

Maisons-Alfort, le 10 mai 2019

Le Directeur général

Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

sur une «Demande d'avis relatif à une autorisation d'essai pour l'utilisation d'urée marquée isotopiquement destinée aux bovins »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le 14 janvier 2019 par la DGCCRF pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis relatif à une autorisation d'essai avec l'utilisation d'urée marquée isotopiquement destinée aux bovins.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'Anses a été saisie par la DGCCRF d'une demande d'autorisation d'essai concernant l'utilisation d'urée marquée à l'azote ^{15}N , afin de déterminer le turnover protéique chez des bovins en croissance sous l'hypothèse que ce turnover est un des éléments déterminant des variations d'efficacité protéique (ndlr Nretenu / Ningéré). Les animaux étant destinés à rejoindre la chaîne alimentaire, il est demandé de se prononcer sur :

- La sécurité d'un essai réalisé dans les conditions décrites par le pétitionnaire ;
- L'évaluation d'effets néfastes potentiels sur la santé humaine, la santé animale et l'environnement.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Alimentation animale » l'instruction de cette saisine.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise (Mai 2003) ».

Le comité d'experts spécialisé « Alimentation animale » a adopté les travaux d'expertise collective ainsi que ses conclusions et recommandations lors de sa séance 9 avril 2019, sur la base du rapport d'un rapporteur et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Anses.

L'expertise s'est appuyée sur l'avis de l'Anses du 3 avril 2014 et l'avis du 28 avril 2016 relatifs aux lignes directrices pour les autorisations d'essais pour les produits non autorisés en alimentation animale, même si la finalité de l'essai n'est pas d'autoriser un additif ultérieurement.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1. Présentation du dossier et objectif de l'essai

3.1.1. Objectif de l'essai

L'objectif de l'essai est l'utilisation de ^{15}N au lieu des méthodes usuelles d'évaluation du turnover protéique impliquant des procédures de cathétérisation, de perfusion de traceurs, et une multiplication des prélèvements sanguins. La méthode utilisée dans la demande d'essai consiste à modifier la composition isotopique du régime *via* l'apport d'urée ^{15}N et à suivre l'enrichissement de cet isotope dans les produits d'excrétion au cours du temps. Le protocole indique qu'une dose de 20 mg d'urée marquée à l'azote ^{15}N sur les deux atomes d'azote (Urea-1,3- $^{15}\text{N}_2$, 98 Atom % ^{15}N) incorporée dans une gélule de gélatine sera distribuée quotidiennement dans la ration de 32 bovins pendant 4 semaines. Après l'arrêt de la distribution d'urée ^{15}N , le suivi du retour à l'équilibre de la teneur en ^{15}N dans les protéines plasmatiques et l'urine permet de calculer le turnover protéique.

3.1.2. Présentation du dossier scientifique et bibliographie

Le dossier contient la demande du pétitionnaire et 17 références bibliographiques.

- ❖ **4 références bibliographiques ne concernent pas directement l'isotope ^{15}N**
 - Fry et Arnold (1982) : un essai concernant le turnover du C au moyen de l'analyse du fractionnement isotopique $\delta^{13}\text{C}$ chez la crevette.
 - Tieszen *et al.*, (1983) : un essai concernant le fractionnement isotopique $\delta^{13}\text{C}$ chez la gerbille.
 - Lobley *et al.*, (2000): un essai étudiant le turnover protéique chez les bovins en croissance à différents niveaux d'alimentation (sans utilisation de ^{15}N).
 - Lobley *et al.*, (2003) : revue bibliographique caractérisant le turn-over protéique dans les compartiments corporels de différentes espèces.

- ❖ **2 revues scientifiques** concernant les principes et méthodologies d'utilisation des isotopes stables en alimentation animale (Cantalapiedra *et al.*, 2018) ou en écologie nutritionnelle (Martinez-del-Rio *et al.*, 2009).

