemple deux deuteriums, sont négligeables en première approximation.

Nous avons vu que la teneur globale en deutérium de l'éthanol peut être déterminée par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI). La mesure donne alors accès au nombre total d'atomes ^{2}H, c'est-à-dire au nombre total, N_D, de molécules de types I, II, III rapporté au nombre total d'atomes ^{1}H. Une distribution aléatoire du deutérium sur les différents sites moléculaires conduirait à des proportions 3 : 2 : 1 des isotopomères I, II, III, c'est-à-dire à $N_D/2$ molécules I, $N_D/3$ molécules II et $N_D/6$ molécules III. Les informations spécifiques à chaque isotopomère étant perdues lors de la combustion de l'échantillon, cette répartition ne peut pas être directement examinée par spectrométrie de masse. En revanche, grâce au phénomène de déplacement chimique qui permet d'observer sur un même spectre les résonances de noyaux de même espèce situés dans des environnements électroniques différents, les isotopomères I, II, III sont distingués par leurs signaux de Résonance Magnétique Nucléaire du deutérium. Le spectre de RMN ^{2}H d'un échantillon d'éthanol à 95 % extrait d'un vin de l'Hérault est représenté sur la figure 3a. L'environnement électronique des noyaux ^{2}H étant quasiment identique à celui des noyaux ^{1}H correspondants, le spectre du deuterium est caractérisé par les mêmes déplacements chimiques que le spectre protonique. On associe donc les résonances de droite à gauche aux isotopomères I, II et III. En raison de l'échange chimique rapide entre les hydrogènes de l'eau et de l'hydroxyle de l'éthanol, un seul signal est observé pour les sites III et IV dans les conditions de l'expérience.



Figures 3 : Spectres de RMN du deutérium d'échantillons d'éthanol titrant environ 95 %. Dans le cas a, l'alcool a été extrait d'un vin de la région de l'Hérault. L'échantillon b est un alcool provenant de la fermentation de sucre de betterave. Les signaux I, II, III-IV sont associés respectivement aux résonances de CH_2D (méthyle), CHD (méthylène) et ROD-HOD. L'abréviation TMU se rapporte au signal de la tetramethylurée utilisée comme référence pour le calcul des rapports isotopiques $(D/H)_i$. Les hau-

teurs des raies sont désignées par h_i et des distances proportionnelles aux surfaces S_i sont mesurées sur la courbe intégrale. Le paramètre isotopique relatif R défini l'équation 3 est d'environ 2.55 pour l'éthanol de raisin et 2.72 pour l'éthanol de betterave.

Les proportions relatives des différents isotopomères sont directement obtenues par mesure de surface des signaux. En effet dans les conditions expérimentales appropriées, la surface de chaque raie RMN est porportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent à la fréquence considérée. Ainsi le rapport des surfaces des signaux II et I, soit S_{II}/S_I fournit directement le rapport des teneurs isotopiques de ces deux sites. Ce rapport doit être égal à 2/3 pour une distribution aléatoire du deutérium sur les sites méthylène et méthyle. L'évaluation des rapports isotopiques absolus $(D/H)_i$, associés aux différents sites, i, peut être réalisée en ajoutant à l'échantillon une quantité connue d'une substance de référence de teneur isotopique préalablement étalonnée. Le signal noté TMU sur le spectre de la figure 3 est celui de la référence tetraméthylurée. Pour des signaux de largeurs égales, le rapport des surfaces, S_i, peut être assimilé à celui des hauteurs, h_i, mesurables avec une meilleure précision. Un paramètre relatif $R_{II/I}$ peut être défini :

$$R_{II/I} = 3\,\frac{S_{II}}{S_I} \approx 3\,\frac{h_{II}}{h_I} \qquad (3)$$

Ce paramètre représente la teneur isotopique du méthylène, rapportée à celle du méthyle arbitrairement caractérisé par le facteur de probabilité 3. Il doit être égal à 2 pour une répartition statistique du deutérium. On détermine en réalité, une valeur R = 2.55 à partir du spectre d'éthanol de vin de la figure 3a. Plus généralement, on montre qu'il existe ainsi dans les produits naturels de fortes déviations par rapport à une distribution aléatoire du deutérium sur les différents sites moléculaires.

