



COLLECTION SANTÉ HUMAINE DE L'AIEA

N° 12

Introduction à l'évaluation
de la composition corporelle
par dilution de deutérium
grâce à l'analyse
d'échantillons de salive par
spectroscopie infrarouge
à transformée de Fourier



IAEA

Agence internationale de l'énergie atomique

PUBLICATIONS DANS LA COLLECTION SANTÉ HUMAINE DE L'AIEA

Le mandat du programme de la santé humaine tient son origine dans l'article II du Statut de l'AIEA, qui stipule que « l'Agence s'efforce de hâter et d'accroître la contribution de l'énergie atomique à la paix, la santé et la prospérité dans le monde entier ». Le programme de la santé humaine a pour principal objet de renforcer la capacité des États Membres de l'AIEA à satisfaire leurs besoins en matière de prévention, de diagnostic et de traitement des problèmes de santé grâce à la mise au point et à l'application de techniques nucléaires dans un cadre d'assurance de la qualité.

Les publications paraissant dans la collection Santé humaine de l'AIEA traitent des domaines suivants : la médecine radiologique, y compris la radiologie diagnostique, la médecine nucléaire diagnostique et thérapeutique, et la radiothérapie ; la dosimétrie et la radiophysique médicale ; et les techniques faisant appel aux isotopes stables et autres applications nucléaires dans le domaine de la nutrition. Ces publications intéressent un grand nombre de lecteurs et sont destinées aux praticiens, aux chercheurs et à d'autres professionnels. Des experts internationaux aident le Secrétariat de l'AIEA à les rédiger et les réviser. Certaines des publications paraissant dans la présente collection peuvent aussi être approuvées ou coparrainées par des organisations internationales et des associations professionnelles actives dans les domaines pertinents.

Cette collection comprend deux catégories de publications :

COLLECTION SANTÉ HUMAINE DE L'AIEA

Cette catégorie de publications présente des analyses ou des informations qui revêtent un caractère consultatif, comme des guides, des codes et des normes de pratique, et des manuels d'assurance de la qualité. Des monographies et du matériel didactique de haut niveau, comme des manuels de troisième cycle, sont aussi publiés dans cette collection.

RAPPORTS SUR LA SANTÉ HUMAINE DE L'AIEA

Les rapports sur la santé humaine complètent les informations publiées dans la collection Santé humaine de l'AIEA dans le domaine de la médecine radiologique, de la dosimétrie et de la radiophysique médicale, et de la nutrition. Ils comprennent des rapports de réunions techniques, les résultats des projets de recherche coordonnée de l'AIEA, des rapports intermédiaires sur des projets de l'AIEA, et du matériel didactique compilé pour des cours de l'AIEA traitant de sujets liés à la santé humaine. Dans certains cas, ces rapports peuvent servir de documents d'appui à des publications parues dans la collection Santé humaine de l'AIEA.

Toutes ces publications peuvent être téléchargées gratuitement sur le site web de l'AIEA :
<http://www.iaea.org/Publications/index.html>

Pour de plus amples informations :

Unité de la promotion et de la vente
Agence internationale de l'énergie atomique
Centre international de Vienne
B.P. 100
1400 Vienne (Autriche)

Les lecteurs sont invités à partager leurs impressions sur ces publications. Les informations peuvent être communiquées sur le site web de l'AIEA, par courrier à l'adresse mentionnée plus haut ou par courriel à :

Official.Mail@iaea.org

INTRODUCTION À L'ÉVALUATION
DE LA COMPOSITION CORPORELLE
PAR DILUTION DE DEUTÉRIUM
GRÂCE À L'ANALYSE
D'ÉCHANTILLONS DE SALIVE
PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE
À TRANSFORMÉE DE FOURIER

Les États ci-après sont Membres de l'Agence internationale de l'énergie atomique :

AFGHANISTAN	GRÈCE	PALAOS
AFRIQUE DU SUD	GUATEMALA	PANAMA
ALBANIE	HAÏTI	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE
ALGÉRIE	HONDURAS	PARAGUAY
ALLEMAGNE	HONGRIE	PAYS-BAS
ANGOLA	ÎLES MARSHALL	PÉROU
ARABIE SAOUDITE	INDE	PHILIPPINES
ARGENTINE	INDONÉSIE	POLOGNE
ARMÉNIE	IRAN, RÉP. ISLAMIQUE D'	PORTUGAL
AUSTRALIE	IRAQ	QATAR
AUTRICHE	IRLANDE	RÉPUBLIQUE ARABE
AZERBAÏDJAN	ISLANDE	SYRIENNE
BAHREÏN	ISRAËL	RÉPUBLIQUE
BANGLADESH	ITALIE	CENTRAFRICAINE
BÉLARUS	JAMAÏQUE	RÉPUBLIQUE DE MOLDOVA
BELGIQUE	JAPON	RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE
BELIZE	JORDANIE	DU CONGO
BÉNIN	KAZAKHSTAN	RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE
BOLIVIE	KENYA	POPULAIRE LAO
BOSNIE-HERZÉGOVINE	KIRGHIZISTAN	RÉPUBLIQUE DOMINICAINE
BOTSWANA	KOWEÏT	RÉPUBLIQUE TCHÈQUE
BRÉSIL	LESOTHO	RÉPUBLIQUE-UNIE DE
BULGARIE	LETONIE	TANZANIE
BURKINA FASO	L'EX-RÉPUBLIQUE YOUNGO-	ROUMANIE
BURUNDI	SLAVE DE MACÉDOINE	ROYAUME-UNI
CAMBODGE	LIBAN	DE GRANDE-BRETAGNE
CAMEROUN	LIBÉRIA	ET D'IRLANDE DU NORD
CANADA	LIBYE	RWANDA
CHILI	LIECHTENSTEIN	SAINT-SIÈGE
CHINE	LITUANIE	SÉNÉGAL
CHYPRE	LUXEMBOURG	SERBIE
COLOMBIE	MADAGASCAR	SEYCHELLES
CONGO	MALAISIE	SIERRA LEONE
CORÉE, RÉPUBLIQUE DE	MALAWI	SINGAPOUR
COSTA RICA	MALI	SLOVAQUIE
CÔTE D'IVOIRE	MALTE	SLOVÉNIE
CROATIE	MAROC	SOUDAN
CUBA	MAURICE	SRI LANKA
DANEMARK	MAURITANIE,	SUÈDE
DOMINIQUE	RÉP. ISLAMIQUE DE	SUISSE
ÉGYPTE	MEXIQUE	SWAZILAND
EL SALVADOR	MONACO	TADJIKISTAN
ÉMIRATS ARABES UNIS	MONGOLIE	TCHAD
ÉQUATEUR	MONTÉNÉGRO	THAÏLANDE
ÉRYTHRÉE	MOZAMBIQUE	TOGO
ESPAGNE	MYANMAR	TRINITÉ-ET-TOBAGO
ESTONIE	NAMIBIE	TUNISIE
ÉTATS-UNIS	NÉPAL	TURQUIE
D'AMÉRIQUE	NICARAGUA	UKRAINE
ÉTHIOPIE	NIGER	URUGUAY
FÉDÉRATION DE RUSSIE	NIGERIA	VENEZUELA,
FIDJI	NORVÈGE	RÉP. BOLIVARIENNE DU
FINLANDE	NOUVELLE-ZÉLANDE	VIET NAM
FRANCE	OMAN	YÉMEN
GABON	OUGANDA	ZAMBIE
GÉORGIE	OUZBÉKISTAN	ZIMBABWE
GHANA	PAKISTAN	

Le Statut de l'Agence a été approuvé le 23 octobre 1956 par la Conférence sur le Statut de l'AIEA, tenue au Siège de l'Organisation des Nations Unies, à New York ; il est entré en vigueur le 29 juillet 1957. L'Agence a son Siège à Vienne. Son principal objectif est « de hâter et d'accroître la contribution de l'énergie atomique à la paix, la santé et la prospérité dans le monde entier ».

COLLECTION
NORMES DE SÛRETÉ DE L'AIEA N° 12

INTRODUCTION À L'ÉVALUATION
DE LA COMPOSITION CORPORELLE
PAR DILUTION DE DEUTÉRIUM
GRÂCE À L'ANALYSE
D'ÉCHANTILLONS DE SALIVE
PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE
À TRANSFORMÉE DE FOURIER

AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE
VIENNE, 2013

DROIT D'AUTEUR

Toutes les publications scientifiques et techniques de l'AIEA sont protégées par les dispositions de la Convention universelle sur le droit d'auteur adoptée en 1952 (Berne) et révisée en 1972 (Paris). Depuis, le droit d'auteur a été élargi par l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle (Genève) à la propriété intellectuelle sous forme électronique. La reproduction totale ou partielle des textes contenus dans les publications de l'AIEA sous forme imprimée ou électronique est soumise à autorisation préalable et habituellement au versement de redevances. Les propositions de reproduction et de traduction à des fins non commerciales sont les bienvenues et examinées au cas par cas. Les demandes doivent être adressées à la Section d'édition de l'AIEA :

Unité de la promotion et de la vente, Section d'édition
Agence internationale de l'énergie atomique
Centre international de Vienne
B.P. 100
1400 Vienne, Autriche
télécopie : +43 1 2600 29302
téléphone : +43 1 2600 22417
courriel : sales.publications@iaea.org
<http://www.iaea.org/books>

© AIEA, 2013

Imprimé par l'AIEA en Autriche
Décembre 2013
STI/PUB/1450

INTRODUCTION À L'ÉVALUATION
DE LA COMPOSITION CORPORELLE
PAR DILUTION DE DEUTÉRIUM
GRÂCE À L'ANALYSE
D'ÉCHANTILLONS DE SALIVE
PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE
À TRANSFORMÉE DE FOURIER
AIEA, VIENNE, 2013
STI/PUB/1450
ISBN 978-92-0-214513-9
ISSN 2075-3772

AVANT-PROPOS

Depuis de nombreuses années, l'AIEA promeut une utilisation plus large des techniques qui reposent sur des isotopes stables pour évaluer la composition corporelle dans différents groupes de population afin de traiter des questions prioritaires de nutrition qui relèvent de la santé publique dans les États Membres. L'objectif est de soutenir des projets nationaux ou régionaux de nutrition par l'intermédiaire du programme de coopération technique et des projets de recherche coordonnée de l'AIEA. Plus particulièrement, au cours de ces dernières années, un accès croissant à l'analyse de l'enrichissement en deutérium par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) s'est traduit par une utilisation accrue de cette technique en Afrique, en Amérique latine et en Asie.

La présente publication a été réalisée par un groupe international d'experts dans le but de fournir des indications pratiques sur l'application de cette technique lorsque l'analyse de l'enrichissement en deutérium d'échantillons de salive doit être effectuée par spectroscopie IRTF. Elle intéresse spécifiquement les nouveaux utilisateurs de cette méthode, par exemple des nutritionnistes, des chimistes analystes ou d'autres professionnels. On trouvera des informations plus détaillées sur le cadre théorique et l'application pratique des techniques les plus modernes qui permettent de surveiller des changements de composition corporelle dans une publication de l'AIEA intitulée *Assessment of Body Composition and Total Energy Expenditure in Humans Using Stable Isotope Techniques* (n° 3 de la collection Santé humaine de l'AIEA).

L'AIEA remercie les personnes qui ont le plus contribué à l'élaboration de la présente publication en partageant leurs compétences techniques et leur longue expérience dans le domaine des techniques qui reposent sur des isotopes stables en nutrition : L. Bluck (Royaume-Uni), C. Slater (Royaume-Uni) et M. E. Valencia (Mexique).

La présente publication a été établie sous la responsabilité de L. Davidsson, de la Division de la santé humaine.

NOTE DE L'ÉDITEUR

Bien que l'exactitude des informations contenues dans la présente publication ait fait l'objet d'un soin particulier, ni l'AIEA, ni ses États Membres n'assument une quelconque responsabilité pour les conséquences éventuelles de leur utilisation.

L'emploi d'appellations particulières pour désigner des pays ou des territoires n'implique de la part de l'éditeur, l'AIEA, aucune prise de position quant au statut juridique de ces pays ou territoires, ou de leurs autorités et institutions, ni quant au tracé de leurs frontières.

La mention de noms de sociétés ou de produits particuliers (qu'ils soient ou non signalés comme marques déposées) n'implique aucune intention d'empiéter sur des droits de propriété, et ne doit pas être considérée non plus comme valant approbation ou recommandation de la part de l'AIEA.

L'AIEA n'assume aucune responsabilité quant à la persistance ou l'exactitude des adresses URL de sites web externes ou de tiers mentionnées dans le présent rapport et ne peut garantir que le contenu desdits sites est ou demeurera exact ou approprié.

TABLE DES MATIÈRES

1.	INTRODUCTION	1
1.1.	Généralités	1
1.2.	Objectif	1
1.3.	Personnes concernées	1
1.4.	Structure	1
2.	GÉNÉRALITÉS	2
2.1.	Composition corporelle	2
2.2.	Eau corporelle totale	2
2.3.	Deutérium	3
2.3.1.	Analyse de l'enrichissement de l'eau corporelle en deutérium	4
2.4.	Différences entre les techniques d'équilibration et de rétroextrapolation pour l'estimation de l'eau corporelle totale	4
3.	TECHNIQUE DE L'ÉQUILIBRATION UTILISÉE POUR ESTIMER L'EAU CORPORELLE TOTALE PAR DILUTION DE DEUTÉRIUM	5
3.1.	Résumé	5
3.1.1.	Calcul de l'ECT	6
3.2.	Hypothèses associées à cette technique	6
3.2.1.	Hypothèse 1 : L'eau deutérée ne se diffuse que dans l'eau corporelle	7
3.2.2.	Hypothèse 2 : L'eau deutérée se répartit dans les mêmes proportions dans tous les compartiments eau de l'organisme	7
3.2.3.	Hypothèse 3 : L'équilibration de l'eau deutérée est atteinte rapidement	8
3.2.4.	Hypothèse 4 : Il n'y a pas de perte d'eau deutérée ou d'eau corporelle durant la période d'équilibration	9
3.3.	Estimation de l'ECT chez le nourrisson	10
3.4.	Hydratation de la masse maigre	10
3.4.1.	Variation de l'hydratation de la masse maigre chez le nourrisson et l'enfant	11

3.4.2.	Variation de l'hydratation de la masse maigre durant la grossesse et l'allaitement	11
4.	PROCÉDURES	13
4.1.	Planification de l'étude	13
4.1.1.	Éthique	13
4.1.2.	Préparation de la fiche de données du participant	14
4.1.3.	Étude pilote	15
4.1.4.	Calcul de la taille de l'échantillon	16
4.2.	Préparation et stockage des doses d'eau deutérée	17
4.2.1.	Matériel	17
4.2.2.	Préparation d'une dose pour un adulte	18
4.2.3.	Préparation d'une dose pour un enfant	19
4.2.4.	Stockage des doses	22
4.3.	Mesure de l'ECT	23
4.3.1.	Mesures anthropométriques	24
4.3.2.	Administration d'une dose	28
4.3.3.	Consommation de nourriture et de boissons et activité physique durant la période d'équilibration	30
4.3.4.	Prélèvement d'un échantillon de salive	31
5.	ANALYSE DE L'ENRICHISSEMENT EN DEUTÉRIUM PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER	37
5.1.	Le laboratoire d'IRTF	38
5.1.1.	Nettoyage du spectromètre IRTF	38
5.2.	Préparation de l'étalon	38
5.2.1.	Durée de conservation des étalons	40
5.3.	Construction d'une courbe étalon	41
5.4.	Utilisation du spectromètre IRTF	42
5.4.1.	Spectre IRTF classique	44
5.5.	Le bloc cellule scellé	45
5.5.1.	Entretien des cellules	47
5.6.	Remplissage d'une cellule de spectromètre IRTF	47
5.6.1.	Introduction	47
5.6.2.	Méthode recommandée pour remplir une cellule de spectromètre IRTF	48

6.	CALCUL DE LA COMPOSITION CORPORELLE	49
6.1.	Exemples de calcul	49
7.	CONTRÔLE DE LA QUALITÉ	51
7.1.	Étalonnage du spectromètre	51
7.2.	Précision des analyses	51
7.3.	Variations de mesure	51
7.4.	Vérification des résultats	52
7.5.	Détection des valeurs aberrantes	52
8.	RÉCAPITULATIF DES OPÉRATIONS ESSENTIELLES À EFFECTUER POUR QUE LES DONNÉES SOIENT DE BONNE QUALITÉ	54
9.	LISTE DE QUESTIONS-RÉPONSES FRÉQUENTES	56
APPENDICE I :	INFORMATIONS GÉNÉRALES CONCERNANT LA SÛRETÉ DE L'EAU DEUTÉRÉE	59
APPENDICE II :	SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER	62
APPENDICE III :	EXEMPLE DE FICHE DE PRÉLÈVEMENT UTILISÉE POUR ESTIMER L'ECT PAR DILUTION D'EAU DEUTÉRÉE	70
APPENDICE IV :	LISTE DE MATÉRIEL	71
APPENDICE V :	FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE	73
GLOSSAIRE		77
RÉFÉRENCES		81
AUTRES OUVRAGES À CONSULTER		83
PERSONNES AYANT COLLABORÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN		84

1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS

Depuis de nombreuses années, l'AIEA promeut une utilisation plus large des techniques qui reposent sur des isotopes stables pour évaluer la composition corporelle dans différents groupes de population afin de traiter des questions prioritaires de nutrition qui relèvent de la santé publique dans les États Membres. L'objectif est de soutenir des projets nationaux ou régionaux de nutrition par l'intermédiaire du programme de coopération technique et des projets de recherche coordonnée de l'AIEA. Plus particulièrement, au cours de ces dernières années, un accès croissant à l'analyse de l'enrichissement en deutérium par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) s'est traduit par une utilisation accrue de cette technique en Afrique, en Amérique latine et en Asie.

1.2. OBJECTIF

La présente publication a été réalisée par un groupe international d'experts dans le but de fournir des indications pratiques sur l'application de cette technique lorsque l'analyse de l'enrichissement en deutérium d'échantillons de salive doit être effectuée par spectroscopie IRTF.

1.3. PERSONNES CONCERNÉES

La présente publication intéresse les nouveaux utilisateurs de cette méthode, par exemple des nutritionnistes, des chimistes analystes ou d'autres professionnels. On trouvera des informations plus détaillées sur le cadre théorique et l'application pratique des techniques les plus modernes qui permettent de surveiller des changements de composition corporelle dans une publication de l'AIEA intitulée *Assessment of Body Composition and Total Energy Expenditure in Humans Using Stable Isotope Techniques* (n° 3 de la collection Santé humaine de l'AIEA).

1.4. STRUCTURE

À la suite de la présente introduction, la section 2 définit les principaux termes et notions. La section 3 expose la technique d'équilibration utilisée pour

estimer l'eau corporelle totale par dilution de deutérium. La section 4 décrit en détail les étapes et les procédures associées à la méthode de dilution de deutérium appliquée afin d'évaluer l'eau corporelle totale. La section 5 présente l'analyse de l'enrichissement en deutérium par spectroscopie IRTF. La section 6 explique comment la composition corporelle est calculée. La section 7 se penche sur les questions de contrôle de la qualité tandis que la section 8 récapitule les opérations essentielles à effectuer pour que les données obtenues soient de bonne qualité. La section 9 contient une liste de questions-réponses fréquentes sur ce sujet. L'appendice I donne des informations générales sur la sûreté de l'eau deutérée tandis que l'appendice II décrit les principes de la spectroscopie IRTF. L'appendice III contient une fiche de prélèvement utilisée pour évaluer l'eau corporelle totale par dilution d'eau deutérée et l'appendice IV présente une liste du matériel nécessaire. Pour finir, l'appendice V explique le fractionnement isotopique.

2. GÉNÉRALITÉS

2.1. COMPOSITION CORPORELLE

Seul, le poids corporel constitue un indicateur assez médiocre de l'état de santé et nutritionnel d'une personne. En revanche, la composition corporelle, qui s'intéresse aux différents éléments qui contribuent au poids corporel d'un individu, est un chiffre plus significatif. Le corps humain est souvent séparé en deux parties : la masse grasse et la masse maigre. C'est ce que l'on appelle le « modèle à deux compartiments ».

2.2. EAU CORPORELLE TOTALE

L'eau est le principal constituant du corps humain. À la naissance, ce dernier contient entre 70 et 75 % d'eau, mais cette proportion diminue au fur et à mesure que l'organisme se développe : elle est comprise entre 50 et 60 % chez un adulte mince et est inférieure à 40 % chez un adulte obèse. L'eau ne se trouve que dans la masse maigre et représente environ 73,2 % de celle-ci chez l'adulte. L'eau corporelle totale (ECT) comprend à la fois le liquide intracellulaire et le liquide extracellulaire. Si l'on dispose d'une estimation de l'ECT, il est possible

d'évaluer la masse maigre. La masse grasse est la différence entre le poids corporel et la masse maigre.

Lorsque l'eau et la nourriture sont disponibles de manière satisfaisante, le compartiment eau de l'organisme évolue constamment, car des molécules d'eau pénètrent dans l'organisme et en sortent fréquemment. L'appareil circulatoire est chargé d'apporter régulièrement des éléments nutritifs aux cellules et d'éliminer les déchets produits par celles-ci. Chaque fois que l'on boit, que l'on consomme de la nourriture qui contient de l'eau ou que l'on fabrique une molécule d'eau lors de l'oxydation d'un substrat énergétique, ces molécules se mélangent à l'eau corporelle. En parallèle, le corps élimine constamment de l'eau de différentes manières, parmi lesquelles l'évaporation par les poumons et la peau et les pertes en eau par les urines et les selles. Chez l'adulte, la taille du compartiment eau de l'organisme reste relativement constante et varie rarement de plus de quelques pour cent au cours d'une même journée ou sur plusieurs jours. Un jour normal, les quantités d'eau qui entrent et qui sortent sont à peu près égales et la masse d'eau corporelle reste à peu près constante [1].

Sur le terrain, l'ECT peut être mesurée en diluant de l'eau deutérée. Cette technique présente l'avantage de pouvoir être utilisée pour évaluer les changements longitudinaux dans la composition corporelle qui ont suivi une intervention nutritionnelle. Parmi les autres méthodes de terrain qui permettent d'estimer l'ECT, on peut citer l'analyse d'impédance bioélectrique (BIA) et les prévisions basées sur l'anthropométrie (poids, taille, sexe et âge). Ces techniques sont moins précises et imposent de déduire des équations de prédiction pour des groupes de population particuliers par comparaison avec une méthode de référence (probablement la dilution de deutérium) sur un échantillon représentatif [2, 3].

2.3. DEUTÉRIUM

Les techniques qui ont recours à des isotopes stables sont utilisées dans les études de nutrition humaine depuis plus de 50 ans. Le deutérium est un isotope stable (non radioactif) de l'hydrogène et son symbole est ^2H . Il est administré par voie orale sous forme d'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) et, après s'être mélangé à l'eau corporelle, est éliminé du corps par les urines, la salive, la sueur et le lait maternel. L'eau deutérée est traitée par le corps de la même manière que l'eau habituelle et se mélange à l'eau corporelle au bout de quelques heures. On trouvera davantage d'informations sur l'eau deutérée dans l'appendice I.

2.3.1. Analyse de l'enrichissement de l'eau corporelle en deutérium

L'eau corporelle peut être échantillonnée sous forme de salive, d'urine, de plasma ou de lait maternel et l'enrichissement en deutérium peut être mesuré par spectrométrie de masse isotopique (SMI) [4] ou par spectroscopie IRTF [5]. Cette dernière n'est pas aussi sensible que la SMI et nécessite donc une dose d'eau deutérée plus importante (environ 10 fois plus). La spectroscopie IRTF n'est pas adaptée à l'analyse des urines et du lait maternel. Toutefois, les spectromètres IRTF sont plus faciles à utiliser et à entretenir que ceux de SMI. Ils sont aussi moins coûteux à l'achat et le coût d'une analyse est également plus faible. Cette méthode est donc particulièrement indiquée pour les pays à ressources limitées (pour plus d'informations sur la spectroscopie IRTF, voir l'appendice II).