- ❖ **5 publications relatives à la vache laitière**
 - Steele et Daniel (1978). Cet essai quantifie l'abondance naturelle ^{15}N de différents fourrages et le fractionnement isotopique $\delta^{15}\text{N}$ de ces régimes dans

les fèces, l'urine, le sang, et le lait. Des données sont également présentées chez les bovins en croissance.

- Cheng *et al.*, (2011). Cet essai quantifie l'abondance naturelle de ^{15}N de différents régimes (majoritairement à base de fourrages et complémentés ou non par des concentrés) et le fractionnement isotopique $\delta^{15}\text{N}$ de ces régimes pour étudier la partition de l'N ingéré entre l'excrétion (fécale et urinaire) et la production laitière.
- Cheng *et al.*, (2013). Cet essai quantifie l'abondance naturelle ^{15}N d'un régime à base de pâturage et le fractionnement isotopique $\delta^{15}\text{N}$ de ce régime pour caractériser l'efficacité azotée des vaches laitières.
- Cabrita *et al.*, (2014). Cet essai quantifie la relation entre l'efficacité azotée pour la production laitière et l'enrichissement en ^{15}N des caséines du lait lors d'alimentation à base d'ensilage de maïs.
- Cantalapiedra *et al.*, (2015). Cet essai quantifie la relation entre l'efficacité azotée et l'abondance relative $\delta^{15}\text{N}$ de la ration, des fèces, de l'urine, et du lait chez des vaches laitières recevant des régimes différant par la teneur en protéines et la nature des glucides.

❖ **3 publications réalisées chez les bovins en croissance ou le mouton à l'entretien**

- Sutoh *et al.*, (1993). Cet essai quantifie les effets de la modification induite par la fréquence des repas et la supplémentation en saccharose sur l'abondance relative $\delta^{15}\text{N}$ de l'ammoniac ruminal, des bactéries ruminales, des fèces, et de l'urée et des protéines plasmatiques chez le mouton à l'entretien.
- Bahar *et al.*, (2009). Cet essai quantifie par l'utilisation d'urée ^{15}N (0,021 g ^{15}N urée (10 atome %) /kg d'aliment concentré) pendant 138 j le turnover de l'N dans le Longissimus dorsi et le Psoas major chez le bœuf en croissance (500 kg – 600 kg de poids vif).
- Cantalapiedra *et al.*, (2015). Cet essai quantifie la relation entre l'efficacité azotée et l'abondance relative $\delta^{15}\text{N}$ des régimes et celles des protéines plasmatiques chez des taurillons (360 à 700 kg de poids) alimentés par de l'ensilage de maïs ou de l'ensilage d'herbe, supplémentés ou non en aliments concentrés pour obtenir différents niveaux de croissance.

❖ **1 publication chez le rat** (MacAvoy *et al.*, 2005) qui quantifie la contribution respective des processus de croissance et d'entretien au turnover protéique total, par l'étude de l'abondance relative de ^{15}N dans le foie, le sang et le muscle après un changement de régime.

❖ **2 publications concernant l'évaluation de la sécurité d'utilisation des isotopes stables**

- Jones et Leatherdale (1991). Cette revue suggère que, du fait de la différence de masse entre le traceur ^{15}N et l'élément le plus abondant ^{14}N , un effet spécifique de l'isotope sur le métabolisme peut exister. L'effet le plus significatif est suggéré lorsque l'écart de masse entre les différents isotopes est important, comme dans le cas du Deuterium (2H) vs Protium (1H). Dans le cas spécifique du ^{15}N , la teneur en ^{15}N de tissus humains lors d'études biomédicales utilisant cet isotope peut atteindre jusqu'à 120 mg/kg poids.

Cette revue pointe néanmoins qu'il n'existait pas à cette date d'études concernant la toxicité des isotopes stables de l'azote.