Pour résoudre le problème posé, il restait à comparer les teneurs isotopiques spécifiques de l'éthanol de vin aux teneurs isotopiques correspondantes d'un éthanol résultant de la fermentation de sucre de betterave. Une expérience analogue (figure 3b) permet de déterminer un rapport R = 2.72 pour un échantillon d'éthanol de betterave. L'addition de sucre de betterave au moût de raisin avant fermentation doit donc entraîner une augmentation du rapport R par rapport à la valeur mesurée dans le vin non chaptalisé. Aux faibles abondances en deutérium existant dans les conditions naturelles, les rapports $(D/H)_i$ mesurés dans un vin peuvent être considérés comme des moyennes

pondérées des paramètres associés aux éthanols d'origines différentes. Connaissant les valeurs de ces paramètres individuels, il devient possible non seulement de détecter la présence de sucre exogène mais de déterminer le taux de chaptalisation.

Considérée d'un point de vue «fondamental», l'étude par Résonance Magnétique Nucléaire du Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique (RMN-FINS ou SNIF-NMR pour Site-specific Natural Isotope Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance) constitue une nouvelle source d'information sur la filiation de l'hydrogène au cours des transformations biochimiques, chimiques et physiques qui président à la synthèse ou à la biosynthèse en conditions d'abondance isotopique naturelle. Le chimiste dispose désormais d'une méthode exploitant le marquage isotopique sans nécessité d'enrichissement. D'autre part, l'étude des répartitions isotopiques dans les produits naturels permet le cas échéant, d'inférer des propriétés et des comportements biochimiques de précurseurs disparus ou inacessibles.

3. FILIATION ISOTOPIQUE SPÉCIFIQUE ET MÉCANISMES DE RÉACTIONS CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

L'étude des mécanismes réactionnels fait souvent appel à la détermination des effets isotopiques cinétiques. En effet, le remplacement d'un hydrogène par un deutérium est susceptible d'entraîner des variations des constantes de vitesses de réaction. Si le deutérium est substitué sur le site de réaction, l'effet isotopique primaire, défini par le rapport des constantes de vitesse de l'espèce protonée, k_H, et de l'espèce deutériée, k_D, est généralement très différent de 1. Ainsi les réactions impliquant la rupture d'une liaison carbone-hydrogène par exemple sont en général beaucoup plus rapides pour une liaison C-H que pour la liaison C-D correspondante (k_H/k_D souvent compris entre 1 et 8). Bien qu'exerçant une influence beaucoup plus faible sur la vitesse de réaction, la substitution isotopique sur des sites en α, β, γ... du centre de réaction peut s'accompagner d'effets isotopiques secondaires k_H/k_H^{α}, k_H/k_H^{β}..., caractéristiques. D'un point de vue mécanistique, les effets isotopiques cinétiques constituent des sources d'information importantes sur la nature des étapes réactionnelles déterminant la vitesse et sur la structure des états de transition.

La mesure des effets isotopiques H/D est souvent réalisée par

comparaison directe des vitesses de réaction de l'espèce protonée d'une part et d'espèces sélectivement deutériées d'autre part. Des méthodes de compétition intra- ou inter-moléculaire, réputées plus précises, sont aussi mises en œuvre. Ces méthodes utilisent soit une espèce moléculaire substituée sur une ou deux positions équivalentes (l'une des deux positions équivalentes d'un groupement CH_2 par exemple) soit un mélange de substrats sélectivement deutériés et non deutériés.

La méthode RMN-FINS, qui exploite le fractionnement isotopique naturel, présente des avantages importants par rapport aux méthodes conventionnelles. Elle évite le recours à des réactions d'enrichissement isotopique sélectif souvent longues et permet la détermination dans une même expérience de l'ensemble des effets isotopiques primaires et secondaires. En efet, il est possible a priori, de déterminer simultanément au cours d'une réaction, les proportions des différents isotopomères des substrats, S, et des produits, Y. Ainsi pour une réaction de substitution d'un hydrogène méthylénique d'un substrat $CH_3\ CH_2\ R$ conduisant à un produit $CH_3\ CHY\ R$ avec un rendement ρ , on peut déterminer par RMN les rapports isotopiques du site méthylénique du substrat restant, $(D/H)_S$, du site méthine du produit formé, $(D/H)_Y$, ainsi que les rapports $(D/H)^{\alpha}_{S*}$ et $(D/H)^{\alpha}_{Y*}$ associés au site méthyle en α du centre de réaction sur le substrat et sur le produit respectivement.