Le présent manuel décrit la méthode d'estimation de l'ECT par dilution de deutérium en appliquant la technique de l'équilibration à des échantillons de salive et en mesurant l'enrichissement en deutérium par spectroscopie IRTF.

2.4. DIFFÉRENCES ENTRE LES TECHNIQUES D'ÉQUILIBRATION ET DE RÉTROEXTRAPOLATION POUR L'ESTIMATION DE L'EAU CORPORELLE TOTALE

La technique de l'équilibration peut être utilisée chez l'enfant et l'adulte, mais lorsque la vitesse de renouvellement de l'eau dans le corps est élevée, par exemple chez le nourrisson ou l'adulte qui pratique une activité physique intense, la rétroextrapolation donne des résultats plus précis. La détermination de la composition corporelle par cette dernière technique est réalisée en appliquant la méthode d'estimation de la dépense énergétique totale à l'aide d'eau doublement marquée [6] et, chez les femmes allaitantes, en suivant la technique de la dose administrée à la mère utilisée pour estimer la quantité de lait maternel consommée par des bébés nourris au sein [7]. La technique de la rétroextrapolation consiste à mesurer la vitesse de renouvellement de l'eau sur une période de deux semaines chez l'adulte et de sept jours chez l'enfant (entre trois et quatre cycles de renouvellement de l'eau). Par conséquent, un des avantages de la méthode de l'équilibration, c'est que les prélèvements sont effectués en une seule journée.

3. TECHNIQUE DE L'ÉQUILIBRATION UTILISÉE POUR ESTIMER L'EAU CORPORELLE TOTALE PAR DILUTION DE DEUTÉRIUM

3.1. RÉSUMÉ

Vue d'ensemble de la technique de dilution de deutérium :

- L'eau corporelle contient naturellement une petite proportion de deutérium (^2H). Celle-ci représente la teneur naturelle du deutérium dans l'eau corporelle et est généralement proche de 0,015 %.
- Après qu'un échantillon de référence a été prélevé, une quantité connue d'eau deutérée (dont la teneur isotopique en deutérium s'élève à 99,8 ou 99,9 %) est ingérée (30 g pour un adulte). L'eau deutérée a pour formule chimique D_2O .
- Le $^2\text{H}_2\text{O}$ se mélange avec l'eau corporelle au bout de quelques heures (fig. 1). La quantité de deutérium présente dans cette eau en plus de celle qui est naturellement présente est appelée enrichissement de l'eau corporelle. Cet enrichissement atteint un plateau au bout d'une période comprise entre deux et cinq heures.

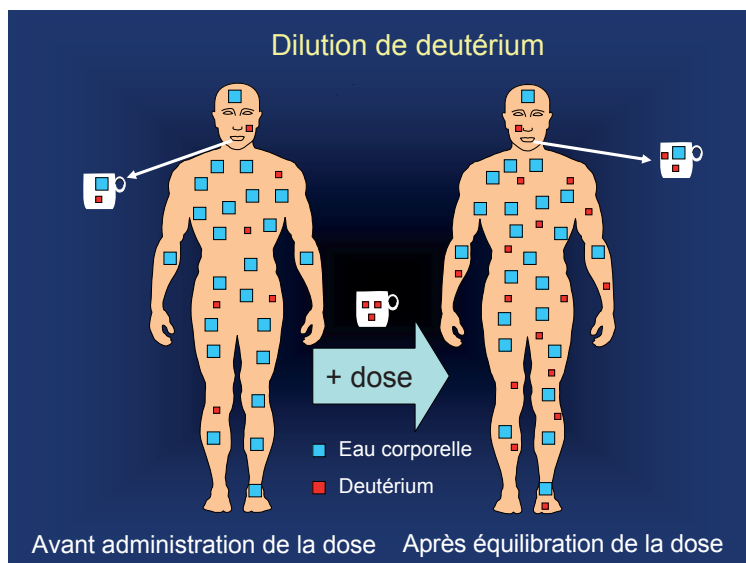


FIG. 1. Estimation de l'ECT par dilution de deutérium.

- Il est recommandé de prélever deux échantillons de salive, l'un trois heures après et l'autre quatre heures après que la dose a été administrée. Lorsque la personne est âgée ou lorsque son eau corporelle se renouvelle lentement, la salive devrait être prélevée quatre et cinq heures après absorption de la dose.
- Les participants devraient éviter de boire durant la période d'équilibration, mais si ce n'est pas possible, le volume de tous les liquides consommés doit être noté.
- La concentration de deutérium dans les échantillons de salive mesurée par spectroscopie IRTF représente en réalité l'enrichissement, car la teneur initiale est automatiquement soustraite au cours de la mesure.

3.1.1. Calcul de l'ECT

Lorsque l'enrichissement de la salive en deutérium est mesuré par spectroscopie IRTF, les résultats sont exprimés en mg de $^2\text{H}_2\text{O}$ par kilo de H_2O (ppm) :

$\text{ECT (en kg)} = \text{dose de } ^2\text{H}_2\text{O (en mg)} \div \text{enrichissement de la salive en deutérium (en mg/kg)}.$

3.2. HYPOTHÈSES ASSOCIÉES À CETTE TECHNIQUE

La technique d'estimation de l'ECT par dilution de deutérium repose sur les hypothèses suivantes [1] :

- L'eau deutérée ne se diffuse que dans l'eau corporelle.
- L'eau deutérée se répartit dans les mêmes proportions dans tous les compartiments eau de l'organisme (par exemple, la salive, les urines, le plasma, la sueur et le lait maternel).
- L'équilibration de l'eau deutérée est atteinte rapidement.
- Il n'y a pas de perte d'eau deutérée ou d'eau corporelle durant la période d'équilibration.

Lorsque ces hypothèses ne sont pas valables, il convient d'intégrer un coefficient de correction au calcul de l'ECT ou de prendre des précautions particulières afin d'atténuer autant que possible les conséquences de cette situation. Ces hypothèses sont examinées une à une dans les paragraphes suivants.

3.2.1. Hypothèse 1 : L'eau deutérée ne se diffuse que dans l'eau corporelle

Cette hypothèse est fausse. Le deutérium contenu dans l'eau corporelle pénètre dans d'autres compartiments de l'organisme. C'est ce que l'on appelle les échanges non aqueux :

- Échanges entre le deutérium et des atomes d'hydrogène échangeables dans les protéines du corps. Les atomes d'hydrogène échangeables sont ceux qui font partie des groupes amines ($-\text{NH}_2$), hydroxyles ($-\text{OH}$) et carboxyles ($-\text{COOH}$) des acides aminés.
- Le deutérium est également emprisonné dans les graisses et dans les protéines lorsqu'elles sont synthétisées.

C'est pourquoi le volume de distribution du deutérium est légèrement plus grand que l'ECT : il est égal à 1,041 fois l'ECT.

Cette différence est prise en compte en divisant le volume de distribution (V_D) calculé par 1,041 pour obtenir l'ECT (en kg).

Par conséquent, la formule

$$\text{ECT (en kg)} = \text{dose de } ^2\text{H}_2\text{O (en mg)} \div \text{enrichissement de la salive en deutérium (en mg/kg)}$$

devient :

$$V_D \text{ (en kg)} = \text{dose de } ^2\text{H}_2\text{O (en mg)} \div \text{enrichissement de la salive en deutérium (en mg/kg)}$$

et

$$\text{ECT (en kg)} = V_D \text{ (en kg)} \div 1,041$$

Il convient de noter que le calcul de l'ECT à partir des résultats d'une spectrométrie IRTF diffère du calcul de l'ECT à partir des résultats d'une SMI (voir l'appendice II).

3.2.2. Hypothèse 2 : L'eau deutérée se répartit dans les mêmes proportions dans tous les compartiments eau de l'organisme

Cette hypothèse est vraie pour l'eau qui reste dans le corps mais pas pour l'eau qui en sort sous forme de vapeur d'eau, car celle-ci est soumise à un fractionnement isotopique. Il n'y a pas de fractionnement dans les urines,

l'eau des selles et la sueur. Cette dernière est sécrétée par les glandes sudoripares sous forme d'eau liquide et l'évaporation n'a lieu qu'une fois que cette eau ne fait plus partie de l'eau corporelle. Elle n'est donc pas fractionnée lorsqu'elle quitte l'organisme. En revanche, l'eau qui sort du corps sous forme de vapeur d'eau au cours de la respiration ou par évaporation transdermique est soumise au fractionnement. L'évaporation transdermique est une perte insensible en eau par la peau sans que cette eau soit sécrétée par les glandes sudoripares. L'effet d'une augmentation de cette perte en eau, sachant que celle-ci contient moins de deutérium que l'eau corporelle, est de concentrer l'eau deutérée qui reste, ce qui conduit à une sous-estimation de l'ECT et, par conséquent, à une surestimation de la masse grasse. Il est important d'éviter les activités physiques durant la période d'équilibration afin de ne pas accroître le rythme respiratoire et l'évaporation transdermique.

3.2.3. Hypothèse 3 : L'équilibration de l'eau deutérée est atteinte rapidement

Cette hypothèse est valable pour les personnes en bonne santé, mais l'eau se renouvelle plus lentement chez les personnes âgées, les femmes enceintes et les patients dont le volume d'eau extracellulaire est important (comme les enfants dénutris qui présentent un œdème). Il faut, par conséquent, prévoir une durée d'équilibration plus longue pour ces individus :

- L'équilibration est le processus au cours duquel le D₂O se mélange de manière homogène avec toute l'eau corporelle. À l'issue de ce processus, la concentration en deutérium est la même dans tous les compartiments eau de l'organisme.
- L'équilibration entre la dose enrichie et l'eau corporelle n'est pas instantanée. Pour la salive, cela se fait rapidement, mais pour les urines, surtout chez les personnes âgées qui présentent un résidu vésical postmictionnel, l'équilibration peut prendre quelques heures. La question à se poser est : « Combien de temps faut-il attendre pour que l'équilibration soit achevée ? »
- Chez les individus en bonne santé, l'équilibration est d'ordinaire achevée au bout de deux à cinq heures (fig. 2) et des échantillons de salive peuvent être prélevés trois et quatre heures après ingestion du deutérium. L'eau se renouvelle en général plus rapidement chez l'enfant que chez l'adulte et plus rapidement chez le jeune adulte que chez l'adulte âgé. Divers états pathologiques peuvent avoir une incidence sur la vitesse de renouvellement, il importe donc d'effectuer une petite étude pilote afin de déterminer le délai requis pour les prélèvements avant de démarrer l'étude principale. Il

peut être nécessaire de prélever des échantillons de salive quatre et cinq heures après administration de la dose de deutérium, voire plus tard.

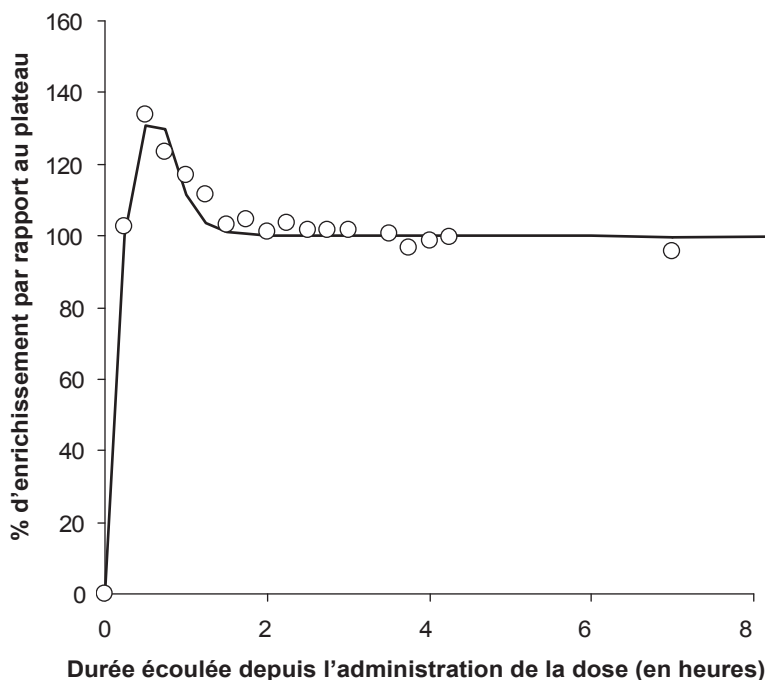


FIG. 2. Équilibration de l'eau deutérée dans l'eau corporelle. Pendant la phase initiale, l'enrichissement en deutérium dépasse la valeur du plateau final, car l'eau deutérée ne s'est pas complètement mélangée au liquide intracellulaire. L'enrichissement reste à la valeur du plateau pendant plusieurs heures.

3.2.4. Hypothèse 4 : Il n'y a pas de perte d'eau deutérée ou d'eau corporelle durant la période d'équilibration

Cette hypothèse n'est probablement pas exacte, mais il est possible de prendre des précautions pour limiter les pertes autant que possible. L'eau corporelle ne forme pas un circuit fermé, c'est un système dynamique à plusieurs entrées (boisson, nourriture et eau métabolique) et sorties (urines, selles, sueur, respiration, etc.). En climat tempéré, environ 8 % de l'eau corporelle d'un adulte se renouvelle tous les jours. Ce renouvellement est de 50 à 100 % plus élevé lorsque le climat est tropical en raison de pertes insensibles en eau par les poumons et par la peau plus importantes.

Lorsque l'ECT est mesurée en utilisant la technique de l'équilibration décrite ici, ce qui prend trois ou quatre heures, on peut demander aux personnes qui effectuent cette analyse de vider leur vessie avant que la dose ne leur soit administrée, de ne pas consommer de nourriture ou de liquides et d'éviter toute activité physique durant la période d'équilibration. Les pertes de deutérium par les urines et la sueur sont ainsi réduites au minimum et peuvent être négligées.

S'il n'est pas possible de rester à jeun durant la période d'équilibration, il convient de noter le volume de liquide consommé et de le soustraire à l'ECT calculée.

3.3. ESTIMATION DE L'ECT CHEZ LE NOURRISSON

Pour évaluer l'ECT chez un nourrisson, il est préférable d'appliquer la méthode de la rétroextrapolation [8]. Si l'on envisage de procéder à une telle évaluation, il est recommandé de faire appel à un expert, car des précautions particulières doivent être prises afin de s'assurer que les doses ont été correctement administrées. Il est très difficile de prélever des échantillons de salive chez un bébé de moins de 3 mois.

3.4. HYDRATATION DE LA MASSE MAIGRE

Le modèle de la composition corporelle à deux compartiments divise l'organisme en masse grasse et en masse maigre. L'hydratation de la masse maigre désigne sa teneur en eau. On admet que la masse maigre (MM) contient 73,2 % d'eau chez l'adulte (âgé de 21 ans ou plus) :

$$MM \text{ (en kg)} = ECT \text{ (en kg)} \div 0,732$$

Chez tous les mammifères, l'hydratation cellulaire est contrôlée de manière très stricte. C'est dans l'ouvrage classique de Pace et Rathbun que l'on trouve le coefficient d'hydratation généralement utilisé, c'est-à-dire 0,732 [9]. Des études *in vivo* menées chez l'adulte montrent que l'âge n'a aucune incidence sur cette constante jusqu'à 70 ans [10, 11]. Les facteurs qui peuvent induire une variation individuelle de l'hydratation de la masse maigre ont été décrits par Wang *et al.* [12]. Cette masse peut varier de 2 à 3 % (écart type) chez un adulte en bonne santé [13, 14]. Ces chiffres tiennent compte à la fois des erreurs de mesure et des variations physiologiques. La variation physiologique réelle qui est associée à l'hydratation de la masse maigre chez l'adulte en bonne santé ne peut être évaluée si l'on ne connaît pas l'erreur induite par la mesure. Schoeller estime que

l'erreur de mesure moyenne s'élève à 1 %. L'écart type intralaboratoire associé à la mesure de l'hydratation *in vivo* est estimé à 1,1 % et la variation physiologique à 0,5 %, ce qui est faible [1].

3.4.1. Variation de l'hydratation de la masse maigre chez le nourrisson et l'enfant

Le coefficient d'hydratation de 0,732 appliqué chez l'adulte ne peut être utilisé pour des nourrissons et des enfants. On sait que l'hydratation des tissus maigres varie à mesure que l'organisme se développe durant la petite enfance. La masse musculaire des nouveau-nés est relativement petite par rapport à leur poids corporel. Durant l'enfance, au fur et à mesure que la part de la masse musculaire augmente, l'hydratation de la masse maigre (MM) diminue [15, 16]. Lohman a proposé des coefficients d'hydratation pour les enfants et les adolescents (tableau 1).

Pour les nourrissons, on applique souvent les coefficients d'hydratation de Fomon (tableau 2) pour convertir l'ECT en masse maigre [17]. Butte *et al.* [18] présentent également des données sur la composition corporelle des nourrissons. De plus, l'hydratation de la masse maigre chez les nourrissons a été examinée par Fomon et Nelson [19]. En revanche, on ne dispose pas de chiffres pour les nourrissons nés prématurément. C'est pourquoi, tant que cette situation perdure, les évaluations de la masse grasse chez les nourrissons prématurés doivent utiliser des modèles de composition corporelle à trois ou quatre compartiments [20].

3.4.2. Variation de l'hydratation de la masse maigre durant la grossesse et l'allaitement

Pendant la grossesse, la teneur en eau de la masse maigre (le coefficient d'hydratation) augmente [21]. Il n'y a pas aujourd'hui unanimité sur les coefficients d'hydratation les plus adaptés aux différentes étapes de la grossesse. La technique de dilution de deutérium n'est donc pas recommandée pour évaluer la composition corporelle en s'appuyant sur un modèle à deux compartiments chez la femme au cours des deuxième et troisième trimestres de grossesse.

Pour les femmes allaitantes ou au cours du premier trimestre de grossesse, on utilise généralement le coefficient d'hydratation classique, soit 0,732.

TABLEAU 1. HYDRATATION DE LA
MM (EN %) CHEZ LES ENFANTS ET
LES ADOLESCENTS

Âge (en années)	Garçons	Filles
1	79,0	78,8
1-2	78,6	78,5
3-4	77,8	78,3
5-6	77,0	78,0
7-8	76,8	77,6
9-10	76,2	77,0
11-12	75,4	76,6
13-14	74,7	75,5
15-16	74,2	75,0
17-20	73,8	74,5

Référence [16].

TABLEAU 2. HYDRATATION DE LA
MM (EN %) CHEZ LE NOURRISSON

Âge (en mois)	Garçons	Filles
Naissance	80,6	80,6
1	80,5	80,5
2	80,3	80,2
3	80,0	79,9
4	79,9	79,7
5	79,7	79,5
6	79,6	79,4
9	79,3	79,0
12	79,0	78,8
18	78,5	78,4
24	78,1	78,2

Référence [17].

4. PROCÉDURES

Les paragraphes suivants décrivent en détail les étapes et les procédures associées à la méthode d'estimation de l'ECT par dilution de deutérium, à savoir :

- La planification de l'étude ;
- La préparation et le stockage des doses d'eau deutérée ;
- Les procédures associées à la mesure de l'ECT, y compris les mesures anthropométriques effectuées sur les participants ;
- Les prélèvements d'échantillons de salive ;
- Les résultats.

L'analyse de l'enrichissement en deutérium des échantillons de salive par spectroscopie IRTF est décrite dans la section 5.

4.1. PLANIFICATION DE L'ÉTUDE

Une étude doit être planifiée avec soin si l'on veut aboutir à un résultat satisfaisant. Lorsque l'on engage une étude, la tâche la plus importante consiste à déterminer son objectif. Il convient de se concentrer sur une seule grande question. Quelle est l'hypothèse qui est examinée ?

En outre :

- Combien de participants sont-ils nécessaires pour traiter cette question ? Calculer la taille de l'échantillon requis. Demander conseil à un biostatisticien.
- Comment les données seront-elles gérées ? Quels seront les tests statistiques effectués ? Demander conseil à un expert durant la phase de planification et non une fois que les données ont été recueillies.
- Quelle est la procédure à suivre pour obtenir une autorisation éthique ?

4.1.1. Éthique

Toutes les études auxquelles participent des êtres humains doivent être examinées et approuvées par le comité local d'éthique. La plupart des revues de premier plan n'acceptent pas de publier un article si elles ne disposent pas d'une attestation indiquant qu'il a été approuvé par ce comité, lequel est généralement constitué de médecins, de scientifiques et de non-spécialistes, dont des personnalités religieuses et du monde associatif, ainsi que d'un avocat ou

d'un juriste. Ce comité peut siéger au Ministère de la santé, au Ministère des sciences ou à l'université locale. Il convient de le contacter relativement tôt afin de connaître la procédure à suivre pour obtenir une autorisation éthique et de se procurer des exemplaires des documents nécessaires.

Les participants doivent être informés de l'objectif de l'étude dans une langue adaptée à la situation locale. Ils doivent consentir librement et de manière éclairée à participer à l'étude et être informés qu'ils sont libres de se retirer à n'importe quel moment au cours de celle-ci.

Voici un exemple du type d'informations demandées par les comités d'éthique (les détails peuvent varier en fonction des circonstances locales) :

- L'objectif de l'étude envisagée, clairement énoncé ;
- Un résumé de la conception et de la méthodologie de l'étude, y compris des détails concernant la taille de l'échantillon envisagée, en donnant des indications sur les calculs effectués pour déterminer la taille nécessaire pour l'échantillon ;
- Une vue d'ensemble des considérations éthiques associées au projet d'étude ;
- Des détails sur la manière dont le consentement sera obtenu, y compris une fiche d'information à la formulation simple et non technique ;
- Qui aura accès aux données et quelles seront les mesures prises pour préserver l'anonymat des participants ;
- Qui sont les chercheurs (y compris les assistants) qui mèneront l'étude et quels sont leurs titres et leur expérience ;
- Lieu(x) où le projet sera réalisé ;
- Dates de début et de fin envisagées.

L'appendice I contient des informations sur la sûreté de l'eau deutérée qui peuvent être utiles lors de la préparation des demandes d'autorisation éthique.

4.1.2. Préparation de la fiche de données du participant

Les données correspondant à chaque participant doivent être correctement relevées. Pour ce faire, une méthode peu coûteuse consiste à se servir de documents papiers sur le terrain, documents qui peuvent être ultérieurement transférés sur un tableau. Le tableau 3 présente les informations minimales requises, mais des renseignements supplémentaires spécifiques à l'étude seront également nécessaires, par exemple des renseignements concernant l'état de santé du participant. La fiche doit être élaborée lors de la planification de sorte qu'elle puisse être évaluée et, si nécessaire, modifiée pendant l'étude pilote. Elle peut être conçue à l'aide d'un logiciel de traitement de texte ou d'un tableur et

reproduite autant de fois qu'il est nécessaire. On trouvera un exemple de fiche de données du participant dans l'appendice III.

TABLEAU 3. INFORMATIONS MINIMALES REQUISES POUR LA FICHE DE DONNÉES DU PARTICIPANT

Nom ou code du projet
Identifiant du participant pour l'étude
Nom ou initiales du chercheur
Date
Poids du participant (en kg)
Numéro de dose
Poids de la dose (en g)
Date et heure du prélèvement de référence
Date et heure d'administration de la dose
Date et heure du premier prélèvement effectué après administration de la dose
Date et heure du deuxième prélèvement effectué après administration de la dose
Volume d'eau consommé (en L)

4.1.3. Étude pilote

Si la technique décrite dans la présente publication n'a jamais été utilisée auparavant, il est recommandé de réaliser une étude pilote. Une telle étude est importante pour :

- Appliquer et tester les procédures, y compris le prélèvement et l'analyse des échantillons et la gestion des données ;
- Former toutes les personnes concernées ;
- Définir les tâches de routine et développer le travail en équipe ;
- Élaborer des stratégies pour surmonter les difficultés pratiques.

