



# COLLECTION SANTÉ HUMAINE DE L'IAEA

N° 7

Technique faisant appel  
à un isotope stable pour  
évaluer la consommation  
de lait maternel chez les  
bébés nourris au sein



**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 Secrétaire 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](mailto:Official.Mail@iaea.org)

TECHNIQUE FAISANT APPEL  
À UN ISOTOPE STABLE POUR ÉVALUER  
LA CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL  
CHEZ LES BÉBÉS NOURRIS AU SEIN

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

AFGHANISTAN	GHANA	PALAOS
AFRIQUE DU SUD	GRÈCE	PANAMA
ALBANIE	GUATEMALA	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE
ALGÉRIE	HAÏTI	PARAGUAY
ALLEMAGNE	HONDURAS	PAYS-BAS
ANGOLA	HONGRIE	PÉROU
ARABIE SAOUDITE	ÎLES MARSHALL	PHILIPPINES
ARGENTINE	INDE	POLOGNE
ARMÉNIE	INDONÉSIE	PORTUGAL
AUSTRALIE	IRAN, RÉP. ISLAMIQUE D'	QATAR
AUTRICHE	IRAQ	RÉPUBLIQUE ARABE
AZERBAÏDJAN	IRLANDE	SYRIENNE
BAHAMAS	ISLANDE	RÉPUBLIQUE
BAHREÏN	ISRAËL	CENTRAFRICAINE
BANGLADESH	ITALIE	RÉPUBLIQUE DE MOLDOVA
BÉLARUS	JAMAÏQUE	RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE
BELGIQUE	JAPON	DU CONGO
BELIZE	JORDANIE	RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE
BÉNIN	KAZAKHSTAN	POPULAIRE LAO
BOLIVIE	KENYA	RÉPUBLIQUE DOMINICAINE
BOSNIE-HERZÉGOVINE	KIRGHIZISTAN	RÉPUBLIQUE TCHÈQUE
BOTSWANA	KOWEÏT	RÉPUBLIQUE-UNIE DE
BRÉSIL	LESOTHO	TANZANIE
BRUNÉI DARUSSALAM	LETONNIE	ROUMANIE
BULGARIE	L'EX-RÉPUBLIQUE YOUNG-	ROYAUME-UNI
BURKINA FASO	SLAVE DE MACÉDOINE	DE GRANDE-BRETAGNE
BURUNDI	LIBAN	ET D'IRLANDE DU NORD
CAMBODGE	LIBÉRIA	RWANDA
CAMEROUN	LIBYE	SAINT-MARIN
CANADA	LIECHTENSTEIN	SAINT-SIÈGE
CHILI	LITUANIE	SÉNÉGAL
CHINE	LUXEMBOURG	SERBIE
CHYPRE	MADAGASCAR	SEYCHELLES
COLOMBIE	MALAISIE	SIERRA LEONE
CONGO	MALAWI	SINGAPOUR
CORÉE, RÉPUBLIQUE DE	MALI	SLOVAQUIE
COSTA RICA	MALTE	SLOVÉNIE
CÔTE D'IVOIRE	MAROC	SOUDAN
CROATIE	MAURICE	SRI LANKA
CUBA	MAURITANIE,	SUÈDE
DANEMARK	RÉP. ISLAMIQUE DE	SUISSE
DOMINIQUE	MEXIQUE	SWAZILAND
ÉGYPTE	MONACO	TADJIKISTAN
EL SALVADOR	MONGOLIE	TCHAD
ÉMIRATS ARABES UNIS	MONTÉNÉGRO	THAÏLANDE
ÉQUATEUR	MOZAMBIQUE	TOGO
ÉRYTHRÉE	MYANMAR	TRINITÉ-ET-TOBAGO
ESPAGNE	NAMIBIE	TUNISIE
ESTONIE	NÉPAL	TURQUIE
ÉTATS-UNIS	NICARAGUA	UKRAINE
D'AMÉRIQUE	NIGER	URUGUAY
ÉTHIOPIE	NIGERIA	VENEZUELA,
FÉDÉRATION DE RUSSIE	NORVÈGE	RÉP. BOLIVARIENNE DU
FIDJI	NOUVELLE-ZÉLANDE	VIET NAM
FINLANDE	OMAN	YÉMEN
FRANCE	OUGANDA	ZAMBIE
GABON	OUZBÉKISTAN	ZIMBABWE
GÉORGIE	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 SANTÉ HUMAINE DE L'AIEA N° 7