$$CH_3\ CH_2\ R + YZ \xrightarrow{2k_H} CH_3\ CHY\ R + ZH$$

$$CH_3\ CHDR + YZ \ (S) \xrightarrow{k_D} CH_3\ CHY\ R + ZD$$

$$CH_3\ CHDR + YZ \ (S) \xrightarrow{k^{\alpha}_H} CH_3\ CDY\ R + ZH$$

$$CH_2D\ CH_2R + YZ \ (S^*) \xrightarrow{2k^{\beta}_H} CH_2D\ CHY\ R + ZH \ (Y^*)$$

Ces rapports isotopiques rapportés au rapport isotopique correspondant dans le substrat initial, $(D/H)_{So}$ s'expriment en fonction de ρ et des rapports isotopiques primaires et secondaires. On a par exemple :

$$\frac{(D/H)_S}{(D/H)_{So}} = (1-\rho)\left[\frac{1}{2}\frac{k_D}{k_H} + \frac{1}{2}\frac{k^{\alpha}_H}{k_H} - 1\right] \qquad (4)$$

Inversement les valeurs des paramètres isotopiques cinétiques (k_H / k_D

etc...) sont accessibles à partir des teneurs isotopiques mesurées pour une ou plusieurs valeurs du taux de transformation ρ.

Dans le cas de réactions biochimiques complexes telles que la fermentation de glucose, G, en éthanol par des levures, la mesure dans des expériences modèles des teneurs isotopiques de tous les sites des composés de départ, glucose et eau, et de tous les sites des produits de réaction, éthanol et eau, donne accès aux différents coefficients de transfert isotopique a_{ij} entre un site i des substrats et un site j des produits. Ainsi le vecteur $\mathbf{D^S}$ des rapports isotopiques spécifiques des substrats de départ et le vecteur $\mathbf{D^Q}$ des rapports isotopiques spécifiques des produits formés sont reliés par la matrice [A] des coefficients de transfert entre les différents sites :

$$\mathbf{D^Q} = [A]\,\mathbf{D^S} \qquad (5)$$

Ces coefficients décrivent la filiation isotopique entre sites et caractérisent donc les parcours réactionnels. On montre par exemple que dans la réaction de fermentation levurienne, les facteurs de transfert isotopique entre les différents sites du glucose et le site méthylénique de l'éthanol sont proches de zéro alors que le coefficient reliant le méthylène et l'eau de départ est voisin de 0.75. Ce comportement indique que les hydrogènes méthyléniques proviennent essentiellement de l'eau du milieu, le transfert d'hydrogène s'opérant avec une forte discrimination à l'encontre de l'isotope lourd. Le site méthyle en revanche est fortement relié à certains sites du squelette glucose mais aussi à l'eau de fermentation. Déterminés à partir d'un ensemble d'expériences-modèles, les coefficients de transfert permettent ensuite d'estimer les paramètres isotopiques de précurseurs inacessibles ou disparus sur la base des paramètres mesurés dans les produits finals. Ainsi, connaissant la matrice réactionnelle de fermentation [A], il devient possible d'inférer le comportement des paramètres isotopiques $\mathbf{D^S}$ de sucres à partir des rapports isotopiques $\mathbf{D^Q}$ mesurés sur l'éthanol et l'eau de fermentation.

L'exploitation du marquage isotopique naturel dans le cadre de la méthode RMN-FINS se révèle particulièrement intéressante pour l'étude de mécanismes de biosynthèse en milieu naturel et en particulier pour l'étude des cycles de photosynthèse dans différents types de végétaux. Des études comparatives de l'influence des voies métaboliques (C_3, C_4, CAM...) et des conditions d'environnement peuvent

désormais être entreprises sur une large échelle puisqu'elles ne nécessitent pas d'enrichissement isotopique.