Pour une étude pilote, le nombre de participants est généralement assez faible. Ce type d'étude peut permettre de vérifier la durée d'équilibration dans les circonstances particulières de l'étude. L'état physiologique des participants a une incidence sur le renouvellement de l'eau. L'âge, l'état de santé et le climat influent également sur ce renouvellement, c'est pourquoi des échantillons de salive devraient être prélevés trois, quatre et cinq heures après ingestion de la

dose pour les adultes et deux, trois et quatre heures après administration de la dose pour les enfants. Lors de l'étude finale, seuls deux prélèvements de salive postérieurs à l'ingestion de la dose seront nécessaires, mais l'heure de ces prélèvements aura été déterminée empiriquement en fonction des circonstances locales.

4.1.4. Calcul de la taille de l'échantillon

Pour toute étude, il convient de s'assurer que le nombre de participants prévu est suffisant pour obtenir une réponse fiable à la question posée. La détermination de la taille de l'échantillon ou des calculs de puissance représentent une part importante de la planification d'une étude et sont exigés par les comités d'éthique et les organismes de financement. Un calcul de puissance peut être effectué afin de déterminer la taille de l'échantillon nécessaire pour obtenir une réponse fiable. Demander conseil à un biostatisticien concernant la détermination de la taille de l'échantillon. Les calculs de puissance peuvent être réalisés à l'aide d'un logiciel de statistiques.

Pour calculer la taille de l'échantillon requise, il faut connaître l'écart type (σ) des paramètres de la composition corporelle dans une population similaire à celle qui est étudiée et fixer la différence (δ) entre des groupes de l'étude qui sera considérée comme significative. Avant de consulter le biostatisticien, effectuer une recherche documentaire afin d'obtenir cette information. En santé publique, où les mesures ont lieu dans des centres locaux, le nombre de participants requis est plus élevé que dans un laboratoire de recherche, où les mesures sont réalisées dans des conditions soigneusement contrôlées.

La « puissance » d'une étude est généralement exprimée sous forme de pourcentage du temps où une étude détecte un résultat significatif lorsqu'il existe une réelle différence. On choisit en général une puissance de 80 %, ce qui veut dire que s'il y a une réelle différence et qu'une étude était réalisée 100 fois, on obtiendrait 80 fois un résultat statistiquement significatif et 20 fois un résultat qui ne l'est pas (c'est-à-dire un faux négatif). Le seuil de signification (α) est fixé à une valeur faible (généralement 0,05). Il correspond à la probabilité d'aboutir à un faux positif.

4.1.4.1. Exemple

Si l'on envisage d'étudier l'effet d'une intervention nutritionnelle sur la composition corporelle d'adultes vivant avec le VIH, il faut déterminer l'écart type de l'ECT dans cette population et la valeur de la différence (δ) qui serait significative sur le plan clinique. Dans une étude récente menée en Afrique, l'écart type (σ) de l'ECT chez 150 adultes séropositifs au VIH s'élevait à 5 kg

(communication personnelle). Le poids corporel moyen des participants était d'environ 60 kg. Une augmentation de la masse maigre équivalente à 5 % du poids corporel pourrait être considérée comme significative sur le plan clinique. 3 kg de masse maigre sont équivalents à 2,2 kg d'ECT ($3 \times 0,732$). Par conséquent, si l'on suppose que $\sigma = 5$ kg et que $\delta = 2,2$ kg d'ECT, avec une puissance de 80 %, un seuil de signification de 0,05 et une répartition des participants à l'étude en deux groupes (témoin et intervention), la taille d'échantillon requise (n) peut être calculée en appliquant la formule suivante :

$$n = 2 \times 7,85 \times \left(\frac{\sigma}{\delta} \right)^2$$

où 7,85 est le facteur de multiplication $f(\alpha, \text{puissance})$ avec puissance = 80 % et $\alpha = 0,05$ obtenu à partir de tables statistiques. Par conséquent :

$$n = 2 \times 7,85 \times \left(\frac{5}{2,2} \right)^2 = 81$$

Il faut au moins 81 participants dans chaque groupe pour aboutir à des résultats statistiquement significatifs. Si l'on cherche une puissance ou un degré de signification plus élevés, il faut prévoir plus de participants à l'étude. Il est également recommandé d'appliquer un coefficient à ce nombre pour tenir compte des abandons en fonction de l'expérience locale. Si l'on suppose que le taux d'abandon s'élève à 25 %, il faut recruter 110 participants dans chaque groupe.

4.2. PRÉPARATION ET STOCKAGE DES DOSES D'EAU DEUTÉRIÉE

Pour cette méthode, il est essentiel que les doses soient préparées correctement. Cela a une incidence directe sur la qualité des résultats obtenus.

4.2.1. Matériel

Tout le matériel qui est utilisé pour préparer les doses doit être parfaitement sec afin d'éviter toute contamination par de l'eau. On trouvera une liste du matériel nécessaire dans l'appendice IV. Tous les flacons qui contiennent les doses doivent être munis d'un bouchon à vis et être étanches (il peut s'agir, par ex., de flacons grande ouverture étanches, en polypropylène, stérilisables à l'autoclave et de 60 mL) afin d'éviter les pertes durant le stockage et une contamination par la vapeur d'eau présente dans l'air. Il n'est pas nécessaire de les autoclaver et ils ne se fendent ni ne fuient s'ils sont stockés dans un congélateur.

L'étendue de pesée de la balance qui sert à peser les doses doit être adaptée à la quantité à peser et au récipient utilisé. Il est recommandé de pouvoir peser des

objets à 0,01 g près. Il faut connaître la masse de la dose jusqu'à quatre chiffres significatifs, par exemple 30,05 g pour un adulte ou 6,034 g pour un enfant.

4.2.2. Préparation d'une dose pour un adulte

La dose normalisée d'eau deutérée utilisée pour estimer l'eau corporelle totale chez un adulte est de 30 g quel que soit le poids de la personne. Cette dose doit être pesée avec une précision d'au moins 0,01 g. Dans un cahier de laboratoire, indiquer le numéro de lot de la solution mère d'eau deutérée utilisée pour préparer la dose, la date à laquelle cette préparation a été effectuée, le numéro de dose, le poids du flacon, le poids de l'ensemble flacon plus dose et le poids de la dose. Ces informations peuvent être ultérieurement reportées sur un tableur. Les doses doivent être préparées dans un endroit propre, par exemple des cuisines. Il n'est pas de bonne pratique de préparer des doses destinées à être consommées par des êtres humains dans un laboratoire de chimie, car la balance peut avoir auparavant servi à peser des composés toxiques.

La figure 3 illustre les étapes de préparation d'une dose.



FIG. 3. Préparation d'une dose – elle doit être effectuée dans des cuisines et non dans un laboratoire.

Si l'on utilise une balance électronique :

- Tarer l'ensemble flacon plus bouchon.
- Verser 30 mL de D_2O dans le flacon à l'aide d'une éprouvette graduée et refermer le bouchon.
- Noter le poids exact de D_2O contenu dans chaque dose.
- Le poids de D_2O ne sera pas exactement de 30 g, car la densité de ce composé est plus élevée que celle de l'eau (la densité du D_2O à 25 °C s'élève à 1,105 g/mL et celle du H_2O est égale à 1,000 g/mL). Cela n'a pas d'importance dès lors que le poids exact est consigné et utilisé dans les calculs ultérieurs.

Il convient de noter que, si c'est la première fois que l'on a recours à cette technique, il faut conserver quelques millilitres de la solution mère de D_2O afin de préparer un étalon qui servira à l'analyse des échantillons de salive. Cette préparation est décrite dans la section 5.2.

4.2.3. Préparation d'une dose pour un enfant

Pour un enfant, la dose requise s'élève à environ 0,5 g de D_2O par kilo de poids corporel. Lorsque les participants à l'étude sont nombreux, il est plus facile de leur administrer la même dose à tous. Une seule dose type peut être préparée en fonction du poids moyen des enfants ou plusieurs doses types pour les études portant sur des enfants d'âge et de poids corporel différents. Les poids de dose suggérés figurent dans le tableau 4.

Pour les enfants dont le poids corporel est inférieur à 30 kg, il est possible de diluer le D_2O afin d'éviter d'administrer de faibles volumes, lesquels sont davantage susceptibles d'être perdus par évaporation. Il convient d'effectuer une dilution de D_2O au cinquième en ajoutant 800 g (800 mL) d'eau potable à 200 g (180 mL) de D_2O (fig. 4). Le poids du D_2O et de l'eau ajoutée doit être noté à 0,01 g près. Pour les enfants dont le poids corporel est supérieur à 30 kg, se servir de D_2O pur.

Les doses contenant la quantité requise de D_2O peuvent être préparées en versant un aliquot du D_2O dilué dans des flacons munis d'un bouchon à vis et pesés (ou tarés), comme indiqué ci-après et dans la figure 5.

TABLEAU 4. DOSES DE D₂O NORMALISÉES UTILISÉES POUR ESTIMER L'ECT CHEZ L'ENFANT

Poids corporel (en kg)	Poids de D ₂ O requis (en g)	Volume approximatif pour une dilution au cinquième (en mL)
< 10	3 ^a	15
10-20	6 ^a	30
20-30	10	50
30-50	20	Sans objet
> 50	30	Sans objet

^a Si on le souhaite, cette dose peut également être consommée pure à l'aide d'une seringue en plastique jetable. Celle-ci doit être pesée avant et après administration de la dose afin de déterminer la quantité exacte d'eau deutérée absorbée.

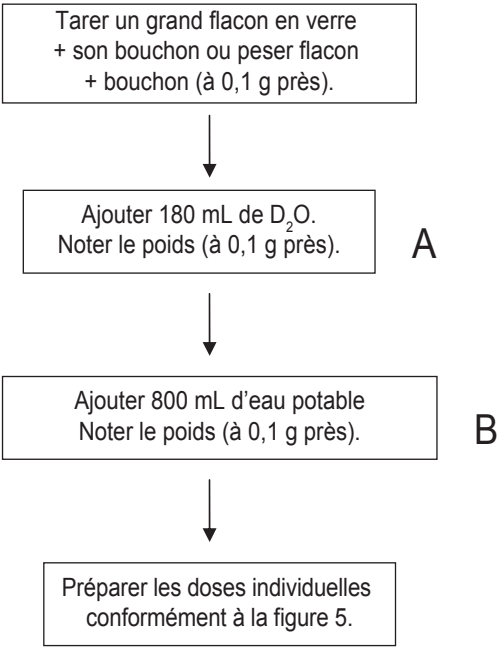


FIG. 4. Réalisation d'une dilution de D₂O au cinquième.

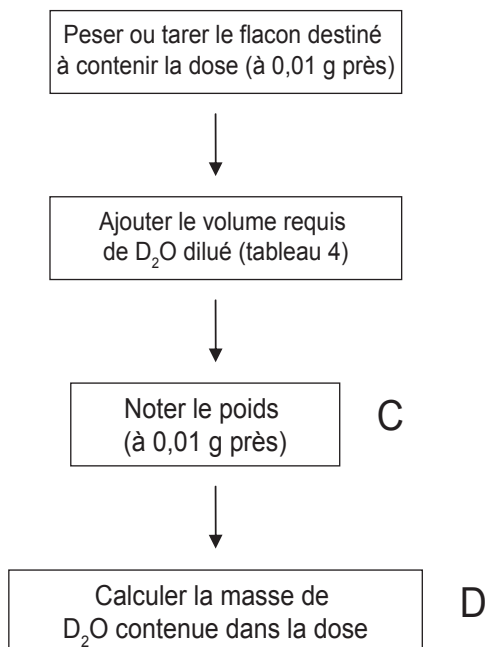


FIG. 5. Préparation d'une dose individuelle pour un enfant.

4.2.3.1. Réalisation d'une dilution au cinquième

Cette dilution peut être réalisée avec de l'eau potable. Il faut disposer d'un flacon propre, en verre borosilicaté, d'une contenance d'un litre (ou davantage) et muni d'un bouchon à vis. On peut se servir par exemple d'un flacon neuf, en verre borosilicaté et muni d'un bouchon à vis PTFE. Il convient de ne pas utiliser de flacon qui a déjà contenu un réactif chimique. Il faut disposer d'une balance capable de peser un objet de 2 kg à 0,1 g près. Notons que la densité du D₂O s'élevant à 1,105 g/mL à 25 °C, 180 mL de ce composé pèsent donc 200 g. La densité de l'eau (H₂O) est égale à 1,000 g/mL à 25 °C, 800 mL d'eau pèsent donc 800 g.

Le bouchon doit être laissé sur le flacon durant la pesée afin d'éviter les pertes par évaporation.

Si l'on utilise une balance électronique :

- Tarer ou peser l'ensemble flacon plus bouchon.
- Verser 180 mL de D₂O à 99,8 ou 99,9 % dans le flacon et refermer le bouchon.
- Noter le poids du D₂O contenu dans le flacon (A, à peu près 200 g).

- Ajouter 800 mL d'eau potable et refermer le bouchon. Noter le poids de l'ensemble D₂O plus eau potable (B, environ 1 000 g).

4.2.3.2. Préparation de doses individuelles pour des enfants

Les doses individuelles doivent être pesées avec une précision d'au moins 0,01 g. Si l'on utilise une balance électronique :

- Tarer ou peser l'ensemble flacon plus bouchon.
- Verser le volume requis de D₂O dilué au cinquième dans le flacon à l'aide d'une éprouvette graduée ou d'une pipette. Refermer le bouchon.
- Noter le poids exact de D₂O (ou de D₂O plus eau) contenu dans chaque flacon (à 0,01 g près, C).
- La masse du D₂O contenu dans chaque dose (D) peut être obtenue par un calcul de proportionnalité.

Ainsi, masse du D₂O contenu dans la dose (en g) = poids de l'eau contenue dans la fiole (en g) × masse de D₂O dans la dilution au cinquième (environ 200 g) ÷ poids de l'ensemble D₂O plus eau potable dans la dilution au cinquième (à peu près 1 000 g) :

$$\text{Poids de D}_2\text{O dans la dose, } D = C \times A \div B \text{ (en g)}$$

où D est le poids qui doit être utilisé pour calculer l'ECT après avoir été converti en milligrammes.

Les figures 4 et 5 récapitulent les étapes de préparation des doses pour des enfants.

4.2.4. Stockage des doses

Les doses peuvent être préparées en une seule fois et conservées au réfrigérateur jusqu'à ce que l'on en ait besoin.

Pour des questions d'hygiène et éviter les contaminations croisées, les doses ne devraient pas être stockées au même endroit que les échantillons de salive. L'enrichissement des échantillons en D₂O peut atteindre 1 000 mg/kg (ppm de D₂O) alors que dans les doses, l'enrichissement s'élève à environ 999 000 mg/kg (ppm de D₂O). La dose contient donc à peu près 1 000 fois plus de deutérium que les échantillons biologiques. Par ailleurs, les doses ne doivent pas être conservées avec les échantillons de salive afin d'éviter les contaminations microbiennes croisées.

Lorsque l'on transporte des doses depuis ou vers le terrain, il convient d'utiliser des cartons distincts pour les doses et les échantillons de salive.

4.3. MESURE DE L'ECT

La figure 6 récapitule les différentes étapes d'une mesure de l'ECT par dilution de deutérium.

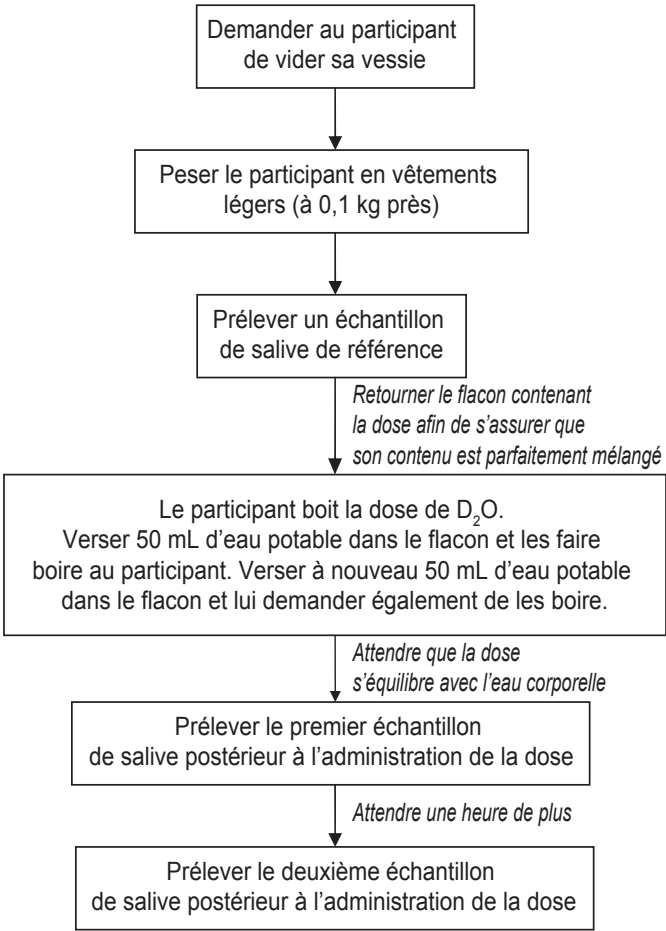


FIG. 6. Logigramme décrivant les différentes étapes associées à la mesure de l'ECT par dilution d'eau deutérée.

Les participants doivent consommer une quantité normale de liquides et d'aliments la veille de l'estimation de l'ECT et éviter les efforts intenses après le dernier repas de ce jour-là afin d'éviter une déshydratation et l'épuisement des réserves de glycogène.

Pour que la mesure de l'ECT soit précise, il faut demander aux participants de vider leur vessie avant le début de l'examen. Cela permet de s'assurer que le poids corporel est mesuré à chaque fois dans les mêmes conditions dans les études longitudinales et que l'eau contenue dans les urines n'est pas incluse dans l'ECT.

4.3.1. Mesures anthropométriques

Il faut mesurer le poids corporel de manière précise, car la masse grasse est estimée par différence entre ce poids et la masse maigre. Il convient de demander aux participants de vider leur vessie (et si possible leurs intestins) avant de les peser en vêtements légers. Il est particulièrement important d'uniformiser les conditions de mesure de cette manière pour les études longitudinales. L'exactitude de la balance utilisée pour mesurer le poids corporel doit être vérifiée quotidiennement à l'aide d'un poids étalon dont la masse est connue. De nombreuses précautions sont prises afin de s'assurer de l'exactitude et de la précision des données isotopiques. Si l'on ne fait pas preuve de la même vigilance pour les mesures anthropométriques, les valeurs obtenues pour la composition corporelle risquent d'être faussées.

4.3.1.1. Mesure du poids et de la taille chez l'adulte et l'enfant

Mesure du poids

- Le poids des participants doit être mesuré à 0,1 kg près à l'aide d'une balance électronique ou de toute balance dont la précision est suffisante.
- La balance doit être posée sur une surface plane dont la planéité doit être contrôlée, si possible, à l'aide d'un niveau à bulle.
- Les participants doivent porter des vêtements légers et retirer leurs chaussures (fig. 7). S'ils ne souhaitent pas porter des vêtements légers durant la pesée, leur tenue doit être ensuite pesée séparément et son poids déduit afin d'obtenir une mesure précise du poids corporel.
- Sur la fiche de données du participant, noter le poids mesuré à 0,1 kg près.
- Pour les études longitudinales dans lesquelles on cherche à mesurer les évolutions de la composition corporelle sur une durée relativement courte, il est essentiel que le poids corporel soit mesuré avec précision. Il faut tenir compte du poids de tous les vêtements portés pendant la mesure.



FIG. 7. Le poids est mesuré en vêtements légers et sans chaussures.

- L'exactitude de la balance doit être vérifiée quotidiennement à l'aide d'un poids étalon dont la masse est connue.

Mesure de la taille

- La taille doit être mesurée à 0,1 cm près à l'aide d'une toise.
- La toise doit être posée sur une surface plane dont la planéité doit être contrôlée, si possible, à l'aide d'un niveau à bulle. L'exactitude de la toise doit être vérifiée périodiquement en utilisant des piges.
- La taille est mesurée sans chaussures.
- Le participant doit se tenir droit, les talons contre le mur ou contre la tige de la toise. Ses genoux doivent être droits.
- Demander au participant de regarder droit devant lui. Ses yeux doivent être au même niveau que ses oreilles (fig. 8).
- Abaisser le curseur jusqu'à ce qu'il touche le sommet du crâne. Les coiffures élaborées doivent être défaites. Sur la fiche de données du participant, noter la taille en centimètres (à 0,1 cm près). Cette mesure doit être effectuée deux fois. Une fois les mesures réalisées, calculer la moyenne des deux valeurs obtenues.

Chez l'enfant, la taille est mesurée par cette méthode uniquement s'il fait plus de 85 cm. L'OMS a élaboré un mode opératoire détaillé pour mesurer le poids et la taille d'un enfant. Les documents correspondants peuvent être téléchargés à l'adresse suivante : <http://www.who.int/childgrowth/training/fr/index.html>.



FIG. 8. Mesure de la taille : cheveux retombés, regard tourné vers l'avant.

4.3.1.2. Mesure du poids et de la taille d'un nourrisson

Mesure du poids d'un nourrisson

- Les nourrissons doivent être pesés nus à l'aide d'une balance précise à 0,01 kg près (fig. 9).
- Placer un morceau de tissu dans la nacelle afin que l'enfant ne prenne pas froid.
- Régler le zéro de la balance après avoir posé le morceau de tissu dans la nacelle.
- Poser doucement l'enfant nu sur le tissu dans la nacelle.
- Attendre que l'enfant se calme et que le poids se stabilise.
- Mesurer et noter immédiatement le poids (à 10 g près, soit 0,01 kg près).

Il convient d'étalonner la balance chaque semaine ou dès qu'elle est déplacée.

Contrôle de la balance

Peser des poids connus de 3, 5, et 10 kg et, s'il y a lieu, de 20 kg. Si l'on ne dispose pas de poids étalons, on peut se servir de bouteilles d'eau non ouvertes. Elles doivent avoir été pesées avec précision sur une balance étalonnée et leur poids doit être vérifié périodiquement.

Pour vérifier une pesée avec tarage : peser un poids de 20 kg, régler la balance à zéro puis ajouter un poids de 3 kg. La balance doit indiquer un poids de 3 kg.

Si la masse des poids n'est pas précise, la balance doit si possible être étalonnée. Sinon, elle doit être remplacée.



FIG. 9. Pesée d'un nourrisson.



FIG. 10. Mesure de la taille d'un nourrisson.

Mesure de la taille d'un nourrisson

On mesure la taille d'un nourrisson à l'aide d'une toise pour bébé (parfois appelée « infantomètre »). Il faut deux personnes pour mesurer la taille d'un enfant (fig. 10).

L'une des personnes doit :

- Aider à mettre l'enfant sur le dos sur la toise pour bébé en soutenant sa tête et en la plaçant contre l'extrémité de la toise prévue à cet effet.

- Placer le sommet de sa tête contre l'extrémité de la toise prévue à cet effet en comprimant ses cheveux. Vérifier que l'enfant est allongé sur l'axe central de l'objet et ne change pas de position. Ses épaules doivent être en contact avec la surface horizontale et son dos ne doit pas être courbé.

En général, cette personne se tient debout ou agenouillée derrière l'extrémité de la toise qui soutient la tête de l'enfant.

La deuxième personne doit :

- Soutenir le tronc de l'enfant pendant que celui-ci repose sur la toise.
- Étendre l'enfant tout droit sur la surface horizontale.
- Mettre une main sur les tibias au-dessus des chevilles ou sur les genoux et appuyer fermement vers le bas. Avec l'autre main, la personne doit maintenir fermement les talons contre l'extrémité de la toise qui touche les pieds. Elle doit s'assurer que les doigts de pied n'empêchent pas que cette extrémité soit en contact avec les talons.
- Mesurer et noter immédiatement la taille (à 0,1 cm près).

La toise pour bébé doit toujours rester propre et doit être stockée à une température d'intérieur normale à l'abri de l'humidité. Sa précision doit être vérifiée chaque semaine.