- Koletzko *et al.*, (1997). Cette revue évalue chez l'homme et l'animal les effets biologiques et les effets indésirables de l'utilisation des isotopes stables. Elle suggère également que des différences de comportements biochimiques et physiques entre les isotopes sont probablement liées à l'amplitude de la différence de masse entre l'isotope naturel le plus abondant et l'isotope 'lourd'. Cette différence de masse pouvant induire des effets négatifs n'est pas quantifiée, mais il est suggéré que pour le ^{15}N , la faible différence de masse entre ^{15}N et ^{14}N (1 uma) peut expliquer l'absence d'effet indésirable. Ainsi, dans l'espèce humaine, l'apport de 25 à 43 mg ^{15}N /kg poids induit une absorption de 10–40 mg ^{15}N /kg poids, et une augmentation du pool de ^{15}N corporel de 40 mg /kg poids (soit +40% environ) sans effet secondaire.

Le pétitionnaire fait également référence au règlement UE 839/2012 fixant les conditions d'utilisation de l'urée en tant qu'additif dans l'alimentation des ruminants, et précise la dose maximale d'utilisation de l'urée de 8800 mg/kg d'aliment complet.

Par ailleurs dans une revue plus récente (non présentée par le pétitionnaire), Scheleken *et al.*, (2011) indiquent qu'aucune étude concernant la toxicologie des isotopes stables de poids moléculaire élevé ne peut être trouvée dans la littérature, à l'exception des données présentées par Pons *et al.*, (1999). Cette dernière étude rapporte en particulier l'absence d'effet de l'isotope ^{13}C chez l'embryon de souris à différents stades de développement après perfusion de ^{13}C -glucose, et que des embryons de souris incubés *in vitro* dans un milieu enrichi en ^{13}C présentent un développement normal *in vitro* et *in vivo* en dépit d'un enrichissement tissulaire de 15 à 20% pour le ^{13}C (Spielman *et al.*, 1986). Scheleken *et al.*, (2011) concluent que, s'il n'est pas possible de considérer sans démonstration expérimentale que les isotopes stables ont une sécurité sans limite, leur utilisation en pratique sur des milliers d'études chez l'homme se sont avérées ne pas poser de risque significatifs.

3.2 L'urée dans les conditions de l'essai

3.2.1 Utilisation de l'urée en pratique

La dose d'urée est très inférieure à celle fixée par le règlement UE 839/2012, il n'y a donc pas de risque toxique per se quant à l'apport de 20 mg d'urée quotidiennement pendant toute la durée de l'essai pour des animaux de tels poids.

3.2.2 Enrichissement isotopique de la ration par rapport aux teneurs ^{15}N naturelles

L'abondance naturelle¹ du ^{15}N dans les aliments utilisés en élevage est de l'ordre de 0 à 8‰ (Steele and Daniel, 1978 ; Sutoh *et al.*, 1993 ; Cheng *et al.*, 2011), et l'utilisation de 20 mg de ^{15}N urée conduirait à un enrichissement isotopique² maximal de 12‰ qui peut être

¹ L'abondance naturelle est le pourcentage en nombre d'atomes, pour un élément donné, de chacun des isotopes par rapport à l'ensemble des isotopes naturels.

² L'enrichissement isotopique en ^{15}N (note $\delta^{15}\text{N}$) caractérise le rapport $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ d'un échantillon (aliment, fèces, urine, lait...) relativement au rapport $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ dans une matrice standard (air). IL est défini par le ratio $(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (échantillon) - $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (air)) / $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (air); il est exprimé en 'pour mille' (‰).

considéré comme faible en comparaison de la teneur prévisible (3 ‰) des aliments avant apport d'urée ¹⁵N.

3.2.3 Enrichissement isotopique des tissus animaux

Dans les conditions expérimentales décrites dans le protocole, l'enrichissement isotopique des tissus en ¹⁵N varierait, selon le calcul du pétitionnaire, de 14 à 15‰ pour les tissus à croissance rapide (ex : tissus viscéraux), et de 8 à 10‰ pour les tissus à renouvellement lent (muscles), lorsqu'on prend en compte les données classiquement admises de taux de renouvellement de ces tissus (Lobley *et al.*, 1980 ; 1983 ; Bahar *et al.*, 2009). Ces données conduisent à un enrichissement modeste en comparaison des teneurs usuellement mesurées dans les tissus animaux (de l'ordre de 6‰, Cheng *et al.*, 2013 ; Cabrita *et al.*, 2014).