4. SOURCES DU FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE ET NOUVELLES VOIES DE RECHERCHE OUVERTES PAR LA MÉTHODE RMN-FINS

La distribution isotopique dans les différents sites d'une molécule obtenue par synthèse chimique ou issue d'une biosynthèse en milieu naturel, est gouvernée par une succession généralement complexe de transformations plus ou moins fractionnantes. Si l'on considère par exemple une molécule comme le cinéole extraite d'une huile essentielle d'eucalyptus, les paramètres isotopiques spécifiques qui la caractérisent représentent le bilan d'une longue suite d'étapes conduisant de l'eau des océans et du gaz carbonique atmosphérique au métabolite à l'état pur. Une discrimination isotopique due aux changements de phase intervient comme nous l'avons vu, au cours du transport de l'eau des océans vers le site d'alimentation de la plante mais aussi tout au long des processus d'évapo-transpiration et, à l'autre extrémité de la chaîne, au cours des traitements physiques de séparation et purification. Il faut aussi tenir compte d'éventuels facteurs de fractionnement thermodynamiques associés aux équilibres d'échange chimique entre les hydrogènes de l'eau et ceux des groupements hydroxyliques par exemple. L'empreinte isotopique du produit traduit donc un ensemble complexe d'effets résultant - de répercussions climatiques et de différences physiologiques liées à la structure de la plante (transport, absorption par la plante, diffusion, evapo-transpiration...) - d'effets biochimiques primaires dûs à la photosynthèse - d'effets biochimiques secondaires associés à la transformation du glucose - et enfin, de facteurs biochimiques et technologiques accompagnant d'éventuelles bioconversions et séparations (extraction, purification...).

A priori, la complexité de ces parcours n'encourage pas les tentatives d'interprétation et de classification des paramètres isotopiques. Cependant de nombreuses étapes sont en fait susceptibles d'être modélisées. D'autre part, la nature procédant aux biosynthèses dans des conditions de reproductibilité remarquables, la méthode RMN-FINS devient un instrument extrêmement performant pour l'inférence d'origine de nombreux produits et la caractérisation des facteurs d'environnement. La figure 4 illustre par exemple les étapes de fractionnement les plus significatives qui conduisent de la teneur isotopique de l'eau des océans aux teneurs isotopiques spécifiques de

l'éthanol et de l'eau du vin en passant par, l'eau de pluie, l'eau du sol, l'eau des feuilles, le glucose de photosynthèse et l'eau des baies.

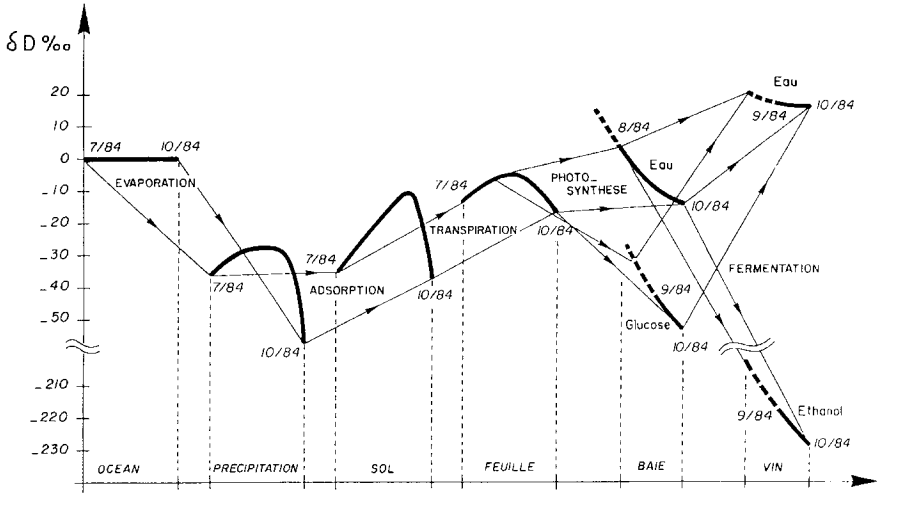


Figure 4 : Évolution des teneurs naturelles en deutérium au cours des transformations physiques et biochimiques qui conduisent de l'eau des océans à l'éthanol et à l'eau du vin. On remarque que l'éthanol est fortement appauvri en deutérium par rapport à l'eau des océans (Diagramme issu de la référence G.J. MARTIN et al. Applied Geochemistry, Vol. 44, p. 1, 1989).