4.3.2. Administration d'une dose

Chez l'adulte et l'enfant, la dose doit être ingérée au moins deux heures après le dernier repas et le participant doit, de préférence, être à jeun de la veille. De plus, aucun aliment ne doit être consommé tant que le dernier prélèvement n'a pas été effectué. S'il n'est pas possible d'attendre le dernier prélèvement, le participant peut prendre un repas léger une heure après avoir absorbé la dose. Ce repas doit être simple et d'une valeur énergétique inférieure à 1 250 kJ (300 kcal). La dose peut ainsi avoir quitté l'estomac avant le repas, mais l'eau contenue dans celui-ci commencera à s'équilibrer avec l'eau corporelle avant que les prélèvements de salive postérieurs à l'administration de la dose ne soient effectués. Chez le nourrisson, la dose est généralement consommée au cours d'un repas. S'il est nourri au sein, on peut se servir d'une seringue jetable pour administrer la dose juste avant la tétée. Si tel est le cas, il faut déterminer avec précision la dose injectée en pesant la seringue pleine et en la pesant à nouveau une fois que la dose a été administrée. Si le bébé est nourri au biberon, l'eau deutérée peut être mélangée au lait. Si la dose n'est pas complètement consommée, le nourrisson ne peut être intégré à l'étude. Il est recommandé de

demander conseil à des personnes qui ont l'habitude de mesurer l'ECT chez des bébés.

En outre,

- Il faut prélever des échantillons de salive de référence avant que la dose ne soit ingérée.
- La dose de D₂O (eau marquée) à administrer est de 30 g pour un adulte (pour les doses applicables aux enfants, consulter le tableau 4).
- Si la dose a été congelée, elle doit être complètement dégelée avant d'être utilisée.
- Qu'il ait été conservé au réfrigérateur ou décongelé au sortir du congélateur, le flacon doit être retourné plusieurs fois afin de mélanger l'éventuelle buée qui s'est déposée sur le bouchon avec le reste du liquide. Il convient d'effectuer cette opération juste avant que la dose ne soit consommée. En effet, l'eau de condensation a subi un fractionnement par rapport au reste du liquide (pour plus d'informations sur le fractionnement, consulter l'appendice V).
- Le flacon ne doit pas être ouvert avant le moment où la dose doit être consommée.

Lorsque l'on parle aux participants, il est souvent préférable d'employer les expressions « eau lourde » ou « eau spéciale » plutôt qu'« eau marquée au deutérium » ou « eau marquée à un isotope stable », car il peut y avoir une confusion sur le mot « isotope », qui est souvent associé à la radioactivité.

L'utilisation du D₂O ne présente aucun risque radiologique.

Les étapes de l'administration d'une dose sont les suivantes :

- Noter le numéro du flacon et le moment où la dose a été ingérée sur la fiche de données du participant.
- Les participants doivent boire leur dose avec une paille afin d'éviter d'en renverser (fig. 11).
- Verser environ 50 mL d'eau potable dans le flacon et demander au participant de la boire avec la même paille. Effectuer une deuxième fois cette opération avec à nouveau 50 mL d'eau potable. Cela permet de s'assurer qu'il ne reste pas d'eau marquée dans le flacon.



FIG. 11. Administration d'une dose — le participant boit la dose avec une paille afin d'éviter d'en renverser.

4.3.3. Consommation de nourriture et de boissons et activité physique durant la période d'équilibration

Si possible, les participants ne doivent pas manger ou boire durant la période d'équilibration. Si ce n'est possible, par exemple pour des enfants ou des femmes allaitantes, un repas léger peut être pris une heure après que la dose a été administrée. Il convient de noter le volume de toutes les boissons consommées durant la période d'équilibration, y compris les 100 mL utilisés pour rincer le flacon. Ce volume doit être déduit de l'ECT calculée. Si aucun autre liquide n'est ingéré durant la période d'équilibration, les 100 mL d'eau ne sont en général pas pris en compte. Les participants ne doivent ni boire ni manger entre les prélèvements effectués trois et quatre heures après administration de la dose afin d'éviter tout effet à court terme de l'absorption d'eau sur l'enrichissement de la salive en deutérium.

Les participants doivent éviter toute activité physique durant la période d'équilibration afin de réduire au minimum les pertes en eau par la respiration et par évaporation transdermique (pertes insensibles en eau). Il y a moins de deutérium dans la vapeur d'eau que dans l'eau corporelle à cause du fractionnement isotopique. Une augmentation des pertes insensibles en eau conduit donc à un calcul erroné de l'ECT.

4.3.4. Prélèvement d'un échantillon de salive

4.3.4.1. Préparation d'un prélèvement

Il est très important de bien préparer le prélèvement et de bien comprendre le mode opératoire pour que les résultats obtenus soient exacts. Il convient d'expliquer clairement au participant la méthode appliquée avant d'effectuer le prélèvement.

Avant de commencer, il faut vérifier que l'on dispose bien du matériel suivant (fig. 12).



FIG. 12. Matériel requis pour un prélèvement de salive.

Ouate et tampons :

- Boules d'ouate utilisées pour prélever des échantillons de salive chez l'adulte et l'enfant ;
- Tampons d'ouate et ouate supplémentaire pour prélever des échantillons de salive chez un nourrisson.

Tubes utilisés pour conserver les échantillons :

- Ces tubes doivent être munis d'un bouchon à vis et d'un joint afin d'éviter les pertes, le fractionnement et la contamination croisée pendant le stockage (on peut par exemple utiliser des cryotubes de 4 mL). Il est conseillé de se servir de bouchons de couleurs différentes pour les échantillons de référence et pour les échantillons prélevés après administration de la dose,

par exemple des bouchons bleus pour les premiers et rouges pour les seconds.

- Ils doivent être parfaitement secs avant d'être utilisés.
- Ils ne doivent pas être réutilisés afin d'éviter toute contamination croisée entre des échantillons enrichis (prélevés après administration d'une dose) et des échantillons non enrichis (de référence).
- Il faut coller sur les tubes une étiquette où figurent l'identifiant du participant et la date et l'heure auxquelles le prélèvement a été effectué, mais pas le nom du participant afin de préserver son anonymat.

Seringues jetables de 20 mL :

- Les seringues doivent être parfaitement sèches avant d'être utilisées.
- Elles ne doivent pas être réutilisées afin d'éviter toute contamination croisée entre des échantillons enrichis (prélevés après administration d'une dose) et des échantillons non enrichis (de référence).

Gants :

- La personne qui prélève un échantillon de salive doit porter des gants neufs jetables.
- Ces gants doivent être jetés avant d'effectuer un prélèvement sur le participant suivant.
- Une fois que la personne en question a mis les gants afin de prélever l'échantillon de référence, elle ne doit pas toucher le flacon qui contient la dose tant que ce prélèvement n'a pas été effectué.

Sachets zip :

- Il faut deux sachets zip par participant : un pour l'échantillon de référence et un pour les échantillons prélevés après administration de la dose.
- Il faut un troisième sachet zip pour conserver ensemble tous les échantillons prélevés sur un même participant.
- Tous les sachets doivent porter en permanence une étiquette sur laquelle figure l'identifiant du participant.

Étiquettes :

- Vérifier que les étiquettes sont de bonne qualité et qu'elles ne peuvent se détacher.

- Utiliser un marqueur indélébile pour écrire sur les étiquettes afin d'éviter les bavures et l'effacement des inscriptions, en particulier au moment où les échantillons sont dégelés.

Fiches de données des participants :

- Il faut disposer d'un exemplaire de la fiche de données pour chaque participant avant le premier prélèvement (échantillon de référence).
- Afin de préserver l'anonymat des participants, ne pas écrire leur nom sur les fiches de données. Les noms et les identifiants correspondants doivent être notés séparément.

On trouvera un exemple de fiche de données d'un participant dans l'appendice III.

4.3.4.2. Heures de prélèvement

Pour un adulte ou un enfant, prélever un échantillon de salive avant administration de la dose et trois et quatre heures après celle-ci. Pour les participants âgés ou dont le volume d'eau extracellulaire est important, il est recommandé de prélever les échantillons quatre et cinq heures après ingestion de la dose. Deux prélèvements pour lesquels l'enrichissement a atteint un plateau permettent de confirmer que l'équilibration entre la dose et l'eau corporelle est achevée. Pour un nourrisson, la salive doit être prélevée deux fois entre deux heures et demie et quatre heures après administration de la dose mais pas dans les quinze minutes qui suivent une tétée.

4.3.4.3. Prélèvement d'échantillons de salive à l'aide de boules d'ouate

Le mode opératoire appliqué pour prélever de la salive chez un adulte ou un enfant est décrit ci-après et est illustré par la figure 13.

Il convient de noter les points suivants :

- Il ne faut pas toucher au flacon qui contient la dose pendant le prélèvement d'un échantillon, depuis le moment où les gants ont été mis jusqu'à ce que le prélèvement d'un échantillon de référence ait été complètement effectué.
- Il faut utiliser des gants propres pour chaque participant.
- Lorsque l'on prélève des échantillons, il faut s'assurer que le participant n'a rien mangé ni bu dans la demi-heure qui précède le prélèvement.



FIG. 13. Prélèvement d'un échantillon de salive à l'aide de boules d'ouate.

Il est recommandé d'appliquer le mode opératoire suivant :

- 1) Donner une boule d'ouate au participant afin qu'il l'imprègne de salive. Lui demander de la remuer dans sa bouche pendant deux minutes ou jusqu'à ce qu'elle soit trempée en gardant la bouche fermée. Lui demander de penser à son plat favori permet d'accroître la salivation.
- 2) Retirer le piston d'une seringue neuve jetable de 20 mL.
- 3) Demander au participant de ramener l'ouate vers l'avant de sa bouche et de la faire passer directement de sa bouche au corps de la seringue (fig. 13).
- 4) Remettre le piston dans le corps de la seringue.
- 5) Coller sur un tube destiné à recueillir l'échantillon une étiquette où figurent l'identifiant du participant et la date et l'heure de prélèvement.
- 6) Retirer le bouchon du tube et se servir du piston de la seringue pour extraire la salive contenue dans l'ouate et la verser dans le tube (fig. 13). Remettre le bouchon afin d'éviter une éventuelle évaporation et le fractionnement isotopique qui en résulte.
- 7) Si l'on ne dispose pas d'au moins 2 mL de salive, répéter les étapes précédentes avec une boule d'ouate neuve. Prélever si possible 4 mL de salive afin de pouvoir effectuer plusieurs analyses.
- 8) Jeter les seringues, l'ouate et les gants entre chaque participant. Ne réutiliser ni les tubes ayant contenu des échantillons ni les seringues.
- 9) Coller sur chaque tube une étiquette où figurent l'identifiant du participant et la date et l'heure où le prélèvement a été effectué. Noter également toutes les dates et heures de prélèvement sur la fiche de données du participant. Ces renseignements doivent être reportés sur un tableur dès que possible.

Les participants doivent éviter toute activité physique tant que le dernier échantillon de salive n'a pas été prélevé.

4.3.4.4. Prélèvement d'échantillons de salive chez des nourrissons à l'aide de tampons d'ouate

Le mode opératoire pour les prélèvements de salive chez le nourrisson est décrit ci-après et est illustré par la figure 14 :

- Utiliser des gants propres pour chaque nourrisson.
- Lorsque l'on prélève un échantillon, attendre au moins quinze minutes après qu'un bébé a été nourri pour la dernière fois de sorte qu'il ne reste ni lait ni aucun autre aliment dans sa bouche.
- Chez les nourrissons, les échantillons de salive sont prélevés à l'aide de tampons d'ouate (fig. 14). Enrouler un bout d'ouate supplémentaire autour du tampon. Prélever un échantillon de salive en remuant le tampon dans la bouche du bébé jusqu'à ce que l'ouate soit trempée. Le temps nécessaire à cette opération diffère d'un nourrisson à l'autre et il faut être patient. Plusieurs tentatives sont parfois nécessaires pour arriver à prélever le volume requis (au minimum 2 mL et de préférence 4 mL).

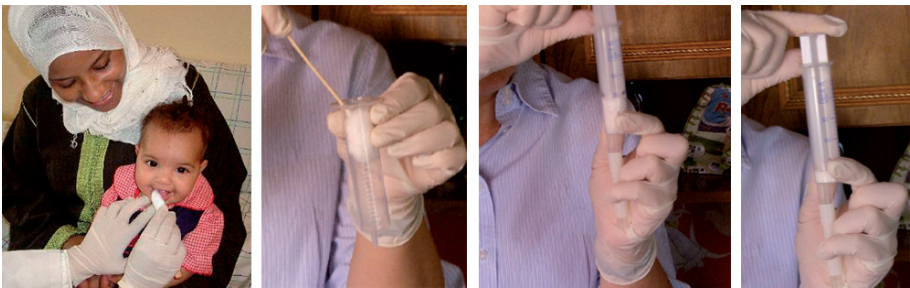


FIG. 14. Prélèvement de salive effectué à l'aide d'un tampon.

Il est recommandé d'appliquer le mode opératoire suivant :

- 1) Retirer le piston d'une seringue neuve jetable de 20 mL. Retirer le tampon d'ouate de la bouche du nourrisson et le mettre dans le corps de la seringue (fig. 14).
- 2) Remettre le piston dans le corps de la seringue.
- 3) Coller sur un tube destiné à recueillir l'échantillon une étiquette où figurent l'identifiant du participant et la date et l'heure de prélèvement.

- 4) Retirer le bouchon du tube et se servir du piston de la seringue pour extraire la salive contenue dans l'ouate et la verser dans le tube. Remettre le bouchon afin d'éviter une éventuelle évaporation et le fractionnement isotopique qui en résulte.
- 5) Si l'on ne dispose pas d'au moins 2 mL de salive, répéter les étapes précédentes avec une boule ou un tampon d'ouate neuf. Prélever si possible 4 mL de salive afin de pouvoir effectuer plusieurs analyses.
- 6) Jeter le tampon, la seringue, l'ouate et les gants entre chaque participant. Ne réutiliser ni les tubes ayant contenu des échantillons ni les seringues.
- 7) Noter l'identifiant du nourrisson et la date et l'heure où l'échantillon a été prélevé sur chaque tube. Toutes les dates et heures de prélèvement doivent être inscrites sur la fiche de données du participant. Ces renseignements doivent être reportés sur un tableur dès que possible.

4.3.4.5. Conservation des échantillons de salive

Étant donné qu'une étude importante donne lieu à des centaines de prélèvements, il est essentiel de gérer et d'étiqueter les échantillons de salive avec soin. Procéder comme suit :

- Fermer soigneusement les récipients afin d'empêcher les pertes en eau par évaporation et la contamination croisée entre échantillons.
- On peut se servir de sachets zip pour conserver ensemble tous les échantillons d'un participant et empêcher les contaminations croisées. Utiliser un sachet zip pour l'échantillon de référence et un autre sachet pour les échantillons prélevés après administration de la dose. Mettre ensuite ces deux sachets dans un sac plus grand de sorte que tous les échantillons prélevés sur un participant soient conservés ensemble.
- Inscrire l'identifiant du participant sur les tubes qui contiennent les échantillons et sur les sachets zip.
- Noter les prélèvements effectués dans un tableur.

Les échantillons de salive doivent être conservés gelés (à -20 °C) jusqu'à ce qu'ils soient analysés afin de limiter autant que possible le développement de bactéries. Si ce n'est pas possible, il faut les entreposer dans un réfrigérateur ou une glacière jusqu'à ce que l'on puisse les mettre dans un congélateur. Afin d'empêcher toute contamination des échantillons :

- Ne jamais conserver les échantillons et les doses au même endroit.

- Fermer hermétiquement le bouchon des tubes qui contiennent les échantillons afin d'éviter les pertes par évaporation et la contamination par la vapeur d'eau contenue dans l'atmosphère.

5. ANALYSE DE L'ENRICHISSEMENT EN DEUTÉRIUM PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER

L'enrichissement des échantillons de salive en deutérium peut être mesuré par spectroscopie IRTF [5]. La figure 15 présente un exemple courant de spectromètre IRTF. On trouvera une brève description des principes de la spectroscopie IRTF dans l'appendice II. Les détails du mode opératoire à appliquer dépendent de la marque et du modèle de l'appareil utilisé mais les notions essentielles et les principales précautions à prendre sont résumées dans les sections suivantes.



FIG. 15. Appareil courant d'IRTF.

5.1. LE LABORATOIRE D'IRTF

- Le spectromètre IRTF doit être installé dans une pièce bien ventilée afin d'éviter l'accumulation de CO_2 dans l'atmosphère. Dans l'idéal, la pièce devrait être climatisée avec un contrôle de la température et de l'humidité. La paillasse sur laquelle le spectromètre est posé ne doit pas être soumise à des vibrations générées par des appareils situés à proximité ou par des sources externes.
- Le spectromètre ne doit pas être déplacé une fois qu'il a été installé. Si cette opération est nécessaire, il convient de faire appel à un technicien afin de vérifier l'alignement des miroirs.
- À l'intérieur de l'appareil, le taux d'humidité doit être inférieur à 60 %. Il convient de remplacer le dessiccateur présent dans la chambre de l'équipement chaque fois que l'indicateur change de couleur. Lorsque le climat est humide, cette opération est parfois effectuée toutes les semaines.

5.1.1. Nettoyage du spectromètre IRTF

Il convient de passer un chiffon humecté d'eau sur l'extérieur de l'appareil afin de le préserver de la poussière. Il n'est pas conseillé de passer un chiffon à l'intérieur du compartiment échantillon. Si du liquide s'échappe de la cellule à l'intérieur du compartiment, celui-ci doit être nettoyé sur-le-champ à l'aide d'un tissu absorbant non pelucheux.

5.2. PRÉPARATION DE L'ÉTALON

Il faut préparer (par gravimétrie) un grand volume de solution étalon à une concentration d'environ 1 000 mg/kg (ppm), ou 1 g/L, en pesant de l'eau deutérée et en la diluant dans de l'eau potable. Notons que la densité du D_2O est de 1,105 g/mL à 25 °C. Il convient de signaler les points suivants :

- Il est commode de préparer un litre de solution étalon dans une fiole jaugée puis de le transférer dans un flacon en verre borosilicaté muni d'un bouchon à vis PTFE pour le stocker jusqu'à utilisation. Il faut également disposer d'un deuxième flacon qui contiendra un litre de l'eau utilisée pour effectuer la dilution. Il est conseillé de conserver les étalons dans plusieurs flacons plus petits et hermétiquement fermés (par ex. des flacons de 250 mL en verre borosilicaté et munis d'un bouchon à vis PTFE). Il convient de n'utiliser en permanence qu'un seul flacon d'eau enrichie et qu'un seul flacon d'eau naturelle comme étalons de travail. Les autres doivent rester fermés jusqu'à

ce que l'on en ait besoin. S'ils sont stockés dans l'obscurité et au frais, les étalons peuvent se conserver plusieurs années. Les flacons doivent être hermétiquement fermés afin que l'eau de l'atmosphère n'y pénètre pas. Ils ne doivent pas être entreposés au même endroit que l'eau deutérée.

- Le D_2O doit être pesé à l'aide d'une balance de précision, précise à 0,0001 g près ou, de préférence, à 0,00001 g près. On trouvera probablement les balances de précision et la verrerie appropriées dans le département de chimie de l'université locale. L'étalon doit être préparé en deux étapes, comme il est expliqué ci-après, mais il est important que le poids de l'eau deutérée soit connu à 0,0001 g près. Il faut mettre de niveau et étalonner les balances avant de les utiliser.
- Il convient de ne pas utiliser d'eau distillée mais de l'eau potable pour préparer l'étalon, car l'eau distillée est soumise au fractionnement isotopique. Conserver un volume similaire d'eau potable à titre d'étalon de référence. Si l'eau potable n'est pas de bonne qualité, il est possible d'accroître la durée de conservation de l'étalon en faisant passer l'eau à travers un filtre stérile de 0,22 μm .

Toute la verrerie doit être propre et sèche avant d'être utilisée.

Il est recommandé d'appliquer le mode opératoire suivant :

- À l'aide d'une balance de précision (précise à 0,0001 g près), peser une fiole jaugée de 50 mL, propre, sèche et munie de son bouchon. On peut aussi utiliser un récipient similaire, par exemple un flacon en verre propre, sec et muni d'un bouchon.
- Verser un petit volume (environ 20 mL) d'eau potable dans la fiole, remettre le bouchon et peser à nouveau.
- Ajouter un gramme de D_2O au récipient. Si, pour ce faire, on se sert d'une pipette à volume variable, le volume choisi doit être de 0,9 mL, car la densité du D_2O est plus élevée que celle de l'eau (respectivement 1,105 g/mL et 1,000 g/mL à 25 °C). Remettre le bouchon afin d'éviter les pertes par évaporation et noter le poids mesuré. Calculer le poids du D_2O contenu dans le flacon.
- Peser une fiole jaugée d'un litre, propre, sèche et munie de son bouchon. À ce stade, une pesée précise à 0,1 g près est suffisante.
- Transférer tout le liquide contenu dans le récipient de 50 mL dans la fiole jaugée d'un litre à l'aide d'un entonnoir. Ajouter de l'eau potable dans le petit récipient et la verser dans la grande fiole. Répéter cette opération au moins trois fois afin que tout le D_2O soit transféré. Éviter de renverser de l'eau.

- Compléter la fiole jaugée d'un litre jusqu'au trait de jauge avec de l'eau potable. Après avoir remis le bouchon, peser à nouveau ce récipient.
- Après avoir noté le poids obtenu, transférer l'étalon dans un flacon en verre propre, sec et muni d'un bouchon à vis PTFE.
- Conserver un volume similaire d'eau potable pour l'utiliser comme étalon de référence ou comme blanc afin de mesurer le spectre de référence.
- Calculer l'enrichissement de l'étalon comme suit :
 - Si A est le poids de D_2O et B le poids de l'eau potable plus le D_2O dans la fiole d'un litre, le poids de l'eau potable ajoutée est égal à $B - A$.

Exemple :

- Poids de D_2O $= 1,0015 \text{ g } (A)$
- Poids de l'eau potable plus D_2O dans la fiole $= 1\,000,1 \text{ g } (B)$
- Poids de l'eau potable ajoutée $= 1\,000,1 \text{ g} - 1,0015 \text{ g}$
 $= 999,0985 \text{ g } (B - A)$
- Enrichissement de l'étalon en $D_2O = A \div (B - A) \times 106 \text{ mg/kg}$
 $= 1,0015 \text{ g} \div 999,0985 \text{ g} \times 10^6 \text{ mg/kg}$
 $= 1\,002 \text{ mg/kg (ppm)}$

Note : $1 \text{ mg/kg} = 1 \text{ mg/L}$, car la densité du H_2O est égale à $1,0 \text{ kg/L}$ à 25°C . La concentration de D_2O dans l'étalon s'élève donc à peu près à $1\,000 \text{ mg/L}$.

Il est possible de contrôler l'enrichissement de l'étalon d'IRTF en le faisant analyser de manière indépendante dans un laboratoire de référence. L'enrichissement mesuré pour la solution étalon devrait être proche de celui qui a été obtenu par gravimétrie, c'est-à-dire calculé selon la méthode décrite ci-dessus.

5.2.1. Durée de conservation des étalons

La durée de conservation des étalons dépend de la qualité de l'eau potable. Les flacons doivent être entreposés dans un endroit frais et sombre et ne doivent pas être exposés directement à la lumière du soleil. Ils ne doivent toutefois pas être mis dans le même réfrigérateur que le D_2O hautement enrichi. Le fait d'envelopper les flacons dans du papier aluminium contribue à protéger leur contenu de la lumière. Les flacons doivent être munis de joints de bonne qualité et être hermétiquement fermés afin que la vapeur d'eau contenue dans l'air n'y pénètre pas. Certains laboratoires recommandent de stocker les flacons à l'envers. En cas de fuite, ils sont alors moins susceptibles de subir un fractionnement isotopique. Certains laboratoires préconisent de conserver les étalons dans

plusieurs flacons de 100 ou 250 mL plutôt que dans des flacons d'un litre. Cette méthode présente l'avantage de n'exposer qu'une petite partie de l'étalon à l'air à n'importe quel moment mais l'inconvénient, c'est que, au fur et à mesure qu'il est utilisé, l'étalon est davantage susceptible de subir un fractionnement. Pour plus d'informations sur le fractionnement, consulter l'appendice V.