3.3 Tolérance pour l'animal cible

Aucune donnée spécifique concernant la santé des animaux consommant l'urée isotopique n'est fournie dans le dossier. Cependant, l'enrichissement isotopique en ¹⁵N, et ce quel que soit le tissu considéré, reste faible au regard de l'abondance isotopique naturelle en ¹⁵N des tissus.

En conclusion, dans les conditions décrites dans le protocole, le risque pour la santé animale peut être considéré comme négligeable.

3.4 Sécurité pour le consommateur

Le pétitionnaire présente les données de Koletzko *et al.*, (1997) et de Jones et Leatherdale (1991) et considère ainsi que le fait d'utiliser le ¹³C-urée en médecine clinique (détection d'*Helicobacter pylori* dans l'estomac humain) permet de conclure que le ¹³C urée est sans danger pour l'Homme. Néanmoins, ces données ne permettent pas de statuer de façon univoque sur la santé humaine, dans la mesure où ces références :

- n'évoquent que les variations de la teneur en ¹⁵N du pool corporel chez l'Homme après apport de ¹⁵N (jusqu' à +40%) et peu les risques pour la santé humaine.
- font une analogie entre l'isotope ¹⁵N et l'isotope ¹³C dont certaines références montrent l'innocuité.

Cependant,

- la revue bibliographique de Scheleken *et al.* (2011) montre que l'utilisation de ¹⁵N dans des centaines d'études s'est avérée sans effets indésirables.
- Les calculs de données d'enrichissement en ¹⁵N dans certains tissus animaux montrent que l'utilisation de ¹⁵N-urée induit une teneur en ¹⁵N inférieure à celles observées naturellement dans des denrées animales usuellement consommées.
- Le modèle de cinétique de déplétion tissulaire du ¹⁵N (Martinez del Rio *et al.*, 2009) permet de calculer qu'après 7 jours les teneurs en ¹⁵N des protéines tissulaires sont non différentes de celles observées naturellement. Par ailleurs, dans le cadre de l'essai objet de la demande, les bovins seront

abattus 120 jours après l'arrêt d'apport de ^{15}N -urée, ce qui devrait conduire à des teneurs tissulaires en ^{15}N équivalentes à celles observées naturellement.

En conclusion, dans les conditions décrites dans le protocole, le risque pour la santé humaine peut être considéré comme négligeable.

3.5 Sécurité pour l'environnement

Aucune donnée n'est fournie par le pétitionnaire.

L'évaluation de l'impact environnemental de l'apport d'urée ^{15}N a été réalisée sur la base des hypothèses suivantes :