D'un point de vue général, la molécule d'éthanol constitue une sonde isotopique particulièrement efficace. Comme nous l'avons vu plus haut (§ 3.), cette sonde est représentative des sucres précurseurs et peut constituer un instrument de reconnaissance des voies métaboliques de la biosynthèse. La détermination par RMN et IRMS - des rapports isotopiques spécifiques $(D/H)_i$ de l'éthanol de fermentation - du rapport global $^{13}C/^{12}C$ de cet éthanol - et des rapports D/H et $^{18}O/^{16}O$ de l'eau du milieu, permet de caractériser chaque échantillon dans un espace isotopique multidimensionnel. Une analyse statistique des données est alors en mesure de hiérarchiser l'importance des critères botaniques et des critères d'environnement (température, précipitations...) sur les différentes variables isotopiques et de définir leur pouvoir de classification. La figure 5 montre par exemple qu'une analyse factorielle discriminante réalisée dans l'espace des variables isotopiques $(D/H)_{méthyle}$, $(D/H)_{méthylène}$ et $(^{13}C/^{12}C)_{éthyle}$ assure une

distinction parfaite (100 %) des échantillons issus de la fermentation de sucres de betterave, de canne et de citrus.

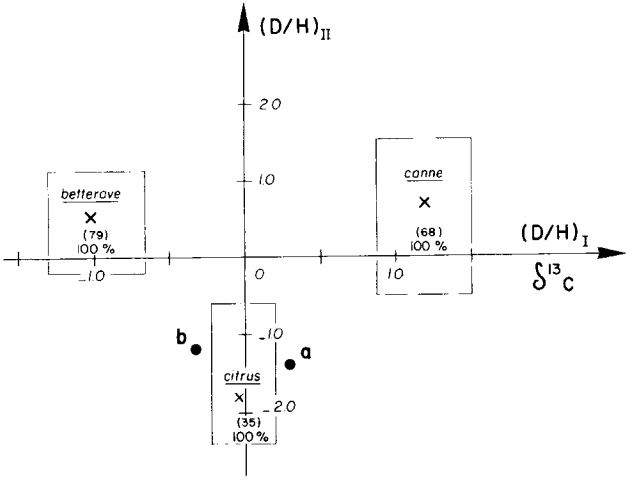


Figure 5 : Analyse factorielle discriminante fondée sur les variables isotopiques $\delta^{13}C$, $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$ de l'éthanol issu de la fermentation de sucres de betterave, de sucres de canne et de jus de citrus (orange, citron, pamplemousse). Les croix figurent les centres des groupes et les rectangles définissent la dispersion naturelle dans le plan des deux principaux facteurs. Le premier facteur est fortement relié aux paramètres $(D/H)_I$ et $\delta^{13}C$ alors que le second est relié à $(D/H)_{II}$. Les chiffres entre parenthèses représentent les nombres d'échantillons de chaque catégorie. Tous les échantillons sont bien classés (100 %). La méthode RMN-FINS est donc capable d'identifier sans ambiguïté les 3 types de sucres. Les points a et b représentent des échantillons de jus d'orange auxquels ont été ajoutés respectivement du sucre de canne et du sucre de betterave à hauteur de 10 % m/m. La méthode permet donc de détecter d'addition de sucres exogène aux jus de fruits naturels.

De nombreux autres problèmes d'intérêt fondamental peuvent être abordés sous un angle nouveau par étude du fractionnement isotopique spécifique. La RMN-FINS offre notamment la possibilité de déterminer directement les facteurs de fractionnement isotopique thermodynamique dans les systèmes en échange chimique. Dans le mélange méthanol-eau à l'équilibre par exemple, le deutérium n'a pas tout à fait la même affinité pour des 2 sites oxygénés et la constante d'équilibre $K = 1.09\ (\pm 0.02)$ (298K) obtenue par mesure de pressions de vapeur témoigne d'une préférence notable pour le méthanol :

$$2\ CH_3\ OH + D_2O \rightleftarrows 2\ CH_3\ OD + H_2O$$

Différentes techniques, souvent longues et indirectes, ont été utilisées pour déterminer ces facteurs de fractionnement thermodynamique. La mesure simultanée par RMN-^{2}H des proportions des isotopomères en échange lent est à la base d'une méthode simple, directe et rapide de détermination des effets isotopiques à l'équilibre.

La RMN-FINS ouvre aussi une nouvelle voie d'accès aux fractionnements isotopiques associés aux changements de phase. Des facteurs de fractionnement liquide/vapeur, α_e, associés aux différents isotopomères d'une molécule peuvent être définis par analogie avec le cas de l'eau (§ 1., équation 1). Ces facteurs sont accessibles par RMN-FINS dans une même expérience de distillation et sans nécessité de marquages isotopiques.