5.3. CONSTRUCTION D'UNE COURBE ÉTALON

Une fois le spectromètre IRTF installé, il convient de vérifier l'exactitude de l'analyse du deutérium dans la plage des enrichissements susceptibles d'être détectés à l'aide des étalons préparés par gravimétrie. On peut préparer des volumes plus petits (par ex. 100 mL) de ces étalons en diluant, dans une fiole jaugée, de l'eau deutérée dans de l'eau potable, comme il est expliqué plus haut. L'enrichissement doit être compris entre 0 (eau potable naturelle) et 2 000 mg/kg, c'est-à-dire supérieur à l'enrichissement que l'on est susceptible de trouver dans les échantillons de salive.

Il faut préparer (dans 100 mL d'eau potable) les étalons présentés dans le tableau 5. On peut pipetter le volume de D₂O (colonne 2) pour le verser dans la fiole jaugée, mais il doit être pesé avec exactitude (colonne 3). Il faut également noter (dans la colonne 4) le poids de l'eau potable ajoutée pour compléter le volume d'eau. L'enrichissement réel (en mg/kg) peut être calculé à partir des poids, comme il est expliqué plus haut. Le mode opératoire est illustré par la figure 16. La figure 17 présente un exemple de courbe étalon.

La balance utilisée pour préparer les échantillons doit être posée sur une paillasse stable, loin des fenêtres ouvertes et des courants d'air.

La figure 16 illustre la préparation des étalons comme suit :

- A. Pesée de la fiole jaugée munie de son bouchon.
- B. Introduction de la pipette de D₂O dans un volume d'eau préalablement pesé.
- C. Nouvelle pesée et consignation du poids.
- D. L'opérateur complète au trait de jauge.
- E. Nouvelle pesée.
- F. Consignation du poids. Calcul de l'enrichissement de l'étalon en D₂O.

Si la pente de la courbe étalon n'est pas voisine de un, il y a eu un problème lors des pesées, des calculs ou de l'analyse. Il faut vérifier les données de départ, et, si nécessaire, recommencer le processus et préparer de nouveaux étalons.

TABLEAU 5. PRÉPARATION D'ÉTALONS POUR UNE IRTF

Enrichissement visé (en mg de D ₂ O/kg)	μL de D ₂ O	Poids de D ₂ O à quatre décimales près (en g)	Poids de l'eau potable ajoutée (en g)
0	0		
100	10		
200	20		
400	40		
600	60		
800	80		
1 000	90		
1 500	140		
2 000	180		

5.4. UTILISATION DU SPECTROMÈTRE IRTF

Il faut allumer le spectromètre IRTF trente à quarante minutes avant de l'utiliser pour que l'électronique puisse se stabiliser. L'interface et le miroir doivent être contrôlés afin de s'assurer qu'ils fonctionnent correctement. Enfin, vérifier que l'appareil est réglé de la manière suivante :

— Mode de mesure :	<i>Absorbance</i>	
— Apodisation :	<i>Square triangle</i>	
— Nombre de <i>scans</i> :	32	
— Résolution :	2,0	
— Plage (en cm ⁻¹) :	Minimum 2 300	Maximum 2 900

Il faut effectuer une analyse de référence en utilisant de l'eau non enrichie (naturelle), par exemple l'eau qui a servi à préparer l'étalon (c'est-à-dire l'étalon de référence). L'appareil doit être étalonné en utilisant l'étalon à 1 000 mg/kg (ppm).

Le maximum du pic dû au deutérium se situe autour de 2 504 cm⁻¹ (fig. 18).

L'appareil peut automatiquement effectuer une correction pour tenir compte de la référence. Lorsque le spectre d'absorption de l'eau potable est divisé par celui de la référence, le spectromètre est directement étalonné en mg/kg (ppm) de deutérium supplémentaire.

Les échantillons d'eau corporelle peuvent être traités de la même manière mais, dans ce cas, la teneur naturelle doit être compensée en utilisant l'échantillon de salive de référence (prélevé avant administration de la dose). Le logiciel de l'appareil permet d'effectuer cette correction.

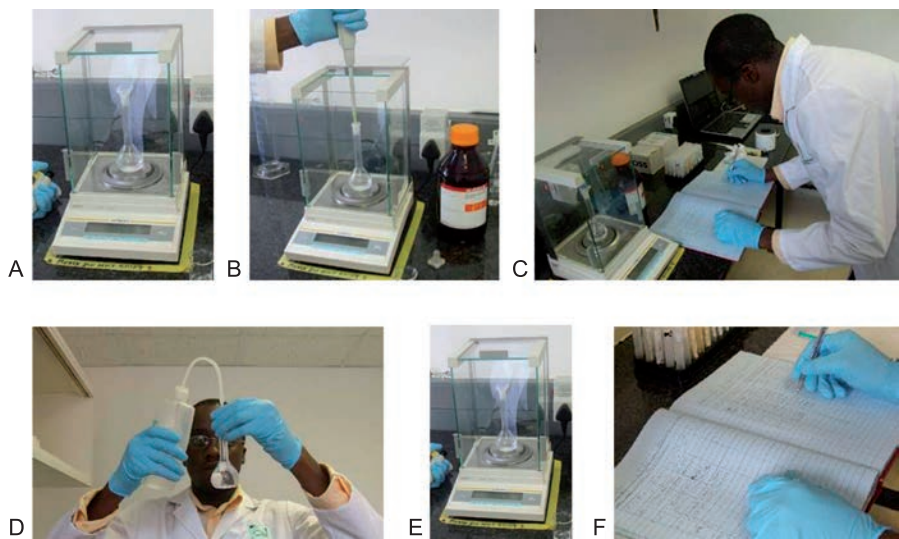


FIG. 16. Préparation d'étalons.

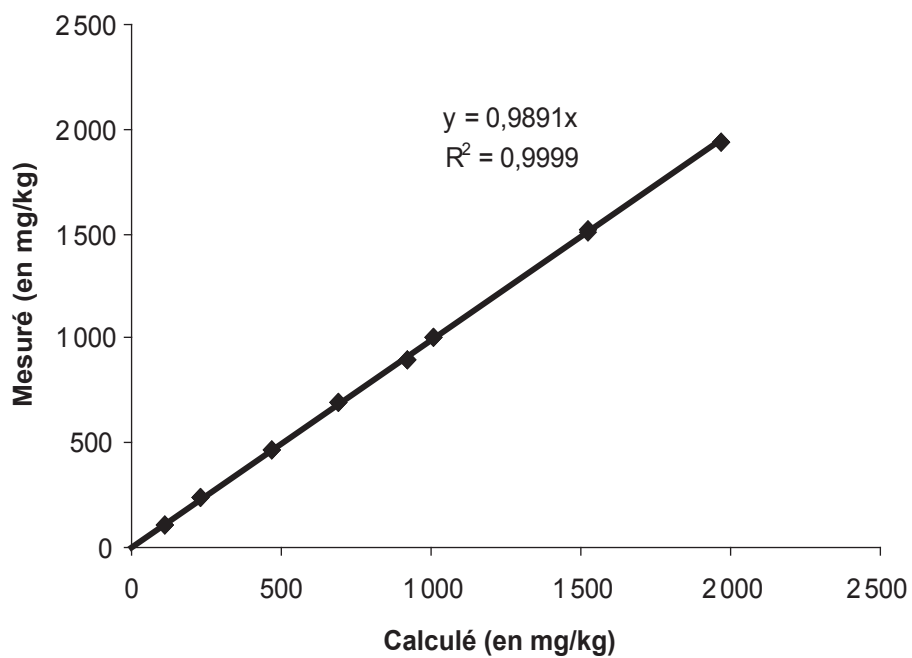


FIG. 17. Courbe étalon obtenue par spectroscopie IRTF pour du deutérium.

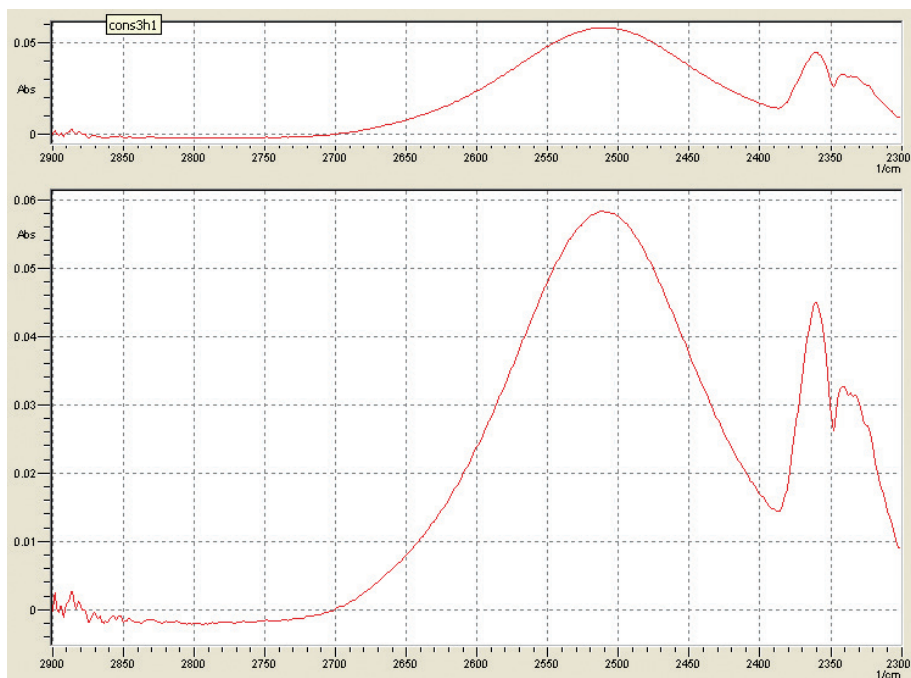


FIG. 18. Spectre IRTF classique pour un échantillon d'eau enrichie en deutérium après prise en compte de la référence.

Pour l'analyse du deutérium, la plage dynamique du spectromètre IRTF contient largement toutes les concentrations susceptibles d'être mesurées lors d'études sur la consommation de lait maternel et la composition corporelle, mais des enrichissements en deutérium inférieurs à 100 mg/kg (ppm) environ doivent être interprétés avec prudence.

5.4.1. Spectre IRTF classique

Le CO_2 atmosphérique provoque la formation d'un doublet prononcé sur l'épaule du signal correspondant au D_2O . Ces pics peuvent être soit positifs (fig. 18), soit négatifs (fig. 19). On obtient des pics négatifs lorsque la concentration de CO_2 dans le compartiment échantillon est plus faible lors de l'analyse de l'échantillon enrichi que lors de l'examen de l'échantillon de référence.

Le pic large observé à $2\,504\text{ cm}^{-1}$ est le pic du D_2O . Le doublet présent à $2\,350\text{ cm}^{-1}$ est dû au CO_2 présent dans le compartiment échantillon.

Des précautions doivent être prises afin de réduire autant que possible la hauteur du pic du CO_2 sur la queue du pic associé la liaison D–O.

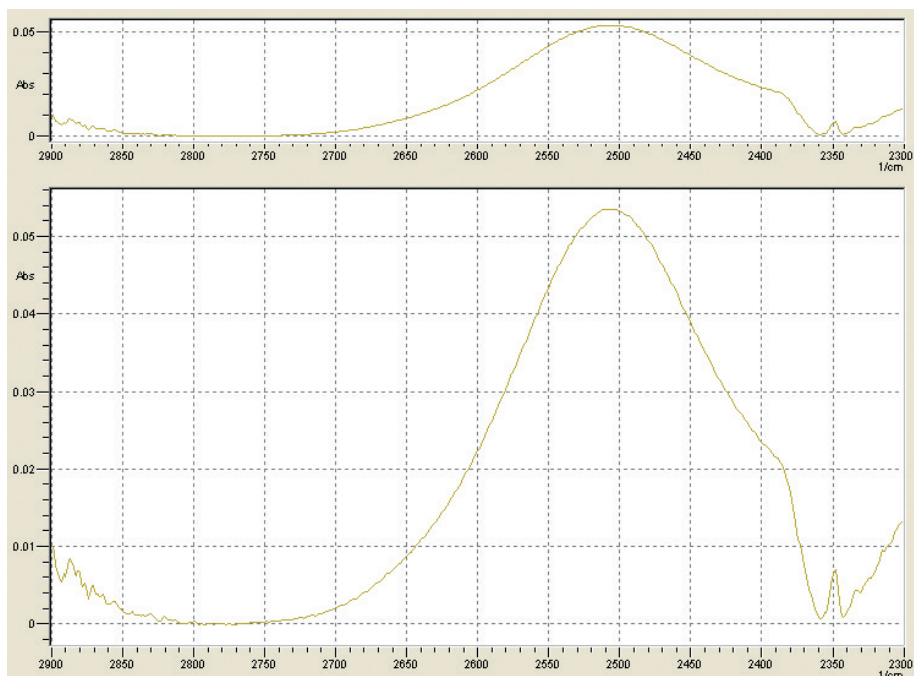


FIG. 19. Spectre IRTF classique corrigé de l'échantillon de référence et qui présente des pics de CO₂ négatifs.

- Le spectromètre IRTF doit être installé dans une pièce bien ventilée ou climatisée.
- Les cellules doivent être remplies avec précaution, en suivant le mode opératoire décrit dans la section 5.6, afin d'éviter la formation de bulles d'air.
- Il convient de ne pas analyser les échantillons qui contiennent des bulles. Celles-ci doivent être chassées en rajoutant de l'échantillon.

5.5. LE BLOC CELLULE SCELLÉ

Il est recommandé de se servir de cellules en fluorure de calcium d'une épaisseur (chemin optique) de 10^{-4} m (100 μ m) pour l'analyse du deutérium présent dans des échantillons de salive. Ces cellules ne peuvent pas être utilisées pour analyser des échantillons d'urine, car l'ammonium et les phosphates qu'ils contiennent les abîment. On trouvera sur la figure 20 le schéma d'une cellule de spectromètre IRTF. Il existe aussi des cellules démontables. Une cellule est représentée sur la figure 21. La méthode à suivre pour remplir une cellule est

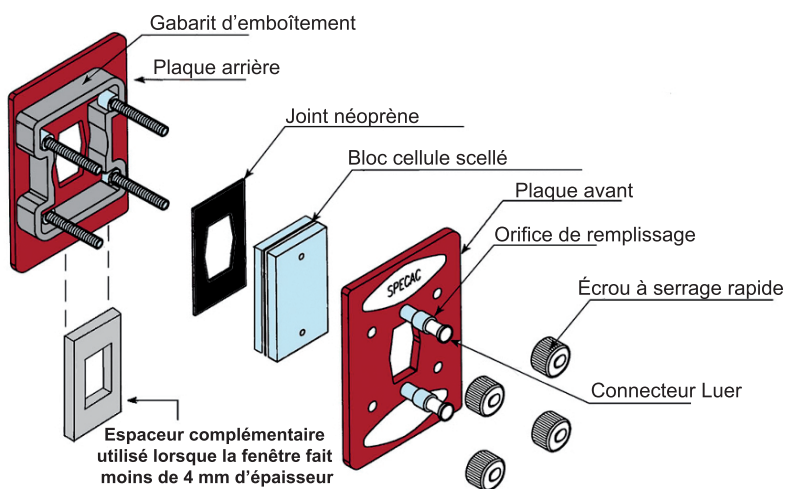


FIG. 20. Schéma d'une cellule de spectromètre IRTF (copyright détenu par Specac Ltd., Royaume-Uni ; reproduit avec son accord).



FIG. 21. Cellule de spectromètre IRTF et seringue d'1 mL insérée dans un des orifices de remplissage. La cellule est soulevée d'un côté à l'aide d'un objet approprié, par exemple un crayon.

décrite dans la section 5.6. Les cellules en chlorure de sodium, généralement fournies avec le spectromètre, ne conviennent pas pour analyser des échantillons qui contiennent de l'eau.

5.5.1. Entretien des cellules

Lorsqu'elles ne sont pas utilisées, les cellules doivent être conservées dans leur emballage d'origine. Elles ne doivent être essuyées qu'avec un tissu non pelucheux. Les rayures légères et les autres défauts présents sur les fenêtres de cellule peuvent être éliminés à l'aide du matériel contenu dans les trousse de polissage disponibles sur le marché (auprès des fournisseurs de cellules). Pour contrôler la planéité d'une fenêtre après l'avoir poli, on peut se servir d'un plan optique. En général, les trousse de polissage en contiennent.

5.6. REMPLISSAGE D'UNE CELLULE DE SPECTROMÈTRE IRTF

Pour remplir les cellules, on se sert de seringues jetables d'1 mL (fig. 21).

5.6.1. Introduction

- Les échantillons de salive doivent être complètement dégelés avant d'être analysés.
- Les tubes ne doivent être ouverts qu'au moment choisi pour remplir une cellule afin d'éviter les pertes en eau par évaporation et donc tout fractionnement au sein de l'échantillon.
- Les tubes qui contiennent les échantillons de salive doivent être centrifugés (munis de leur bouchon) pendant au moins dix minutes à 1 000 g afin de faire descendre l'éventuelle buée qui s'est déposée sur le bouchon dans le reste de l'échantillon et de chasser les bulles d'air.
- Lorsque l'on remplit une cellule, il importe que l'échantillon ne contienne pas de bulles. Celles-ci provoquent une dispersion de la lumière, ce qui fausse gravement la mesure de la référence.
- La fenêtre de la cellule doit être nettoyée à l'aide d'un essuie-verres avant de commencer le remplissage.
- La contenance d'une cellule est d'environ 150 µL. Le versement d'1 mL de salive ou d'eau de référence permet d'éliminer les traces de l'échantillon précédent.

5.6.2. Méthode recommandée pour remplir une cellule de spectromètre IRTF

- 1) Verser l'échantillon (étalon ou salive) dans une seringue d'1 mL.
- 2) Maintenir fermement du papier absorbant plié sur l'orifice afin d'absorber l'excédent d'échantillon et d'empêcher que l'air ne pénètre.
- 3) Remplir la cellule en appuyant doucement sur le piston de la seringue ou en donnant des petits coups fermes sur le piston avec l'index.
- 4) Enlever le liquide projeté à l'extérieur de la fenêtre de la cellule à l'aide de papier absorbant.
- 5) Vérifier que la cellule ne contient pas de bulles d'air en l'exposant à la lumière (fig. 22).



FIG. 22. Méthode de remplissage d'une cellule. On remplit la cellule à l'aide d'une seringue d'1 mL, on vérifie qu'elle ne contient pas de bulles d'air en l'exposant à la lumière et on la met dans le compartiment échantillon du spectromètre.

- 6) Si des bulles sont visibles dans la cellule, rajouter de l'échantillon suivant la méthode décrite ci-dessus jusqu'à ce que toutes les bulles aient été chassées.
- 7) L'absorbance doit être mesurée entre 2 300 et 2 900 cm^{-1} .
- 8) L'échantillon doit être retiré en se servant de la seringue qui a été utilisée pour le remplissage. Après quoi, il convient de jeter cette seringue.
- 9) Utiliser une nouvelle seringue pour chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée.
- 10) Pour l'échantillon suivant, répéter l'étape 1.
- 11) Lorsque tous les échantillons ont été analysés, rincer la cellule avec de l'eau potable avant de la ranger.

6. CALCUL DE LA COMPOSITION CORPORELLE

Le volume de distribution (V_D) du ^2H est 4,1 % plus élevé que celui de l'ECT en raison des échanges d' ^2H qui font intervenir l'hydrogène non aqueux contenu dans l'organisme :

$$\text{ECT (en kg)} = V_D \div 1,041$$

où

$$V_D \text{ (en kg)} = \text{dose de } \text{D}_2\text{O (en mg)} \div \text{enrichissement de la salive en } ^2\text{H (en mg/kg)}$$

On suppose que l'hydratation de la masse maigre (MM) est égale à 73,2 % chez l'adulte :

$$\text{MM (en kg)} = \text{ECT (en kg)} \div 0,732.$$

Pour les enfants, il convient d'utiliser les coefficients d'hydratation de Lohman [16] ou de Fomon [17] (voir les tableaux 1 et 2 à la section 3.4.1).

La masse grasse (MG) est calculée par différence entre le poids corporel et la masse maigre :

$$\text{MG (en kg)} = \text{poids corporel (en kg)} - \text{MM (en kg)}.$$

Le résultat est souvent exprimé sous forme de pourcentage du poids corporel :

$$\text{MG (en \%)} = \text{MG (en kg)} \div \text{poids corporel (en kg)} \times 100.$$

6.1. EXEMPLES DE CALCUL

Le tableau 6 donne des exemples de valeurs pour deux adultes qui présentent le même IMC mais dont la composition corporelle diffère. Il contient également les données obtenues pour un enfant. La dose d'eau deutérée consommée est plus faible pour un enfant que pour un adulte. On utilise le coefficient d'hydratation de la masse maigre qui est adapté à l'âge de l'enfant.

TABLEAU 6. EXEMPLES DE CALCUL

	Adulte 1	Adulte 2	Enfant
Identifiant du participant	A001	A002	Enfant1
Date de l'étude	15 août 2007	15 août 2007	15 août 2007
Date de naissance	9 sept. 1944	29 avril 1979	1 ^{er} avril 2000
Âge (en années)	62	28	7
Poids corporel (en kg)	90	90	25
Taille (en cm)	180	180	130
IMC (en kg/m ²)	27,8	27,8	14,8
Poids de la dose (en g) = poids de D ₂ O consommé (en g)	30,03	29,99	10,05
Poids de la dose (en mg) = dose (en g) × 1 000	30 030	29 990	10 050
Enrichissement de la salive en ² H (en mg/kg)	674	498	610
Volume de distribution du ² H (V _D , en kg) = dose (en mg) ÷ conc. de ² H (en mg/kg)	44,6	60,2	16,5
Coefficient appliqué pour tenir compte des échanges non aqueux	1,041	1,041	1,041
Eau corporelle totale (en kg) = V _D (en kg) ÷ 1,041	42,8	57,8	15,8
Coefficient d'hydratation (adulte : 0,732 ; enfant de sexe féminin âgé de 7 ans : 0,776)	0,732	0,732	0,776
MM (en kg) = ECT (en kg) ÷ coefficient d'hydratation	58,5	79,0	20,4
Masse grasse (en kg) = Poids corporel (en kg) – MM (en kg)	31,5	11,0	4,6
Masse grasse (en % du poids corporel) = MG (en kg) ÷ poids corporel (en kg) × 100	35,0	12,2	18,4
MM (en % du poids corporel) = MM (en kg) ÷ poids corporel (en kg) × 100	65,0	87,8	81,6
ECT (en % du poids corporel) = ECT (en kg) ÷ poids corporel (en kg) × 100	47,6	64,3	63,3

7. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

7.1. ÉTALONNAGE DU SPECTROMÈTRE

Toutes les valeurs obtenues sont comparées à la teneur naturelle de l'eau en deutérium et à des étalons d'eau enrichie dont la teneur en deutérium est connue. Le spectromètre IRTF est étalonné tous les jours avant d'effectuer des mesures sur un lot d'échantillons. Les étalons (concentrations de 0 et 1 000 mg/kg) sont analysés comme s'il s'agissait d'échantillons au début et à la fin de chaque journée de travail. Il convient de construire une courbe étalon lorsque l'appareil est neuf ou n'a pas été utilisé pendant un certain temps avant de commencer à analyser des échantillons.

7.2. PRÉCISION DES ANALYSES

Pour estimer la précision des résultats obtenus, on peut analyser plusieurs fractions d'un même échantillon. En spectroscopie IRTF, la valeur associée à la précision (CV) doit normalement être inférieure à 1 %. $CV = \text{coefficient de variation} = \sigma \div \text{moyenne} \times 100$.