- L'ensemble des déjections (fèces + urine) des 32 taurillons cumulées pendant les 28 jours d'apport d'urée ^{15}N est épandu sur 1 ha de terre et diffuse sur une profondeur de 30 cm (densité 1250 kg / m³). Cet épandage peut s'effectuer sur une terre arable (teneur en N total= 1 g N/kg sol), ou sur une surface toujours en herbe (pâturage, teneur en N total = 2,5 g N/kg sol), constituant donc un pool d'azote total du sol de 3750 kg et 9375 kg, respectivement.
- Avant apport de déjections enrichies en ^{15}N , les enrichissements isotopiques naturels ($\delta^{15}\text{N}$) de ces sols ont été fixés à 2 valeurs extrêmes ($\delta^{15}\text{N} = 1$ vs 8 ‰, par rapport à l'air dont le ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ est fixé à 0,0036765) pour chacun des 2 types de sols, caractérisant les variabilités d'enrichissement des sols français. Dans ces conditions, les pools de ^{15}N présents dans le sol arable avant apport de déjections enrichies en ^{15}N sont de 13,75 kg et 13,85 kg (pour des $\delta^{15}\text{N} = 1$ vs 8 pour mille), et ceux dans la surface en herbe sont de 34,38 et 34,61 kg. En conséquence, les pools de ^{14}N présents sont respectivement de 3736,25 kg et 3736,15 kg dans le sol arable, et 9340,62 et 9340,39 kg dans la surface en herbe.
- Les taurillons ingèrent 7 kg MS par jour, d'une ration à 150 g de matières azotées totales (soit 24 g N total)/kg MS et rejettent par les voies fécale et urinaire 2/3 de l'azote ingéré. L'enrichissement isotopique maximal de l'azote après administration d'urée ^{15}N est fixé à 10 ‰ (Fouillet *et al.*, communication personnelle). Dans ces conditions, chaque taurillon excrète quotidiennement 111,59 g ^{14}N et 0,414 g ^{15}N , soit 99,98 kg d' ^{14}N et 0,37 kg ^{15}N pour l'ensemble des 32 taurillons en essai durant les 28j (^{15}N issu de l'urée et du régime).
- En conséquence, après apport d'urée ^{15}N à 32 taurillons pendant 28 j, les pools du ^{15}N du sol arable sont de 14,12 kg et 14,22 kg (en fonction de leur enrichissement isotopique initial) et ceux du ^{14}N sont de 3836,23 et 3836,13 kg conduisant à des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ de 1,23‰ (vs 1 ‰ avant apport des déjections), et de 8,05‰ (vs 8‰ avant apport de déjections). Les pools de ^{15}N des surfaces en herbe sont donc de 14,12 et 14,22 kg (en fonction de leur enrichissement isotopique naturel initial) et eux du ^{14}N sont 34,75 et 34,99 kg, conduisant à des valeurs de de ^{15}N de 1,10‰ (vs 1‰ avant apport des déjections), et de 8,02‰ (vs 8‰ avant apport de déjections).

L'enrichissement isotopique en ^{15}N apparait donc négligeable après apport de déjections enrichies en ^{15}N quelle que soit la teneur en azote du sol (surface en herbe vs terre arable) et quel que soit l'enrichissement isotopique initial (1‰ vs 8‰).

Par ailleurs, cette estimation constitue une évaluation maximale du risque, dans la mesure où :

- La valeur d'enrichissement des déjections après apport d'urée ^{15}N est une valeur maximale, contribuant à maximiser l'apport de ^{15}N à l'environnement ;
- Le prélèvement de ^{15}N par les plantes du sol n'a pas été évalué, conduisant à une surestimation du ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ du sol.

En conclusion, dans les conditions décrites dans le protocole, le risque pour l'environnement peut être considéré comme négligeable.

3.6 Sécurité pour le manipulateur

L'utilisation de l'urée isotopique n'est pas spécifique par rapport à celle de l'urée standard. Les phrases de risque appliquées à l'utilisation de l'urée standard s'appliquent aussi à l'urée marquée isotopiquement.

3.7 Conclusion du CES:

En conclusion, l'essai présente un risque négligeable pour les ruminants, le consommateur, le manipulateur et l'environnement dans les conditions décrites dans le dossier.

Cet avis n'évalue pas la pertinence scientifique de l'essai.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES « Alimentation animale ».

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Alimentation animale, autorisation d'essai, enrichissement azote isotopique, ruminant
Feed, trial autorisation, isotopic nitrogen enrichment, ruminant