TECHNIQUE FAISANT APPEL  
À UN ISOTOPE STABLE POUR  
ÉVALUER LA CONSOMMATION  
DE LAIT MATERNEL  
CHEZ LES BÉBÉS NOURRIS AU SEIN

AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE  
VIENNE, 2014

## **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, 2014

Imprimé par l'AIEA en Autriche  
Juillet 2014  
STI/PUB/1429

TECHNIQUE FAISANT APPEL  
À UN ISOTOPE STABLE POUR ÉVALUER  
LA CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL  
CHEZ LES BÉBÉS NOURRIS AU SEIN

STI/PUB/1429  
ISBN 978-92-0-207914-4  
ISSN 2075-3772

## AVANT-PROPOS

Un allaitement maternel exclusif pendant six mois, suivi par l'introduction d'aliments complémentaires appropriés tout en poursuivant l'allaitement, comme le recommande l'Organisation mondiale de la Santé, constitue l'un des piliers de la nutrition infantile. On ne dispose toutefois que de peu d'informations sur les quantités de lait maternel consommées et sur le moment où d'autres aliments sont introduits dans le régime des nourrissons. Ce manque d'informations est au moins en partie dû au fait qu'il est difficile d'évaluer la consommation de lait maternel. La technique classique utilisée consiste à peser le nourrisson avant et après chaque tétée, c'est ce que l'on appelle une pesée différentielle. Néanmoins, cette méthode prend du temps et peut perturber l'allaitement.

Ces problèmes pratiques peuvent être surmontés par une méthode faisant appel à un isotope stable (c'est-à-dire non radioactif), la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère. Cette méthode ne modifie pas les caractéristiques de l'allaitement et permet d'évaluer le volume total de lait maternel consommé par le nourrisson pendant deux semaines. De plus, elle est non invasive, car la dose d'eau deutérée est absorbée par la mère par voie orale, puis des échantillons de salive sont prélevés à des fins d'analyse.

Cette méthode simple et élégante a été mise au point au Royaume-Uni par le regretté A. Coward au début des années 80. La présente publication, première du genre, s'appuie pour une large part sur ses travaux précurseurs. L'AIEA promeut une utilisation plus large de cette technique dans les États Membres en appuyant des projets nationaux ou régionaux de nutrition par l'intermédiaire de son programme de coopération technique, notamment en Afrique, et de projets de recherche coordonnée qui s'attaquent à des sujets prioritaires en nutrition infantile, par exemple le récent projet sur les apports en zinc au cours des premières années de la vie.

La présente publication a été réalisée par un groupe international d'experts et fait partie intégrante des efforts engagés par l'AIEA pour favoriser les transferts de technologie et de connaissances dans ce domaine au bénéfice des nutritionnistes, des chimistes analystes et d'autres professionnels. Elle donne des informations sur le cadre théorique et l'application pratique des techniques les plus modernes qui permettent d'évaluer la consommation de lait maternel chez les bébés nourris au sein par une méthode faisant appel à un isotope stable en déterminant la concentration en deutérium par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

L'AIEA remercie les personnes qui ont le plus contribué à l'élaboration de la présente publication (L. Bluck et C. Slater, Royaume-Uni) en partageant leurs compétences techniques et leur longue expérience dans le domaine des techniques qui font appel à des isotopes stables en nutrition. Les photographies ont été prises lors de formations organisées récemment en Afrique afin d'illustrer l'utilisation de la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère. Il

convient toutefois de noter que cette méthode offre la possibilité d'étudier des questions prioritaires en nutrition infantile partout dans le monde. 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.*