7.3. VARIATIONS DE MESURE

On peut comparer l'ECT calculée à partir de chaque échantillon prélevé après administration de la dose afin d'estimer les variations de mesure, lesquelles résultent des imprécisions liées à l'équilibration, au prélèvement, à la manipulation et à l'analyse. Les échantillons de salive prélevés trois et quatre heures après consommation de la dose doivent aboutir à des valeurs qui ne s'écartent pas de plus de 2 % de leur moyenne.

Si la différence est supérieure à 5 %, il est possible que l'équilibration de la dose n'était pas achevée au moment où le premier prélèvement postérieur à son administration a été effectué. Dans cette situation, l'enrichissement mesuré à l'aide du premier échantillon sera de 100 mg/kg plus élevé qu'avec le deuxième échantillon (fig. 2), à cause de la phase initiale au cours de laquelle l'enrichissement en deutérium dépasse la valeur du plateau final, car l'équilibration entre l'eau deutérée et le liquide intracellulaire n'est pas encore atteinte. Dans ce cas, il convient de se servir du deuxième prélèvement effectué après administration de la dose pour calculer l'ECT. Si cela se produit régulièrement pendant l'étude

pilote, il est recommandé de prélever les échantillons plus tard, par exemple quatre et cinq heures après absorption de la dose.

7.4. VÉRIFICATION DES RÉSULTATS

Il convient d'effectuer les vérifications suivantes :

- L'équivalence des enrichissements en deutérium calculé à l'aide des deux prélèvements effectués après administration de la dose doit être contrôlée (voir ci-dessus).
- L'enrichissement de la salive en deutérium doit être compris entre 600 et 1 200 mg/kg en fonction de la taille de la personne. Le corps des grands individus contient un plus grand volume d'eau que celui des individus petits. Si tous les participants reçoivent la même dose, celle-ci sera plus diluée chez les personnes grandes que chez les personnes petites et, par conséquent, l'enrichissement de la salive sera plus élevé chez ces dernières.
- Si l'enrichissement est inférieur à 600 mg/kg et si les valeurs obtenues pour les deux prélèvements effectués après administration de la dose sont cohérentes, il peut y avoir eu un problème lors de l'absorption de la dose, sauf si le participant est anormalement grand. Dans ce cas, la masse grasse obtenue est très faible et le résultat doit être rejeté.

7.5. DÉTECTION DES VALEURS ABERRANTES

L'ECT mesurée peut être comparée à une valeur prédite en appliquant la méthode de Bland et Altman [22] et les résultats signalés à des fins de contrôle ou de réanalyse s'ils se trouvent en dehors de la plage normale. Si l'on ne dispose pas de valeur prédite, on peut se servir de la relation entre l'ECT et le cube de la taille : $ECT = 7,4 \times \text{taille}^3$ (en m³), validée chez l'enfant et l'adulte [23]. Si la valeur obtenue se trouve en dehors des intervalles de confiance à 95 % associés à cette formule, les résultats et les calculs doivent être vérifiés et les échantillons réanalysés si nécessaire. Toutefois, on peut s'attendre à ce que 2,5 % des mesures dépassent de plus de 2σ la différence moyenne (chez les participants obèses, dont l'IMC est élevé) et que 2,5 % des mesures soient inférieures à la différence moyenne moins 2σ [chez les participants dont l'indice de masse corporelle (IMC) est faible].

La figure 23 présente un exemple de comparaison. L'ECT a été évaluée chez 120 adultes vivant avec le VIH en appliquant la méthode décrite dans le présent manuel. La différence moyenne entre l'ECT calculée grâce à un

enrichissement en deutérium et l'ECT calculée grâce à la taille était de 1,4 kg. Les bornes de l'intervalle de confiance à 95 % associé à cet écart sont -9,1 et 6,4 kg. L'IMC du participant pour lequel la différence entre l'ECT mesurée et l'ECT prédite était de -14 kg s'élevait à 12,2. Lorsque l'IMC est extrêmement faible, la composition corporelle estimée à partir de l'ECT doit être interprétée avec prudence, car les hypothèses relatives à l'hydratation de la masse maigre peuvent ne pas être valides.

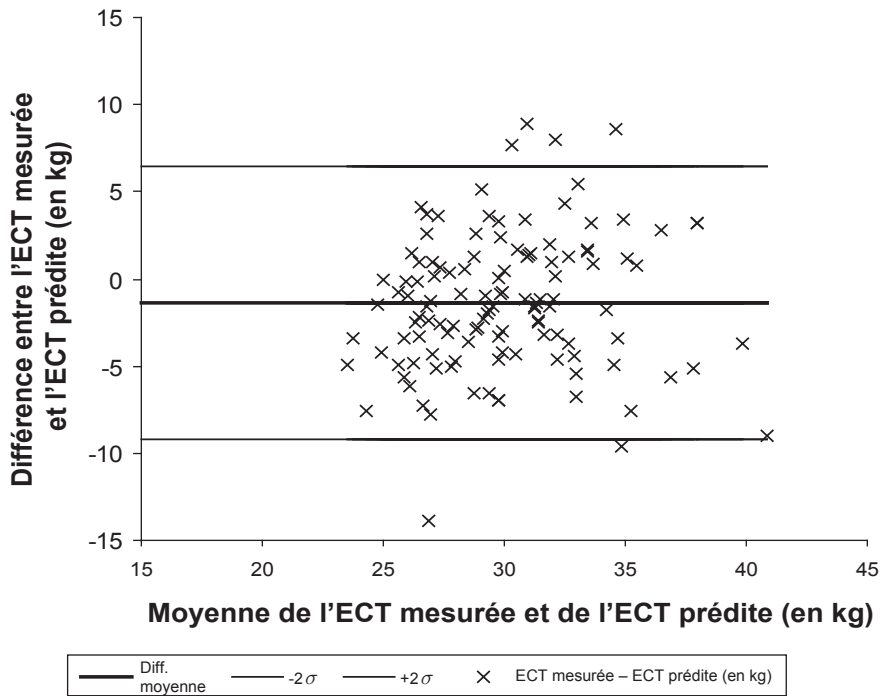


FIG. 23. Graphique de Bland-Altman obtenu pour une ECT mesurée en diluant du deutérium et une ECT estimée grâce à la taille.

8. RÉCAPITULATIF DES OPÉRATIONS ESSENTIELLES À EFFECTUER POUR QUE LES DONNÉES SOIENT DE BONNE QUALITÉ

PRÉPARATION DES DOSES

- Les doses doivent être pesées avec une bonne précision (au moins 0,01 g). Il est préférable que cette opération soit effectuée au laboratoire d'analyse par des scientifiques qualifiés.

SUR LE TERRAIN

- Des hommes de terrain bien formés peuvent apporter leur concours aux relevés anthropométriques, à l'administration des doses et aux prélèvements d'échantillons de salive, mais il faut qu'ils soient conscients de l'importance qu'il y a à ce que la taille et le poids soient mesurés avec soin et que toutes les données soient consignées avec précision. La formation de ces personnes est donc essentielle.
- Les participants doivent consommer une quantité normale de liquides et d'aliments la veille du jour où les mesures sont effectuées et ne doivent pas se fatiguer après le dernier repas de ce jour-là afin d'éviter une déshydratation et l'épuisement des réserves de glycogène.
- Les participants ne doivent ni manger ni boire dans la demi-heure (le quart d'heure pour les nourrissons) qui précède le prélèvement de salive.
- Les participants doivent porter des vêtements légers lorsqu'ils sont pesés (à 0,1 kg près). Le poids des vêtements portés pendant la mesure doit être déduit du poids mesuré afin d'obtenir le poids corporel.
- Avant ouverture, le flacon doit être retourné plusieurs fois afin de mélanger l'éventuelle buée qui s'est déposée sur le bouchon avec le reste du liquide.
- Le flacon ne doit pas être ouvert avant le moment où la dose doit être consommée.
- S'assurer que toute la dose est consommée en ajoutant de l'eau dans le flacon et en demandant au participant de la boire.
- Heures de prélèvement : laisser suffisamment de temps (trois ou quatre heures) pour que l'équilibration du traceur s'effectue. Lorsque le participant est âgé ou malade, prévoir quatre ou cinq heures.
- Une étiquette où figurent l'identifiant du participant et la date et l'heure de prélèvement doit être collée sur les tubes qui contiennent les échantillons.
- Tous les éléments doivent être notés sur la fiche de données du participant.

- Ces renseignements doivent être reportés sur un tableur, par exemple Microsoft Excel, dès que possible.
- Les fiches papier doivent être conservées par mesure de précaution.

AU LABORATOIRE

- Le spectromètre IRTF ne doit pas être déplacé une fois qu'il a été installé. S'il est nécessaire de le déplacer, un technicien doit vérifier l'alignement des miroirs.
- Le spectromètre doit se trouver dans une pièce bien ventilée.
- À l'intérieur de l'appareil, le taux d'humidité doit être inférieur à 60 %. Il convient de remplacer le dessiccateur présent dans la chambre de l'équipement chaque fois que l'indicateur change de couleur. Lorsque le climat est humide, cette opération est parfois effectuée toutes les semaines.
- Les échantillons de salive doivent être complètement dégelés avant d'être analysés.
- Les tubes qui contiennent les échantillons de salive doivent être retournés afin de mélanger l'éventuelle buée qui s'est déposée sur le bouchon avec le reste du liquide.
- Les échantillons de salive doivent être centrifugés à 1 000 g pendant dix minutes avant l'analyse afin de s'assurer que les éventuelles gouttelettes qui se sont déposées sur le bouchon se mélangent avec le reste du liquide et de chasser les bulles d'air qui perturbent l'analyse par IRTF.

9. LISTE DE QUESTIONS-RÉPONSES FRÉQUENTES

Q. Pourquoi ai-je obtenu une valeur négative pour le pourcentage de masse grasse ?

R. Une valeur négative apparaît lorsque l'on n'a pas laissé suffisamment de temps pour que l'équilibration entre la dose de deutérium et l'eau corporelle soit terminée ou lorsque la dose n'a pas été complètement consommée. Cela se traduit par un faible enrichissement en deutérium, lequel entraîne une surestimation de la masse de l'eau corporelle et, par conséquent, aboutit à une masse maigre élevée et à un faible pourcentage de masse grasse.

Q. À quelle fréquence puis-je répéter une mesure ?

R. Chez l'adulte, il faut environ cinq semaines, dans les régions tropicales, pour que la dose de D_2O soit éliminée de l'eau corporelle et pour que la concentration en deutérium revienne à sa valeur normale. Cette durée s'élève à dix semaines dans les régions tempérées. Néanmoins, comme la quantité d'eau corporelle est calculée par différence entre les concentrations en deutérium des échantillons prélevés avant et après administration de la dose, il n'est pas nécessaire d'attendre aussi longtemps avant de répéter une mesure effectuée après équilibration du deutérium, laquelle ne prend que quelques heures. Il faut dans ce cas prélever un deuxième échantillon de référence le jour où cette mesure est réalisée. Lorsque la durée qui sépare ces mesures est courte, il convient de limiter autant que possible la consommation d'eau entre le moment où la dose est absorbée et le dernier prélèvement d'échantillon de salive le jour où la deuxième mesure est effectuée. L'effet de dilution induit par l'eau consommée durant cette période est plus important pour cette mesure que pour la première.

Q. Pourquoi est-il nécessaire de prélever deux échantillons lorsque l'enrichissement a atteint le plateau ?

R. Il est nécessaire de prélever deux échantillons après que l'équilibration a eu lieu afin de s'assurer que l'enrichissement a atteint le plateau. Deux échantillons pour lesquels l'enrichissement est identique (à 2 % près) permettent de confirmer que l'équilibration entre la dose et l'eau corporelle est achevée. Il arrive parfois, chez des participants pour lesquels la vitesse de renouvellement de l'eau dans le corps est faible (par ex. des personnes âgées ou des individus affectés par certaines maladies), que l'équilibration entre la dose et l'eau corporelle ne soit pas terminée au bout de trois heures. L'échantillon prélevé après quatre heures permet de le confirmer et son enrichissement peut être utilisé pour calculer l'ECT. Si l'on ne prélève qu'un seul échantillon après administration de la dose, on ne peut être certain que l'enrichissement a atteint le plateau. Réaliser une

étude pilote afin de vérifier quelle est la durée d'équilibration dans les conditions locales avant de commencer l'étude principale. Si cette durée est supérieure à trois heures, il faut prélever les échantillons quatre et cinq heures après absorption de la dose. Consulter des personnes plus expérimentées afin d'examiner les résultats de l'étude pilote.

Q. Est-il nécessaire de rester à jeun durant les examens ?

R. Le fait de rester à jeun pendant les examens permet d'obtenir une estimation plus précise de l'ECT. Toutefois, dans certaines circonstances, cela n'est pas facile à obtenir, par exemple lorsque le participant est malade ou qu'il s'agit d'une femme qui allaite. Dans ce cas, il peut prendre un repas léger une heure après avoir consommé la dose. Noter le volume de liquides absorbés et le soustraire de l'ECT calculée. Les participants ne doivent rien boire ni manger dans les trente minutes qui précèdent un prélèvement de salive.

Appendice I

INFORMATIONS GÉNÉRALES CONCERNANT LA SÛRETÉ DE L'EAU DEUTÉRÉE

I.1. ISOTOPES DE L'HYDROGÈNE

Un atome est constitué d'un noyau central composé de neutrons et de protons. Ce noyau est entouré d'électrons qui gravitent autour de lui. Les protons portent une charge positive de un et leur masse vaut à peu près une unité de masse atomique (u). Les neutrons sont électriquement neutres et leur masse s'élève à environ 1 u. Les électrons portent une charge négative de un et leur masse est égale à 0,00055 u.

Les atomes qui ne comportent pas le même nombre de protons sont appelés des éléments. Ainsi, l'hydrogène compte un proton, le carbone six et l'oxygène huit. Les isotopes d'un élément ont le même nombre de protons mais diffèrent par le nombre de neutrons. Un isotope stable n'est pas radioactif et est naturellement présent dans l'environnement, y compris dans le corps humain, dans des proportions appelées « teneur naturelle » de l'isotope. La plupart des éléments possèdent un ensemble d'isotopes stables différents. Tous les atomes d'un élément comportent un noyau dont le nombre de protons est identique alors que le nombre de neutrons peut varier s'il existe plus d'une combinaison stable. Les isotopes stables de plusieurs éléments (carbone, hydrogène, oxygène et azote) ont été abondamment utilisés pour des recherches biomédicales.

L'hydrogène est constitué d'un noyau formé d'un seul proton (chargé positivement) et d'un électron (chargé négativement). Le proton a une masse de un, par conséquent, la masse de l'hydrogène est de un. Cet isotope stable est également appelé protium. Le noyau du deutérium, un isotope de l'hydrogène stable et plus lourd, contient un proton et un neutron (qui n'est pas chargé et a une masse de un). La masse du deutérium s'élève donc à deux. La masse d'un élément est souvent indiquée en haut à gauche de la lettre qui symbolise l'élément en question. L'hydrogène est donc représenté par ^1H et le deutérium par ^2H . Le deutérium est également souvent symbolisé par la lettre D. Il a été découvert en 1932.

Le noyau de l'hydrogène comporte un proton	^1H (isotope stable)
Si le noyau contient un seul neutron, il s'agit de deutérium	^2H (isotope stable)
Si le noyau contient deux neutrons, il s'agit de tritium	^3H (isotope radioactif)

La teneur naturelle du deutérium s'élève à 0,015 %. Cela signifie qu'une femme adulte de 55 kg dont la masse d'eau corporelle s'élève à 30 kg contient environ 4,5 g de deutérium dans son eau corporelle.

L'eau deutérée est de l'eau ($^2\text{H}_2\text{O}$) dans laquelle 99,8 ou 99,9 % des atomes d'hydrogène se trouvent sous forme de deutérium. On parle de $^2\text{H}_2\text{O}$ ou de D_2O à 99,8 % (ou 99,9 %). L'eau deutérée peut être utilisée pour mesurer la masse d'eau présente dans le corps (l'eau corporelle totale) par dilution isotopique ou le débit d'eau échangé entre deux volumes distincts (par ex. entre l'eau corporelle de la mère et celle de son enfant par l'intermédiaire du lait maternel).

1.2. SÛRETÉ DE L'EAU DEUTÉRÉE

Les isotopes stables sont utilisés dans les études sur le métabolisme humain depuis plus d'un demi-siècle. Certes, les isotopes stables de l'hydrogène n'émettent pas de rayonnements potentiellement nocifs, mais la masse du deutérium est de deux (^2H) et la masse de l'hydrogène est de un (^1H). La différence de masse entre le deutérium et l'hydrogène (un facteur deux) est plus élevée que pour toute autre paire d'isotopes stables. Cette différence peut provoquer des « effets isotopiques » importants lorsque la concentration d'eau deutérée dans les tissus est très élevée (> 15 %).

Ces effets isotopiques résultent du fait que la présence de deutérium dans une molécule se traduit par une diminution de la taille des liaisons covalentes, ce qui les rend plus solides et plus résistantes aux ruptures. C'est pourquoi les molécules qui contiennent du deutérium présentent une vitesse de réaction légèrement différente de celles qui contiennent seulement de l'hydrogène. La différence de vitesse de réaction entre une réaction qui fait intervenir une molécule qui ne comprend que de l'hydrogène et une réaction à laquelle participe une molécule qui contient du deutérium est appelée « effet isotopique cinétique » et peut apparaître lors de réactions enzymatiques à l'intérieur de l'organisme.

Des études chez l'animal ont montré que le fait que des tissus contiennent plus de 15 % d'eau marquée au deutérium a de nombreuses conséquences, parmi lesquelles une altération de la synthèse des protéines et des acides nucléiques, une modification de la structure et de la stabilité des biopolymères, une modification de la vitesse des réactions enzymatiques, des perturbations lors de la division cellulaire et des changements morphologiques [24]. L'effet global du marquage au deutérium semble être une dépression du métabolisme tissulaire due au fait que les vitesses de réaction sont plus lentes *in vivo* pour les composés qui contiennent du deutérium. Même si certains effets toxiques du marquage au deutérium sont réversibles, des concentrations très élevées de cet isotope peuvent entraîner la mort.

Chez les mammifères, aucun effet nocif n'a été détecté lorsque la concentration de deutérium est inférieure à 15 %. Une concentration de deutérium de 15 % doit être maintenue par une absorption continue de doses avant que des effets indésirables ne deviennent manifestes [24]. Toutefois, des effets moindres, par exemple des crises éphémères de vertiges, ont été signalés chez des êtres humains adultes qui consommaient suffisamment d'eau deutérée pour que l'enrichissement de leur eau corporelle soit compris entre 0,35 et 0,65 % [24]. Certains ont avancé qu'il existe un seuil pour l'apparition d'effets secondaires transitoires visibles lorsque l'enrichissement de l'eau corporelle excède 0,2 %. Le seuil de toxicité du deutérium a été fixé à 15 % et est bien supérieur aux concentrations envisageables pour des études chez l'homme [24]. La quantité de deutérium consommée lors des études portant sur la lactation humaine et sur la composition corporelle conduit à un enrichissement de l'eau corporelle qui culmine à environ 0,1 % chez la mère et à moins de la moitié de cette valeur chez son bébé. À ces concentrations, aucun effet secondaire indésirable n'a été signalé.

Appendice II

SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER

L'enrichissement d'échantillons de salive en deutérium peut être mesuré par spectroscopie IRTF. Les aspects pratiques de cette technique, y compris la préparation des étalons et le remplissage des cellules, sont décrits dans la section 5. Le présent appendice constitue une introduction aux principes de la spectroscopie IRTF.

II.1 PRINCIPES DE LA SPECTROSCOPIE IRTF

Au milieu de la région infrarouge du spectre électromagnétique, l'absorbance est due aux vibrations moléculaires. L'eau présente trois modes vibratoires, qui peuvent être considérés comme des modes de vibration de la liaison O-H (fig. II.1).

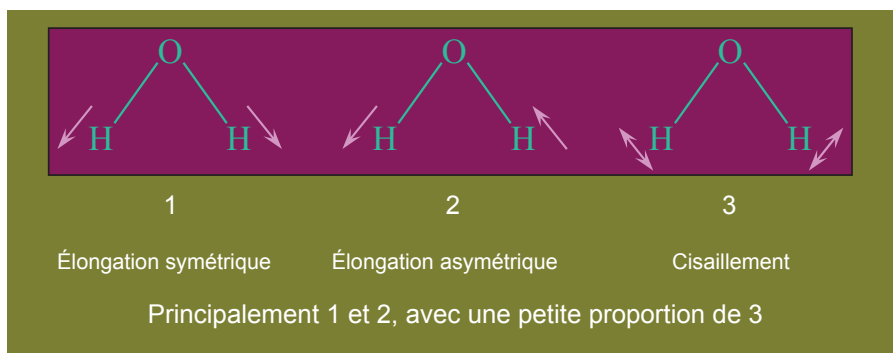


FIG. II.1. Modes de vibration de la liaison O-H dans la molécule d'eau.

L'énergie de vibration dépend de la masse des atomes entre lesquels une liaison est établie. La substitution du deutérium à l'hydrogène provoque une diminution de cette énergie (fig. II.2).

Les positions des pics sont généralement indiquées par un nombre d'onde (en cm^{-1}), une fréquence (en THz) ou une longueur d'onde (en μm) (fig. II.3). Le pic dû au D_2O se situe à $2\,504\text{ cm}^{-1}$ (75,07 THz ou $3,994\text{ }\mu\text{m}$).

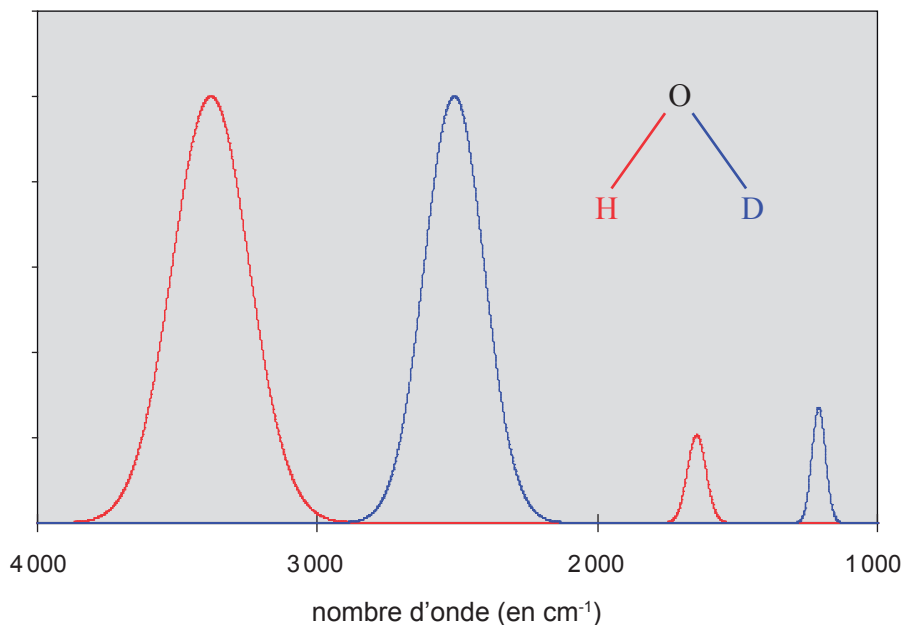


FIG. II.2. Représentation schématique du spectre infrarouge dû aux liaisons O-H et O-D.

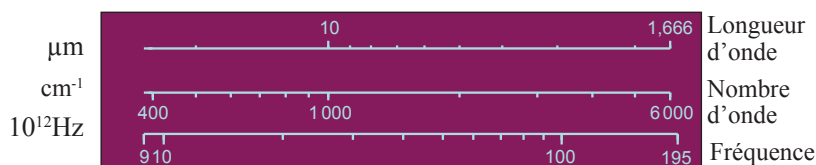


FIG. II.3. Comparaisons entre la longueur d'onde, l'absorbance et la fréquence. (Note : Au fur et à mesure que l'énergie augmente, la fréquence et le nombre d'onde augmentent, mais la longueur d'onde diminue.)