D'autres développements originaux concernent par exemple la détermination de puretés enantiométriques sur la base de teneurs isotopiques différentes des configurations R et S. Une éventuelle chiralité naturelle de composés tels que l'éthanol, considérés a priori comme achiraux, peut aussi être détectée. La stéréospécificité des réactions biochimiques est en effet susceptible de conduire à des quantités différentes d'isotopomères méthyléniques. Dans le cas de l'éthanol par exemple, la méthode permet d'étudier les filiations mécanistiques à l'origine d'un enrichissement enantiométrique des espèces CH_3 CHDOH de configuration R ou S.

5. LES MÉTHODES ISOTOPIQUES AU SERVICE DE L'ASSURANCE QUALITÉ DES BIO-PRODUITS

Les fractionnements subis par les isotopes au cours des biosynthèses et des évolutions en milieu naturel en font des témoins fiables de l'histoire des produits. Les teneurs isotopiques totales mesurées par spectrométrie de masse (SMRI) et les rapports isotopiques spécifiques obtenus par RMN (RMN-FINS) sont donc susceptibles de constituer des critères de reconnaissance d'origine des bio-produits.

La caractérisation d'origine des matières premières ou des produits élaborés pose des problèmes importants à l'industrie agro-alimentaire qui souhaite pouvoir identifier par exemple - l'origine naturelle ou synthétique d'une vanilline, - la provenance, chimique, hemi-synthétique ou naturelle d'un anethole de pastis, - l'origine botanique (blé, canne, orge, pomme...) d'un alcool, - la région de production d'un vin,

- le millésime d'un cognac, - l'enrichissement d'un vin ou d'un jus de fruit par des sucres exogènes, etc...

La détermination du taux total en carbone-13 par spectrométrie de masse des rapports isotopiques a été fréquemment utilisée pour tenter de résoudre ces types de problèmes. Cette méthode se révèle particulièrement efficace pour distinguer des produits issus de plantes effectuant leur photosynthèse par des métabolismes C_3 et C_4. Ainsi les plantes C_3 sont généralement caractérisées par des valeurs du paramètres $\delta^{13}C$ comprises entre –23 ‰ et –31 ‰ alors que la teneur isotopique des constituants de plantes C_4 est nettement plus élevée ($\delta^{13}C$ de l'ordre de –10 ‰ à –16 ‰) (figure 1). Cette propriété permet en particulier de détecter l'adultération de produits sucrés ou alcoolisés provenant d'espèces C_3 telles que betterave, blé, orge, pomme, raisin... par un sucre dérivé de plantes C_4 telles que canne à sucre et maïs. La méthode est applicable par exemple à la détection d'une addition de sucre de canne ou de sirop de maïs, au miel, au sirop d'érable ou au jus de pomme.

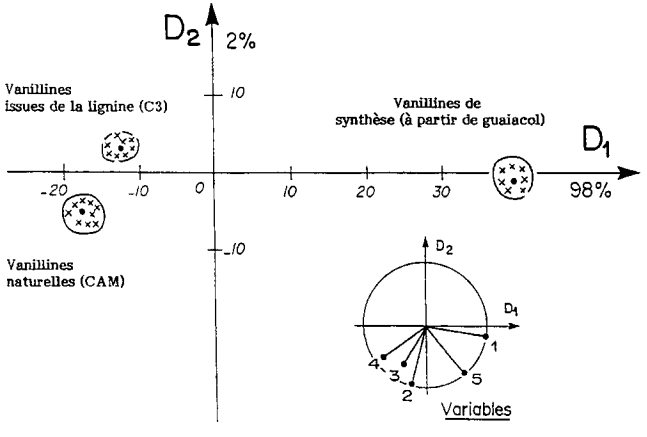
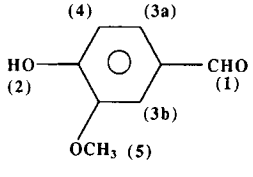


Figure 6 : Identification de l'origine naturelle ou synthétique de l'arôme vanille. Une analyse discriminante fondée sur les paramètres isotopiques de l'hydrogène des sites 1 à 5 de la molécule de vanilline permet de distinger sans ambiguïté, les échantillons de vanilline extraits de la gousse de Vanille (Vanilla Planifolia), des échantillons obtenus soit par synthèse chimique à partir du guaiacol, soit par hemi-synthèse à partir de la lignine. Les sites 3a et 3b, en principe caractérisés par des déplacements chimiques



différents, ne sont pas distingués en RMN du deutérium à 61.4 MHz. Le cercle de corrélation montre que la teneur isotopique du site 1 par exemple est associée au premier facteur alors que le site 2 se manifeste fortement dans le second facteur.