BIBLIOGRAPHIE

- Abimorad, E. G., Ducatti, C., Castellani, D., Jomori, R. K., Portella, M. C., & Carneiro, D. J. (2014). The use of stable isotopes to investigate the effects of supplemental lysine and methionine on protein turnover and amino acid utilization in pacu, *Piaractus mesopotamicus*, juveniles. *Aquaculture*, 433, 119-124.
- Bahar, B., Moloney, A. P., Monahan, F. J., Harrison, S. M., Zazzo, A., Scrimgeour, C. M., I. S. Begley & Schmidt, O. (2009). Turnover of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: Implications for isotopic authentication of meat. *Journal of Animal Science*, 87(3), 905-913.
- Bahar, B., Harrison, S. M., Moloney, A. P., Monahan, F. J., & Schmidt, O. (2014). Isotopic turnover of carbon and nitrogen in bovine blood fractions and inner organs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(9), 1011-1018.
- Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Dewhurst, R. J. (2014). Relationship between the efficiency of utilization of feed nitrogen and ¹⁵N enrichment in casein from lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 97(11), 7225-7229.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marty, I., Sepchat, B., Agabriel, J., Huneau, J. F., & Fouillet, H. (2015). Diet–animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition*, 113(7), 1158-1169.
- Cantalapiedra-Hijar G., M. Abo-Ismael, G. C. Carstens, L. L. Guan, R. Hegarty, D. Kenny, M. McGee, G. Plastow, A. Relling, I. Ortigues-Marty. 2018. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency in growing beef cattle. *Animal*.
- Cheng, L., Kim, E. J., Merry, R. J., & Dewhurst, R. J. (2011). Nitrogen partitioning and isotopic fractionation in dairy cows consuming diets based on a range of contrasting forages. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 2031-2041.
- Cheng, L., Sheahan, A. J., Gibbs, S. J., Rius, A. G., Kay, J. K., Meier, S., & Roche, J. R. (2013). Nitrogen isotopic fractionation can be used to predict nitrogen-use efficiency in dairy cows fed temperate pasture. *Journal of Animal Science*, 91(12), 5785-5788.
- Fry and Arnold, 1982.
- Fouillet *et al.*, communication personnelle.
- Fry, B., & Arnold, C. (1982). Rapid ¹³C/¹²C turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia*, 54(2), 200-204.
- Jones, P. J., & Leatherdale, S. T. (1991). Stable isotopes in clinical research: safety reaffirmed. *Clinical Science*, 80(4), 277-280.
- Koletzko, B., Sauerwald, T., & Demmelmair, H. (1997). Safety of stable isotope use. *European journal of pediatrics*, 156(1), S12-S17.
- Lobley, G. E. (2003). Protein turnover—what does it mean for animal production?. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(3), 327-340.
- Lobley, G. E., Sinclair, K. D., Grant, C. M., Miller, L., Mantle, D., Calder, A. G., & Maltin, C. A. (2000). The effects of breed and level of nutrition on whole-body and muscle protein metabolism in pure-bred Aberdeen Angus and Charolais beef steers. *British Journal of Nutrition*, 84(3), 275-284.

- MacAvoy, S. E., Macko, S. A., & Arneson, L. S. (2005). Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 83(5), 631-641.
- Martínez del Río, C., Wolf, N., Carleton, S. A., & Gannes, L. Z. (2009). Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews*, 84(1), 91-111.
- Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G., & Slade, N. A. (1983). Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*, 57(1-2), 32-37.
- Steele, K. W., & Daniel, R. M. (1978). Fractionation of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of ^{15}N for tracer studies. *The Journal of Agricultural Science*, 90(1), 7-9.
- Sutoh, M., Obara, Y., & Yoneyama, T. (1993). The effects of feeding regimen and dietary sucrose supplementation on natural abundance of ^{15}N in some components of ruminal fluid and plasma of sheep. *Journal of Animal Science*, 71(1), 226-231.
- Schellekens RC, Stellaard F, Woerdenbag HJ, Frijlink HW, and Kosterink JG. (2011). Applications of stable isotopes in clinical pharmacology. *Br J Clin Pharmacol*. 72(6):879-97.
- Pons, G. and Rey E. (1999). Stable Isotopes Labeling of Drugs in Pediatric Clinical Pharmacology. *Pediatric*, 104: 633-9.
- Spielman H, Nau H. (1986). Embryotoxicity of stable isotopes and use of stable isotopes in studies of teratogenetic mechanisms. In: Browne TR, Baillie TA, eds. *Proceedings of the Fifth Symposium on Frontiers of Pharmacology. Applications of Stable Isotopes in Pharmacology*. *J Clin Pharmacol*, 26:474-480.