Un spectromètre IRTF est constitué d'une source de rayonnement infrarouge, d'un séparateur de faisceau, de deux miroirs (l'un fixe et l'autre mobile) et d'un détecteur (fig. II.4). Le séparateur de faisceau et les miroirs forment l'interféromètre. L'un des miroirs est fixe, tandis que l'autre est monté sur un bloc qui est conçu pour se déplacer d'avant en arrière à vitesse constante (c'est un miroir mobile). Le rayonnement émis par la source est dirigé vers le séparateur de faisceau. Celui-ci est semi-transparent et semi-réfléchissant, il renvoie la moitié du rayonnement incident vers le miroir fixe et laisse passer l'autre moitié en direction du miroir mobile. Après réflexion sur les miroirs, les deux faisceaux se recombinaient au niveau du séparateur de faisceau et le faisceau

résultant traverse l'échantillon et converge sur le détecteur. Lorsque les faisceaux se recombinent, ils interfèrent. À mesure que le miroir se déplace, la figure d'interférence devient constructive puis destructive puis à nouveau constructive de manière cyclique (fig. II.5).

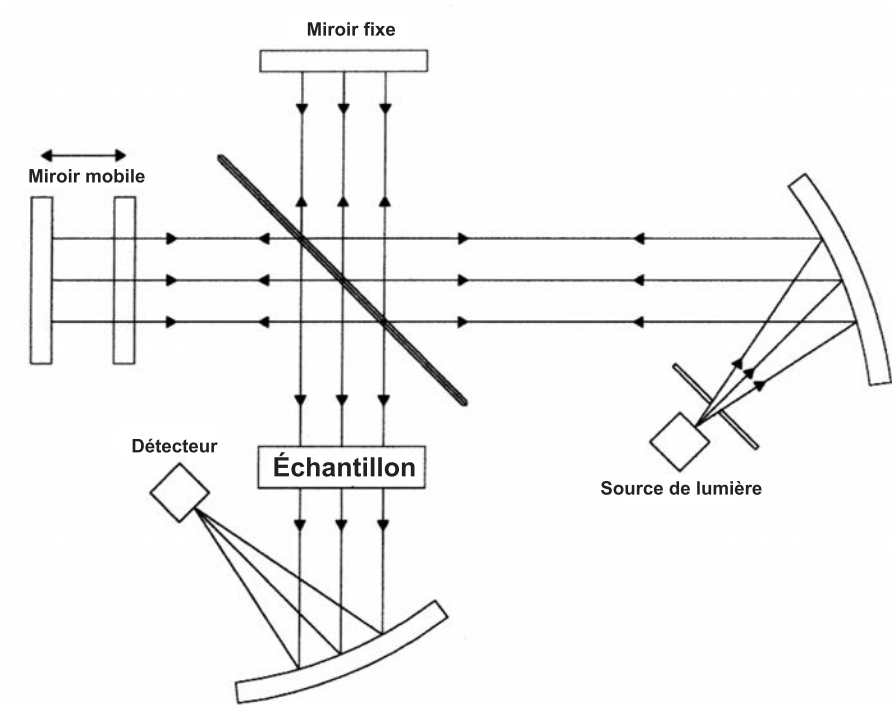


FIG. II.4. Représentation schématique d'un spectromètre IRTF.

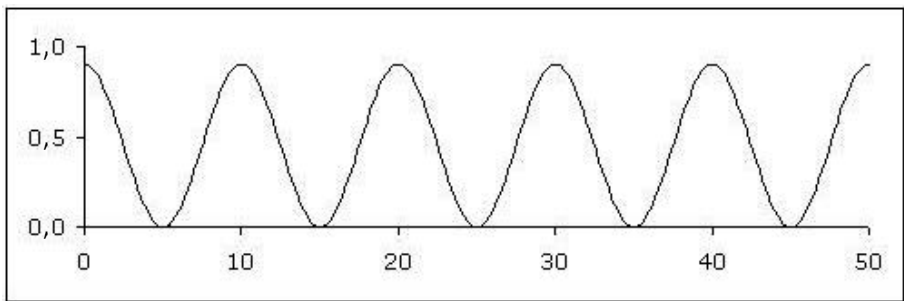


FIG. II.5. Onde sinusoïdale formée par recombinaison d'un faisceau qui ne comporte qu'une longueur d'onde.

Cette opération se produit simultanément pour toutes les longueurs d'onde du signal lumineux. Elles s'ajoutent pour former le résultat final, que l'on appelle l'interférogramme (fig. II.6).

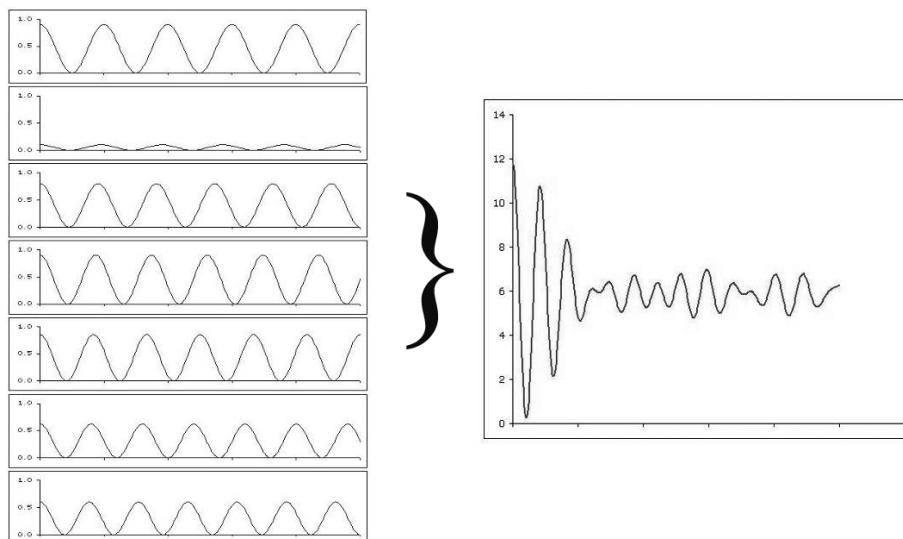


FIG. II.6. Représentation d'un interférogramme formé par sept longueurs d'onde différentes.

Si le signal de sortie de l'interféromètre traverse un échantillon qui absorbe certaines fréquences plus que d'autres, l'amplitude des ondes sinusoïdales individuelles sera différente et l'interférogramme sera donc modifié.

Le détecteur d'un spectromètre IRTF est généralement une substance pyroélectrique, comme le sulfate de triglycine (TGS). Ces substances ont la propriété d'émettre un signal électrique lorsque leur température change. Le signal émis par le détecteur est transformé en tension variable dans le temps, laquelle constitue une représentation fidèle de l'intensité totale de la lumière qui traverse l'échantillon. Cette tension est à son tour convertie en un type de spectre classique par une transformation de Fourier.

Comme la teneur d'un échantillon en deutérium est très faible (fig. II.7), environ 1 000 mg/kg (ppm), et la dynamique des détecteurs n'est pas suffisante pour pouvoir mesurer précisément l'intensité des pics dus aux liaisons O-H et O-D dans le même échantillon, seule l'intensité du pic correspondant à la liaison

O–D est exploitée et la concentration en deutérium est estimée en appliquant la loi de Beer-Lambert. Cette loi énonce que :

« Pour un faisceau parallèle monochromatique qui traverse une solution homogène, la quantité de rayons absorbée (A) est proportionnelle au produit de la concentration (c) par le chemin optique (l) » :

A est proportionnel à c l

$$A = \varepsilon c l$$

$$c = (A \div \varepsilon) l$$

où ε est appelé coefficient d'absorption.

Pour la liaison D–O, le coefficient d'absorption à $2\,504\text{ cm}^{-1}$, ε_{2504} , est égal à $7\,150\text{ M}^{-1}\text{m}^{-1}$ et, pour les mesures, l'épaisseur de la cellule utilisée (le chemin optique) est de 10^{-4} m ($100\text{ }\mu\text{m}$).

Aux faibles teneurs en deutérium observées, le signal correspondant à la liaison O–D apparaît comme un petit pic qui se superpose à la queue du pic dû à la liaison O–H, beaucoup plus grand (fig. II.8). En outre, le CO_2 atmosphérique provoque l'apparition d'un doublet prononcé sur l'épaule du signal correspondant à la liaison O–D. Cela rend l'estimation de la valeur de fond en dessous du pic associé à cette liaison difficile lorsque l'on utilise l'air comme référence. On contourne cette difficulté en se servant d'un échantillon d'eau potable comme référence, ce qui permet d'éliminer une grande partie du signal associé à la liaison O–H et de faire apparaître le pic correspondant à la liaison O–D à $2\,504\text{ cm}^{-1}$ (fig. II.9). Le logiciel de l'appareil soustrait automatiquement l'absorbance de la référence à l'absorbance des échantillons enrichis. Lorsque l'on analyse des échantillons de salive, le prélèvement effectué avant administration de la dose sert de référence.

Probabilités de présence respectives
de différentes espèces chimiques dans
un échantillon d'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm)
de ^2H à l'équilibre

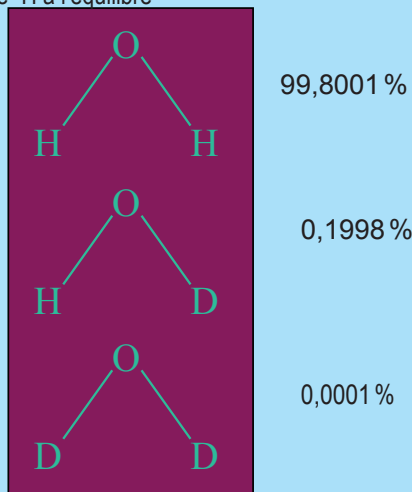


FIG. II.7. Répartition du deutérium dans un échantillon d'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm) de ^2H .

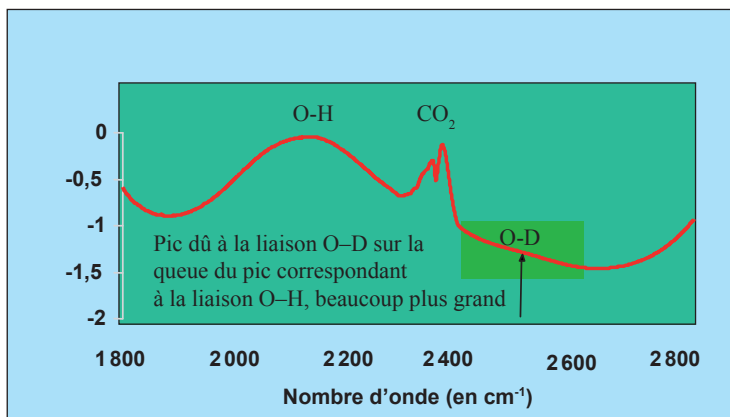


FIG. II.8. Spectre d'absorption obtenu par IRTF pour de l'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm) de ^2H en se servant de l'air comme référence.



FIG. II.9. Spectre IRTF obtenu pour de l'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm) de ^2H en utilisant de l'eau normale comme référence. Le fait d'utiliser de l'eau normale comme référence permet de diminuer considérablement la taille du pic dû à la liaison O–H et de faire apparaître clairement le pic correspondant à la liaison O–D. Cette figure présente le résultat obtenu pour cinq échantillons issus du même prélèvement.

Une méthode mathématique qui permet de comparer le spectre de l'étalon et de l'échantillon et d'ajuster automatiquement les références aux pics a été décrite dans une publication [6]. Cette méthode existe aujourd'hui sous forme d'un programme¹ qui s'exécute sous Windows avec le même système de données que celui de l'appareil et qui exploite directement les fichiers textes issus du spectromètre. Comme la plupart des fabricants exportent les données dans des formats légèrement différents les uns des autres, le logiciel développé par le HNR doit être préalablement configuré afin de l'adapter à l'appareil utilisé. Il existe des configurations pour les spectromètres conçus par Thermo, Unicam et Shimadzu.

¹ Le logiciel est constitué de deux fichiers, « isotope.exe » et « vbrun300.dll » : le premier est un fichier exécutable (programme) spécialement conçu par le HNR. Le deuxième est le moteur d'exécution de Visual Basic. Ces deux fichiers doivent être copiés sur l'ordinateur. Ils peuvent être obtenus sur le site Web du Medical Research Council Collaborative Centre for Human Nutrition Research (www.mrc-hnr.cam.ac.uk). MRC-HNR, Elsie Widdowson Laboratory, Fulbourn Road, Cambridge CB1 9NL, Royaume-Uni. Téléphone : (+44 1223) 426357.

II.2 UNITÉS

En spectroscopie IRTF, l'enrichissement est généralement exprimé sous forme de concentration de deutérium en parties par millions (ppm) en masse (mg/kg) au-delà de la teneur naturelle :

L'enrichissement saisi dans le logiciel « isotope.exe » doit être exprimé en mg/kg.

Note : En SMI, l'unité d'enrichissement est la teneur excédentaire en ^2H , également appelée parfois ppm de ^2H excédentaires. Ces parties par million représentent un rapport molaire (mol/mol) et non un rapport massique (en mg/kg). Les deux types de ppm ne sont pas identiques et ne sont donc pas interchangeables. Cette différence a une incidence sur le calcul du volume de distribution. En effet, lorsque l'on calcule l'ECT à l'aide des données obtenues par IRTF, la dose (des grammes d'eau deutérée) est convertie en mg et l'eau corporelle totale est exprimée en kg. En revanche, lorsque l'on calcule l'ECT à l'aide des résultats d'une SMI, il faut convertir la masse d'eau deutérée consommée en moles. L'ECT sera donc exprimée en moles et doit être convertie en kg. Il est beaucoup simple de calculer l'ECT lorsque les données ont été obtenues par IRTF que lorsqu'elles sont le résultat d'une SMI. Il importe de s'assurer que les tableaux qui servent à calculer l'ECT contiennent les formules adaptées à la méthode utilisée pour effectuer une mesure de l'enrichissement en deutérium.

EXEMPLE DE FICHE DE PRÉLÈVEMENT UTILISÉE POUR ESTIMER L'ECT PAR DILUTION D'EAU DEUTÉRÉE

Appendice IV

LISTE DE MATÉRIEL

Au laboratoire

- Eau deutérée (teneur en ^2H de 99,8 ou 99,9 %) ;
- Flacons destinés à recevoir les doses (à bouchon à vis et étanches, par ex. des flacons grande ouverture étanches, en polypropylène, stérilisables à l'autoclave et de 60 mL) ;
- Étiquettes pour les flacons contenant les doses ;
- Stylos indélébiles pour écrire sur les étiquettes ;
- Éprouvette graduée en verre utilisée pour verser 30 mL de $^2\text{H}_2\text{O}$ dans les flacons ;
- Entonnoir en verre ou en plastique ;
- Balance électronique précise à 0,01 g pour peser les doses ;
- Balance électronique précise à 0,0001 g pour préparer les étalons ;
- Réfrigérateur pour stocker les doses ;
- Congélateur (à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pour conserver les échantillons de salive ;
- Régulateurs de tension pour tous les appareils électroniques (balances électroniques et spectromètre IRTF) ;
- Centrifugeuse à godets, dans l'idéal réfrigérée, utilisée pour les tubes d'échantillon ;
- Spectromètre IRTF ;
- Cellules en fluorure de calcium pour le spectromètre ;
- Seringues jetables d'1 mL en plastique et munies d'un embout Luer pour le remplissage de la cellule du spectromètre ;
- Papier absorbant ;
- Essuie-verres pour nettoyer la fenêtre de la cellule du spectromètre ;
- Fioles jaugées (de 1 L, 100 mL et 50 mL) pour préparer les étalons ;
- Micropipettes (de 1 mL, 200 μL et 20 μL) et embouts pour préparer les étalons ;
- Pissette utilisée pour remplir les fioles jaugées ;
- Deux flacons (d'un litre) en verre borosilicaté et munis d'un bouchon à vis PTFE ; ils servent à stocker les étalons et l'eau potable utilisée pour préparer ces étalons ;
- Flacons en verre borosilicaté de 100 ou 250 mL et munis d'un bouchon à vis PTFE dans lesquels seront versés des aliquots de l'étalon et de l'eau potable utilisée comme « étalon de travail » au quotidien.

Sur le terrain

- Doses (préparées au laboratoire) ;
- Eau potable ;
- Pailles ;
- Balance précise à 0,1 kg près pour peser les participants ;
- Toise destinée à mesurer la taille des participants ;
- Tubes munis de bouchons à vis pour les échantillons de salive (par ex. des cryotubes autoporteurs de 4 mL à filetage intérieur) ;
- Étiquettes pour les tubes d'échantillon ;
- Stylos indélébiles pour écrire sur les étiquettes ;
- Sachets zip destinés à conserver les échantillons de salive ;
- Boules d'ouate pour les prélèvements d'échantillons ;
- Seringues en plastique de 20 mL ;
- Gants jetables ;
- Sacs ou boîtes en plastique pour stocker ou transporter les échantillons de salive ;
- Montre (pour noter l'heure où les prélèvements sont effectués) ;
- Réfrigérateur pour conserver les doses si l'on travaille sur le terrain pendant plusieurs jours sans revenir au centre ;
- Glacière et bloc réfrigérant pour entreposer les échantillons sur le terrain jusqu'à ce qu'ils puissent être congelés.

Appendice V

FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE

Les propriétés physiques de l'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) ne sont pas les mêmes que celles de l'eau normale.

Lorsque l'eau deutérée se mélange à l'eau corporelle, trois formes isotopiques coexistent (fig. V.1). Ainsi, dans un échantillon d'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm) d'eau deutérée, la probabilité qu'un H quelconque soit un ^2H est égale à 0,001 et la probabilité qu'il soit un ^1H s'élève à 0,999.

Pour toute molécule d'eau, la probabilité que les deux H soient des ^1H ($^1\text{H}-\text{O}-^1\text{H}$) est égale à :

$$P(^1\text{H}-\text{O}-^1\text{H}) = 0,999 \times 0,999 = 0,998001 \text{ ou } 99,8001 \%$$

La probabilité que les deux H soient des ^2H ($^2\text{H}-\text{O}-^2\text{H}$) s'élève à :

$$P(^2\text{H}-\text{O}-^2\text{H}) = 0,001 \times 0,001 = 0,000001 \text{ ou } 0,0001 \%$$

La probabilité qu'une molécule d'eau quelconque contienne un ^1H et un ^2H est de :

$$P(^1\text{H}^2\text{HO}) = 2 \times 0,999 \times 0,001 = 0,001998 \text{ ou } 0,1998 \%$$

Le facteur deux est dû au fait qu'il existe deux combinaisons possibles, $^1\text{H}-\text{O}-^2\text{H}$ et $^2\text{H}-\text{O}-^1\text{H}$, qui sont équivalentes.

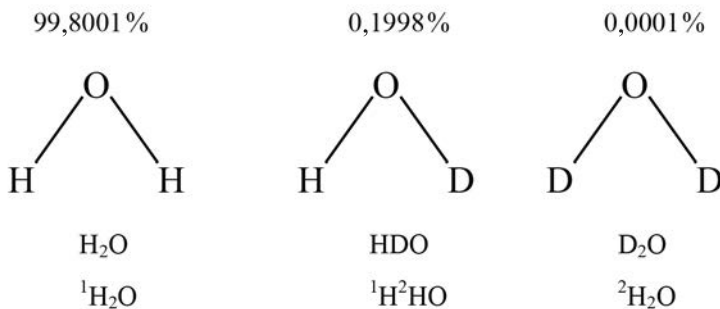


FIG. V.1. Proportions respectives des différentes molécules dans un échantillon d'eau contenant 1 000 mg/kg de D_2O .

L'énergie de la liaison entre le deutérium (^2H ou D) et l'oxygène (O) est légèrement plus élevée que celle de la liaison entre l'hydrogène (^1H) et l'oxygène. Cela peut provoquer un fractionnement isotopique lorsque l'eau subit une modification chimique ou physique. Un tel fractionnement se produit lorsque de l'eau liquide se transforme en vapeur d'eau (gaz).

Il y a moins de deutérium dans la vapeur d'eau que dans le volume principal d'eau liquide dont la vapeur est issue. Le coefficient de fractionnement (f) pour le deutérium entre la vapeur d'eau (un gaz) et l'eau liquide s'élève à 0,941 à 25° C.

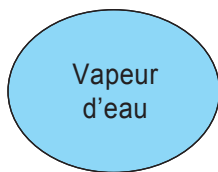
Il y a très peu de fractionnement isotopique à l'intérieur du corps. Dans le plasma, les urines, le lait maternel et la sueur, le fractionnement est faible. En revanche, l'eau qui sort du corps sous forme de vapeur d'eau au cours de la respiration ou par évaporation transdermique contient moins de deutérium que l'eau corporelle. L'évaporation transdermique est une perte insensible en eau par la peau sans que cette eau soit sécrétée par les glandes sudoripares. Une augmentation des pertes insensibles en eau, qui contiennent moins de deutérium que l'eau corporelle, a donc pour effet de concentrer l'eau deutérée qui reste. Cela conduit à une sous-estimation de l'eau corporelle totale et par conséquent à une surestimation de la masse grasse. Les participants ne doivent donc pas pratiquer une activité physique excessive durant la période comprise entre l'administration de la dose et les prélèvements d'échantillons de salive.

De même, la vapeur d'eau condensée sur les bouchons des flacons utilisés pour stocker les doses, les échantillons et les étalons contient moins de deutérium que le reste du liquide. Les flacons doivent donc être retournés ou centrifugés pour mélanger ces deux types d'eau avant de les ouvrir et ne doivent pas être laissés ouverts.

L'exemple suivant (fig. V.2) montre l'effet du fractionnement lorsque 100 μL de buée sont collés au bouchon d'un tube contenant 4 mL de salive et dont la concentration initiale en D_2O s'élevait à 1 000 mg/kg.

L'effet du fractionnement est plus prononcé lorsque le volume de salive est faible. Par exemple, si un tube qui contient 1 mL de salive reste ouvert et si 100 μL de liquide s'évaporent, il ne restera dans le tube que 900 μL (0,9 mL), qui contiendront 1 006 mg/kg de D_2O (fig. V.3).

100 μL de buée
(941 ppm de ^2H)



Probabilité $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,8119 %
Probabilité $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,1880 %

3,9 mL de salive
(1 001,5 ppm de ^2H)

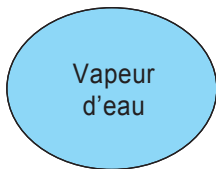


Probabilité $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,8999 %
Probabilité $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,2001 %

$$f = 0,941 \text{ } ^2\text{H}_2\text{O (gaz)} \div \text{ } ^2\text{H}_2\text{O (liquide)}$$

FIG. V.2. Effet du fractionnement isotopique sur un échantillon de salive de 4 mL contenant initialement 1 000 mg/kg (ppm) de D_2O .

100 μL de condensation
(941 ppm de ^2H)



Probabilité $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,8119 %
Probabilité $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,1880 %

0,9 mL de salive
(1 006 ppm de ^2H)



Probabilité $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,7989 %
Probabilité $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,2010 %

$$f = 0,941 \text{ } ^2\text{H}_2\text{O (gaz)} \div \text{ } ^2\text{H}_2\text{O (liquide)}$$

FIG. V.3. Effet du fractionnement isotopique sur un échantillon de salive d'1 mL contenant initialement 1 000 mg/kg (ppm) de D_2O .