La détermination des fractionnements isotopiques spécifiques par RMN, accompagnée le cas échéant d'une mesure des taux isotopiques globaux par SDM, renforce considérablement les possibilités de discrimination d'origine et ouvre de nouveaux domaines d'investigation. La méthode RMN est particulièrement efficace pour distinguer l'origine synthétique ou naturelle d'un produit. La figure 6 montre, par exemple, que la vanilline extraite de la plante Vanilla Planifolia est distinguée sans ambiguïté de la vanilline de synthèse environ 300 fois moins chère.

Les rapports isotopiques spécifiques déterminés à partir des spectres ^2H de l'anéthole se révèlent aussi d'excellents critères de caractérisation de l'origine botanique, fenouil, badiane ou anis vert du précurseur.

Une analyse factorielle des paramètres isotopiques d'échantillons d'éthanols issus d'une même plante cultivée dans différentes régions du monde met en lumière une influence du climat sur le fractionnement isotopique. Ce comportement, qui peut être rationnalisé en termes d'effets de température et d'humidité, fait de l'empreinte isotopique un critère de caractérisation de l'origine géographique des précurseurs. La figure 7 illustre l'excellente discrimination réalisable par exemple entre des vins produits en Tunisie et en Suisse ou dans la région du Gard, en France.

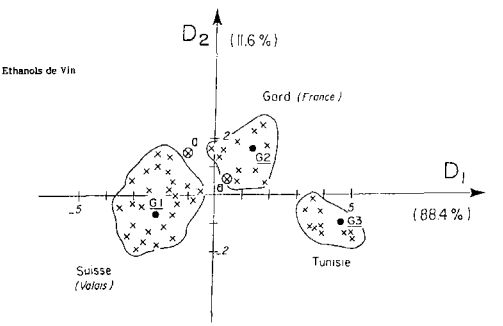


Figure 7 : Reconnaissance de l'origine géographique de vins. Une analyse factorielle discriminante utilisant les variables isotopiques $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$ de l'éthanol et

$(D/H)_W^Q$, $(D/H)_W^S$ de l'eau du vin, montre que des échantillons issus de Tunisie, du Valais en Suisse et du Gard en France peuvent être distingués. Le pouvoir discriminant atteint 100 % pour la Tunisie et 93 % pour la Suisse (2 échantillons sur 30 se situent plus près du centre de gravité du Gard que de celui du Valais). (Diagramme issu de la référence G.J. MARTIN et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 36, p. 316, 1988).

L'influence climatique sur le fractionnement imprime aussi aux paramètres isotopiques, une dépendance temporelle. Pour une même région, un alcool issu de la fermentation de moût de raisin produit au cours d'une année relativement chaude et sèche, se distinguera d'un alcool obtenu au cours d'une année plus froide et humide. Une simulation exploitant les paramètres climatiques peut donc aboutir à une reconnaissance de millésime.

Des procédés de détection du mouillage ou de l'enrichissement par des sucres exogènes, ont aussi été développés. Nous avons évoqué en commençant, la mesure de la chaptalisation des vins, ou addition de sucres exogènes aux moûts de raisin avant fermentation. De nombreuses autres applications sont envisageables sur les mêmes bases : détection de l'adjonction d'eau ou de sucre (betterave, canne...) à des jus de fruit (cf. figure 5), caractérisation de whiskies dits «blended» préparés à partir d'un mélange de malt (orge) et de grain (maïs), identification de bières issues de la fermentation de malt et d'autres grains etc...

Exploitée dans un contexte d'analyse statistique multi-dimensionnelle, la RMN-FINS s'affirme actuellement comme la plus puissante méthode d'inférence d'origine et de caractérisation des parcours chimiques, biochimiques voire technologiques suivis par les produits.

BIBLIOGRAPHIE

Pour un accès à une bibliographie spécialisée, on pourra consulter :

G.J. MARTIN, M.L. MARTIN *dans L'Actualité Chimique*, Octobre 1984, pages 31 à 39.

M.L. MARTIN, G.J. MARTIN *dans NMR Basic Principles and Progress*, Vol. 23, Springer Verlag 1990. (Cette revue contient toutes les références appropriées aux aspects présentés).