GLOSSAIRE

deutérium. Isotope stable de l'hydrogène dont le symbole est ^2H (ou D).

dilution isotopique. Une quantité connue d'un composé marqué est ajoutée à un système biologique et se mélange complètement avec un volume de ce composé. La dilution du composé marqué dans le composé non marqué et endogène permet de mesurer ce volume. Ce principe est à la base de la méthode de mesure de l'eau corporelle totale par dilution de deutérium.

eau corporelle totale (ECT). Expression employée pour désigner l'ensemble de l'eau contenue dans l'organisme, eau qui représente 70 à 75 % du poids corporel à la naissance puis diminue pour atteindre 50 à 60 % de ce même poids chez un adulte mince et moins de 40 % chez un adulte obèse. La masse maigre est constituée d'environ 73,2 % d'eau chez l'adulte. La mesure de l'eau corporelle totale (ECT) permet de déterminer la quantité de masse maigre. La masse grasse est calculée par différence entre le poids corporel et la masse maigre. L'ECT comprend à la fois le liquide intracellulaire et le liquide extracellulaire.

eau deutérée. Eau dans laquelle 99,8 ou 99,9 % des atomes d'hydrogène se trouvent sous forme de deutérium ($^2\text{H}_2\text{O}$ ou D_2O).

échange isotopique. Le deutérium (^2H) peut se substituer à des atomes d'hydrogène (^1H) dans des molécules d'eau et dans d'autres composés. Ce phénomène est appelé échange isotopique.

échange non aqueux. Le fait, pour des isotopes présents dans l'eau corporelle, de se fixer sur d'autres composés présents dans l'organisme que l'eau est appelé échange non aqueux. Le deutérium se substitue par exemple aux atomes d'hydrogène échangeables (surtout ceux des groupes $-\text{NH}$ et $-\text{OH}$) dans les protéines du corps. Les isotopes de l'hydrogène sont également emprisonnés dans les graisses et dans les protéines lorsqu'elles sont synthétisées, c'est pourquoi le volume de distribution, également appelé espace de dilution, du traceur est légèrement plus grand que l'ECT : il est égal à 1,041 fois l'ECT. Cette différence est prise en compte en divisant le volume de distribution calculé par 1,041 pour obtenir l'ECT (en kg).

enrichissement. Comme les isotopes stables sont naturellement présents, des échantillons de référence doivent être prélevés avant administration du composé marqué. L'enrichissement est la concentration d'un isotope

au-delà de sa teneur de référence. La concentration de deutérium dans l'eau corporelle (au-delà de la teneur de référence) peut être mesurée par IRTF. Comme la référence est automatiquement soustraite lorsque l'on analyse la concentration en deutérium par cette méthode, le résultat obtenu est un enrichissement en mg/kg.

équilibre. Les atomes d'hydrogène des molécules d'eau présentes dans l'organisme ne sont pas fixés en permanence sur les atomes d'oxygène, mais subissent constamment des échanges : ils ne restent jamais dans le même état. Lorsque quelqu'un boit une dose d'eau deutérée, il n'y a pas simplement mélange entre l'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) et l'eau contenue dans le corps. Des échanges se produisent entre les atomes de deutérium du $^2\text{H}_2\text{O}$ et les atomes d'hydrogène des molécules d'eau, de sorte qu'au bout de quelques heures, la probabilité de détecter une molécule de $^2\text{H}_2\text{O}$ devient très faible. La plupart des molécules d'eau restent sous forme d' $^1\text{H}_2\text{O}$, mais on en trouve quelques-unes sous forme d' $^1\text{H}^2\text{HO}$ après échange d'un ^1H par un ^2H . Ce processus est appelé équilibre.

fractionnement. Le fractionnement isotopique est l'expression employée pour désigner le fait que des molécules qui contiennent des isotopes distincts présentent des vitesses de réaction légèrement différentes. Cela peut se produire en cas de modification physique, par exemple une évaporation. L'eau qui sort de l'organisme sous forme de vapeur d'eau au cours de la respiration contient moins de deutérium que l'eau corporelle. De même, la vapeur d'eau qui se condense sur les bouchons des flacons utilisés pour stocker des doses, des échantillons et des étalons contient moins de deutérium que le reste du liquide. Les flacons doivent donc être retournés pour en mélanger le contenu avant d'être ouverts.

isotopes. Éléments chimiques qui comportent le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent.

- Le noyau de l'**hydrogène** comporte un proton ^1H (isotope stable) ;
- Si le noyau contient un seul neutron, il s'agit de **deutérium** ^2H (isotope stable) ;
- Si le noyau contient deux neutrons, il s'agit de **tritium** ^3H (isotope radioactif).

isotope radioactif. Le noyau des isotopes radioactifs est instable et émet un rayonnement ionisant sous forme de particule ou d'onde. La décroissance radioactive est le processus par lequel un noyau libère de l'énergie pour

atteindre un état de plus basse énergie. Le tritium est l'isotope radioactif de l'hydrogène. Sa période est de 12,35 ans.

isotope stable. Les isotopes stables ne sont pas radioactifs et sont naturellement présents dans l'environnement, y compris dans le corps humain, à des concentrations appelées « teneur naturelle » de l'isotope. L'hydrogène compte deux isotopes stables : le ^1H ou protium, son isotope stable le plus important, et le ^2H ou deutérium, plus rare. Dans l'eau naturelle, environ 0,015 % des atomes d'hydrogène se trouvent sous forme de deutérium (^2H).

masse maigre. Expression utilisée dans les études de composition corporelle pour désigner la partie du corps qui n'est pas grasse. La masse maigre comprend l'eau, les protéines, les minéraux osseux et les minéraux non osseux. La masse maigre contient 73,2 % d'eau chez un adulte en bonne santé [9], mais son hydratation est plus élevée chez les enfants, après le premier trimestre de grossesse et dans certaines conditions cliniques.

mesure de l'ECT par dilution d'eau deutérée. Technique bien établie pour mesurer l'eau corporelle totale (ECT) et dans laquelle la composition corporelle est estimée à l'aide d'un modèle à deux compartiments en supposant que l'organisme est composé d'une masse grasse et d'une masse maigre (MM). Chez un adulte en bonne santé, la masse maigre est constituée à 73,2 % d'eau. $\text{ECT (en kg)} \div 0,732 = \text{MM (en kg)}$. La masse grasse est calculée par différence entre le poids corporel et la masse maigre.

pertes insensibles en eau. Cette expression désigne l'eau perdue par le corps au cours de la respiration et par évaporation transdermique, cette dernière étant une perte en eau par la peau sans que cette eau soit sécrétée par les glandes sudoripares. L'eau qui sort de l'organisme sous forme de vapeur d'eau contient moins de deutérium que l'eau corporelle liquide en raison du fractionnement isotopique. Une correction est effectuée pour tenir compte des pertes insensibles en eau lorsque l'on estime, à l'aide de la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère, la quantité d'eau consommée qui ne provient pas du lait maternel chez des bébés nourris au sein.

spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Technique utilisée pour mesurer l'enrichissement d'échantillons de salive en deutérium dans des études sur la composition corporelle et sur la consommation de lait maternel.

technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère. Méthode utilisée pour évaluer la consommation de lait maternel chez des bébés nourris au sein et qui consiste à administrer une dose d'eau deutérée à la mère et à mesurer la vitesse d'élimination de l'eau deutérée chez la mère et la vitesse d'apparition de cette même espèce chimique chez le nourrisson. Cette technique permet également d'estimer la quantité d'eau consommée qui ne provient pas du lait maternel.

teneur isotopique. Nombre d'atomes d'un isotope stable donné exprimé en pourcentage du nombre total d'atomes du même élément. Ainsi,

$$\text{Teneur isotopique en } ^2\text{H} = \frac{[^2\text{H}]}{[^1\text{H}] + [^2\text{H}] + [^3\text{H}]} \times 100.$$

En pratique, le nombre d'atomes de ^3H est négligeable et est donc ignoré.

volume de distribution. Volume dans lequel l'isotope se répartit, également appelé espace de dilution. Dans les études qui mesurent l'eau corporelle totale par dilution de deutérium, le volume de distribution (V_D) est plus grand que l'ECT en raison des échanges non aqueux.

RÉFÉRENCES

- [1] SCHOELLER, D.A., “Hydrometry: Human body composition”, 2nd edn (HEYMSFIELD, S.B., et al., Eds), Human Kinetics, Champaign, IL (2005) 35–49.
- [2] PARKER, L., et al., Validity of six field and laboratory methods for measurement of body composition in boys, *Obes. Res.* **11** (2003) 852–858.
- [3] WELLS, J.C.K., FEWTRELL, M.S., Measuring body composition, *Arch. Dis. Child.* **91** (2006) 612–617.
- [4] PROSSER, S.J., SCRIMGEOUR, C.M., High precision determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ in H_2 and H_2O by continuous-flow isotope ratio mass spectrometry, *Anal. Chem.* **67** (1995) 1992–1997.
- [5] JENNINGS, G., et al., The use of infrared spectrophotometry for measuring body water spaces, *Clin. Chem.* **45** (1999) 1077–1081.
- [6] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Assessment of Body Composition and Total Energy Expenditure in Humans by Stable Isotope Techniques, IAEA Human Health Series No. 3, IAEA Vienna (2009).
- [7] COWARD, W.A., et al., Breast-milk intake measurement in mixed-fed infants by administration of deuterium oxide to their mothers, *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* **36C** (1982) 141–148.
- [8] DAVIES, P.S.W., WELLS, J.C.K., Calculation of total body water in infancy, *Eur. J. Clin. Nutr.* **48** (1994) 490–495.
- [9] PACE, N., RATHBUN, E.N., Studies on body composition, III. The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content, *J. Biol. Chem.* **158** (1945) 685–691.
- [10] RITZ, P., Body water spaces and cellular hydration during healthy aging, *Ann. NY Acad. Sci.* **904** (2000) 474–483.
- [11] SCHOELLER, D.A., Changes in total body water with age, *Am. J. Clin. Nutr.* **50** (1989) 1176–1181.
- [12] WANG, Z.M., et al., Hydration of fat-free body mass: review and critique of a classic body-composition constant, *Am. J. Clin. Nutr.* **69** (1999) 833–841.
- [13] HEWITT, M.J., et al., Hydration of fat-free mass in children and adults: Implications for body composition assessment, *Am. J. Physiol.* **265** (1993) E88–E95.
- [14] LOHMAN, T.G., et al., Assessing body composition and changes in body composition: another look at dual-energy X-ray absorptiometry, *Ann. NY Acad. Sci.* **904** (2000) 45–54.
- [15] LOHMAN, T.G., Applicability of body composition techniques and constants for children and youths, *Exercise and Sports Science Reviews* (PANDOLF, K.B., Ed.), MacMillan, New York (1986) 325–357.
- [16] LOHMAN, T.G., “Estimating body composition in children and the elderly”, *Advances in Body Composition Assessment, Current Issues in Exercise Science, Monograph 3* (LOHMAN, T.G., Ed.), Human Kinetics, Champaign, IL (1992) 65–77.
- [17] FOMON, S.J., et al., Body composition of reference children from birth to age 10 years, *Am. J. Clin. Nutr.* **35** (1982) 1169–1175.

- [18] BUTTE, N.F., et al., Body composition during the first 2 years of life: An updated reference, *Pediatr. Res.* **47** (2000) 578–585.
- [19] FOMON, S.J., NELSON, S.E., Body composition of the male and female reference infant, *Ann. Rev. Nutr.* **22** (2002) 1–17.
- [20] WELLS, J.C., et al., Four compartment model of body composition in children: density and hydration of fat-free mass and comparison with simpler models, *Am. J. Clin. Nutr.* **69** (1999) 904–912.
- [21] LOF, M., FORSUM, E., Hydration of fat-free mass in healthy women with special reference to the effect of pregnancy, *Am. J. Clin. Nutr.* **80** (2004) 960–965.
- [22] BLAND, J.M. ALTMAN, D.G., Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet* **1** (1986) 307–310.
- [23] SLATER, C., PRESTON, T., A simple prediction of total body water to aid quality control in isotope dilution studies in subjects from 3–87 years of age, *Isot. Environ. Health Stud.* **41** 2 (2005) 99–107.
- [24] JONES, P.J., LEATHERDALE, S.T., Stable isotopes in clinical research: Safety reaffirmed, *Clin. Sci.* **80** (1991) 277–280.

AUTRES OUVRAGES À CONSULTER

FULLER, N.J., et al., Four compartment model for the assessment of body composition in humans: Comparison with alternative methods, and evaluation of the density and hydration of fat-free mass, *Clin. Sci.* **82** (1992) 687–693.

GIBSON, R.S., *Principles of Nutrition Assessment*, 2nd edn, Oxford University Press, New York (2005).

HALLIDAY, D., MILLER, A.G., Precise measurement of total body water using trace quantities of deuterium oxide, *Biomed. Mass Spectrom.* **4** (1977) 82–87.

HEYMSFIELD, S.B., et al. (Eds), *Human Body Composition*, 2nd edn, Human Kinetics, Champaign, IL (2005).

KOLETZKO, B., SAUERWALD, T., DEMMELMAIR, H., Safety of stable isotope use, *Eur. J. Pediatr.* **156** (Suppl. 1) (1997) S12–S17.

RAMÍREZ, E., et al., Four compartment model and validation of deuterium dilution techniques to estimate fat-free mass in Mexican youth, *Nutrition* **25** (2009) 194–199.

SCHOELLER, D.A., et al., Total body water measurement in humans with ^{18}O and ^2H labeled water, *Am. J. Clin. Nutr.* **33** (1980) 2686–2693.

SCHOELLER, D.A., JONES, P.J.H., “Measurement of total body water by isotope dilution: A unified approach to calculations”, *Vivo Body Composition Studies* (ELLIS, K.J., YASUMURA, S., MORGAN, W.D., Eds), Institute of Physical Sciences in Medicine, London (1987) 131–137.

SNYDER, W.S., et al., *Report of the Task Group on Reference Man*, Pergamon Press, Oxford (1984).

WELLS, J.C.K., STRICKLAND, S.S., Measurement of nutritional status using conventional anthropometry and D_2O in Sarawak, Malaysia, *Eur. J. Clin. Nutr.* **50** (1996) 668–671.

WELLS, J.C., et al., Prediction of total body water in infants and children, *Arch. Dis. Child.* **90** (2005) 965–971.

WESTERTEP, K.R., Body composition, water turnover and energy turnover assessment with labelled water, *Proc. Nutr. Soc.* **58** (1999) 945–951.

PERSONNES AYANT COLLABORÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN

Bluck, L.	Conseil de la recherche médicale, Recherche sur la nutrition humaine (Royaume-Uni)
Davidsson, L.	Agence internationale de l'énergie atomique
Fufa, H.	Institut éthiopien de recherches sanitaires et nutritionnelles (Éthiopie)
Good, S.	Institut fédéral suisse de technologie (Suisse)
Haskell, M.	Université de Californie à Davis (États-Unis d'Amérique)
Hills, A.P.	Université de technologie du Queensland (Australie)
Hunt, J.	Agence internationale de l'énergie atomique
Kurpad, A.V.	Académie nationale St. John des sciences de la santé (Inde)
Kwape, L.	Centre national de recherche sur la technologie alimentaire (Botswana)
Mokhtar, N.	Université Ibn Tofail (Maroc)
Mosetlha, K.	Centre national de recherche sur la technologie alimentaire (Botswana)
Motswagole, S.	Centre national de recherche sur la technologie alimentaire (Botswana)
Preston, T.	Centre de recherche environnementale des universités écossaises (Royaume-Uni)
Schoeller, D.	Département des sciences de la nutrition, Université du Wisconsin, Madison (États-Unis d'Amérique)
Slater, C.*	Consultant privé (Royaume-Uni)
Valencia Juillerat, M.	Université du Sonora (Mexique)

* Adresse actuelle : Division de la santé humaine, Agence internationale de l'énergie atomique, B.P. 100, Centre international de Vienne, 1400 Vienne, Autriche.



IAEA

Agence internationale de l'énergie atomique

N° 23

OÙ COMMANDER ?

Dans les pays suivants, vous pouvez vous procurer les publications de l'AIEA disponibles à la vente chez nos dépositaires ci-dessous ou dans les grandes librairies.

Les publications non destinées à la vente doivent être commandées directement à l'AIEA. Les coordonnées figurent à la fin de la liste ci-dessous.

ALLEMAGNE

Goethe Buchhandlung Teubig GmbH

Schweitzer Fachinformationen

Willstaetterstrasse 15, 40549 Düsseldorf, ALLEMAGNE

Téléphone : +49 (0) 211 49 8740 • Fax : +49 (0) 211 49

Courriel : s.dehaan@schweitzer-online.de • Site web : <http://www.goethebuch.de/>

AUSTRALIE

DA Information Services

648 Whitehorse Road, Mitcham, VIC 3132, AUSTRALIE

Téléphone : +61 3 9210 7777 • Fax : +61 3 9210 7788

Courriel : books@dadirect.com.au • Site web : <http://www.dadirect.com.au>

BELGIQUE

Jean de Lannoy

Avenue du Roi 202, 1190 Bruxelles, BELGIQUE

Téléphone : +32 2 5384 308 • Fax : +32 2 5380 841

Courriel : jean.de.lannoy@euronet.be • Site web : <http://www.jean-de-lannoy.be>

CANADA

Renouf Publishing Co. Ltd.

Téléphone : +1 613 745 2665 • Fax : +1 643 745 7660

5369 Canotek Road, Ottawa, ON K1J 9J3, CANADA

Courriel : order@renoufbooks.com • Site web : <http://www.renoufbooks.com>

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Téléphone : +1 800 865 3457 • Fax : +1 800 865 3450

Courriel : orders@bernan.com • Site web : <http://www.bernan.com>

ESPAGNE

Díaz de Santos, S.A.

Librerías Bookshop • Departamento de pedidos

Calle Albasanz 2, esquina Hermanos Garcia Noblejas 21, 28037 Madrid, ESPAGNE

Téléphone : +34 917 43 48 90

Courriel : compras@diazdesantos.es • Site web : <http://www.diazdesantos.es/>

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Téléphone : +1 800 865 3457 • Fax : +1 800 865 3450

Courriel : orders@bernan.com • Site web : <http://www.bernan.com>

Renouf Publishing Co. Ltd.

812 Proctor Avenue, Ogdensburg, NY 13669, ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Téléphone : +800 551 7470 (numéro vert) • +800 568 8546 (numéro vert)

Courriel : orders@renoufbooks.com • Site web : <http://www.renoufbooks.com>

FINLANDE

Akateeminen Kirjakauppa

PO Box 128 (Keskuskatu 1), 00101 Helsinki, FINLANDE

Téléphone : +358 9 121 41 • Fax : +358 9 121 4450

Courriel : akatilaus@akateeminen.com • Site web : <http://www.akateeminen.com>

FRANCE

Form-Edit

5, rue Janssen, B.P. 25, 75921 Paris CEDEX, FRANCE

Téléphone : +33 1 42 01 49 49 • Fax : +33 1 42 01 90 90

Courriel : fabien.boucard@formedit.fr • Site web : <http://www.formedit.fr>

Lavoisier SAS

14, rue de Provigny, 94236 Cachan CEDEX, FRANCE

Téléphone : +33 1 47 40 67 00 • Fax : +33 1 47 40 67 02

Courriel : livres@lavoisier.fr • Site web : <http://www.lavoisier.fr>

L'Appel du livre

99, rue de Charonne, 75011 Paris, FRANCE

Téléphone : +33 1 43 07 50 80 • Fax : +33 1 43 07 50 80

Courriel : livres@appeldulivre.fr • Site web : <http://www.appeldulivre.fr>

HONGRIE

Librotade Ltd., Book Import

PF 126, 1656 Budapest, HONGRIE

Téléphone : +36 1 257 7777 • Fax : +36 1 257 7472

Courriel : books@librotade.hu • Site web : <http://www.librotade.hu>

INDE

Allied Publishers Pvt. Ltd.

1st Floor, Dubash House, 15 J.N. Heredi Marg

Ballard Estate, Mumbai 400001, INDE

Téléphone : +91 22 42126969/31 • Fax : +91 22 2261 7928

Courriel : arjunsachdev@alliedpublishers.com • Site web : <http://www.alliedpublishers.com>

Bookwell

3/79 Nirankari, Dehli 110009, INDE

Téléphone : +91 11 2760 1283 • +91 11 27604536

Courriel : bkwell@nde.vsnl.net.in • Site web : <http://www.bookwellindia.com/>

ITALIE

Libreria Scientifica "AEIOU"

Via Vincenzo Maria Coronelli 6, 20146 Milan, ITALIE

Téléphone : +39 02 48 95 45 52 • Fax : +39 02 48 95 45 48

Courriel : info@libreriaaeiou.eu • Site web : <http://www.libreriaaeiou.eu/>

JAPON

Maruzen Co., Ltd.

1-9-18 Kaigan, Minato-ku, Tokyo 105-0022, JAPON

Téléphone : +81 3 6367 6047 • Fax : +81 3 6367 6160

Courriel : journal@maruzen.co.jp • Site web : <http://maruzen.co.jp>

PAYS-BAS

Martinus Nijhoff International

Koraalrood 50, Postbus 1853, 2700 CZ Zoetermeer, PAYS-BAS

Téléphone : +31 793 684 400 • Fax : +31 793 615 698

Courriel : info@nijhoff.nl • Site web : <http://www.nijhoff.nl>

Swets

PO Box 26, 2300 AA Leiden

Dellaertweg 9b, 2316 WZ Leiden, PAYS-BAS

Téléphone : +31 88 4679 263 • Fax : +31 88 4679 388

Courriel : tbeysens@nl.swets.com • Site web : www.swets.com

RÉPUBLIQUE TCHÈQUE

Suweco CZ, spol. S.r.o.

Klecakova 347, 180 21 Prague 9, RÉPUBLIQUE TCHÈQUE

Téléphone : +420242 459 202 • Fax : +420 242 459 203

Courriel : nakup@suweco.cz • Site web : <http://www.suweco.cz>

ROYAUME-UNI

The Stationery Office Ltd. (TSO)

PO Box 29, Norwich, Norfolk, NR3 1PD, ROYAUME-UNI

Téléphone : +44 870 600 5552

Courriel (commandes) : books.orders@tso.co.uk • (renseignements) : book.enquiries@tso.co.uk •

Site web : <http://www.tso.co.uk>

Commandes en ligne :

DELTA International Ltd.

39, Alexandra Road, Addlestone, Surrey, KT15 2PQ, ROYAUME-UNI

Courriel : info@profbooks.com • Site web : <http://www.profbooks.com>

SLOVÉNIE

Cankarjeva Založba dd

Kopitarjeva 2, 1515 Ljubljana, SLOVÉNIE

Téléphone : +386 1 432 31 44 • Fax : +386 1 230 14 35

Courriel : import.books@cankarjeva-z.si • Site web : http://www.mladinska.com/cankarjeva_zalozba

NATIONS UNIES (ONU)

300 East 42nd Street, IN-919J, New York, NY 1001, ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Téléphone : +1 212 963 8302 • Fax : +1 212 963 3489

Courriel : publications@un.org • Site web : <http://www.unp.un.org>

Les commandes de publications destinées ou non à la vente peuvent être adressées directement à :

Section d'édition de l'AIEA, Unité de la promotion et de la vente,

Agence internationale de l'énergie atomique,

Centre international de Vienne, B.P. 100, 1400 Vienne (Autriche)

Téléphone : +43 1 2600 22529 (ou 22488) • Fax : +43 1 2600 29302

Courriel : sales.publications@iaea.org • Site web : <http://www.iaea.org/books>

Au cours de ces dernières années, un accès croissant à l'analyse de l'enrichissement en deutérium par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) s'est traduit par une utilisation accrue de cette technique en Afrique, en Amérique latine et en Asie. La présente publication vise à fournir des indications pratiques sur l'application de cette technique lorsque l'analyse de l'enrichissement en deutérium d'échantillons de salive doit être effectuée par spectroscopie IRTF. Elle intéresse spécifiquement les nouveaux utilisateurs de cette méthode, par exemple des nutritionnistes, des chimistes analystes ou d'autres professionnels de santé.

COLLECTION SANTÉ HUMAINE DE L'AIEA

AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE
VIENNE

ISBN 978-92-0-214513-9
ISSN 2075-3772