## TABLE DES MATIÈRES

1.	INTRODUCTION.....	1
1.1.	Généralités.....	1
1.2.	Objet.....	3
1.3.	Contenu.....	3
1.4.	Structure.....	3
2.	TECHNIQUE DE LA DOSE D'EAU DEUTÉRÉE ADMINISTRÉE À LA MÈRE AFIN D'ÉVALUER LA CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL.....	4
2.1.	Modèle des flux d'eau à deux compartiments chez le couple mère-bébé.....	4
2.1.1.	Introduction.....	4
2.1.2.	Ajustement de courbes et calculs.....	5
2.1.3.	Exemples de résultats.....	6
2.1.4.	Estimation de la composition corporelle de la mère....	7
2.2.	Planification de l'étude.....	8
2.2.1.	Éthique.....	8
2.2.2.	Étude pilote.....	9
2.3.	Calcul de la taille de l'échantillon.....	10
3.	PROCÉDURE D'ÉVALUATION DE LA CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL.....	11
3.1.	Préparation et stockage des doses.....	11
3.2.	Mesure du poids et de la taille.....	14
3.2.1.	Mesure du poids de la mère.....	15
3.2.2.	Mesure de la taille de la mère.....	15
3.2.3.	Mesure du poids et de la taille du bébé.....	16
3.3.	Administration de la dose.....	19
3.4.	Prélèvement d'échantillons de salive.....	20
3.4.1.	Préparation d'un prélèvement.....	20
3.4.2.	Procédure point par point pour le prélèvement d'un échantillon de salive : la mère.....	22
3.4.3.	Procédure point par point pour le prélèvement d'un échantillon de salive : le bébé.....	24
3.4.4.	Conservation des échantillons de salive.....	25
3.5.	Données à saisir.....	26

4.	MESURE DE L'ENRICHISSEMENT EN DEUTÉRIUM PAR SPECTROSCOPIE IRTF . . . . .	27
4.1.	Le laboratoire d'IRTF . . . . .	27
4.2.	Nettoyage du spectromètre IRTF . . . . .	28
4.3.	Préparation de l'étalon . . . . .	28
4.3.1.	Durée de conservation des étalons . . . . .	30
4.4.	Construction d'une courbe étalon. . . . .	30
4.5.	Utilisation du spectromètre IRTF . . . . .	33
4.5.1.	Spectres IRTF classique . . . . .	34
4.6.	Cellule du spectromètre . . . . .	35
4.6.1.	Entretien des cellules . . . . .	36
4.7.	Remplissage d'une cellule de spectromètre IRTF . . . . .	36
4.7.1.	Introduction. . . . .	36
4.7.2.	Méthode recommandée pour remplir une cellule de spectromètre IRTF . . . . .	37
5.	OPÉRATIONS ESSENTIELLES À EFFECTUER POUR QUE LES DONNÉES OBTENUES SOIENT DE BONNE QUALITÉ . . . . .	38
5.1.	Préparation des doses . . . . .	38
5.2.	Sur le terrain . . . . .	38
5.3.	Au laboratoire . . . . .	38
6.	LISTE DE MATÉRIEL . . . . .	40
6.1.	Au laboratoire . . . . .	40
6.2.	Sur le terrain . . . . .	41
	APPENDICE I : MODÈLE DES FLUX D'EAU À DEUX COMPARTIMENTS CHEZ LE COUPLE MÈRE-BÉBÉ . . . . .	42
	APPENDICE II : INFORMATIONS GÉNÉRALES CONCERNANT LA SÛRETÉ DE L'EAU DEUTÉRÉE . . . . .	51
	APPENDICE III : FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE . . . . .	54
	APPENDICE IV : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER . . . . .	57
	GLOSSAIRE . . . . .	65
	RÉFÉRENCES . . . . .	69
	PERSONNES AYANT CONTRIBUÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN . . . . .	71

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. GÉNÉRALITÉS

La pertinence du mode d'alimentation joue un rôle important pour que la croissance, le développement et la santé soient optimaux au cours des premières années de la vie. L'Organisation mondiale de la Santé recommande un allaitement exclusif pendant les six premiers mois, suivi par l'introduction d'aliments complémentaires appropriés tout en poursuivant l'allaitement jusqu'à l'âge de 2 ans ou plus [1-3]. L'expression allaitement exclusif implique que le nourrisson tète le lait maternel et ne consomme aucun autre aliment ou boisson, pas même de l'eau. Dans de nombreux pays, même si l'allaitement est répandu, seule une petite proportion des bébés est nourrie exclusivement au sein et il existe peu d'informations sur les quantités de lait maternel consommées et sur le moment où d'autres aliments sont introduits dans le régime des nourrissons. Ce manque d'informations est au moins en partie dû au fait qu'il est difficile de déterminer la consommation de lait maternel.

Pour mesurer la consommation de lait, la technique classique consiste à peser le nourrisson avant et après chaque tétée, c'est ce que l'on appelle une pesée différentielle. Cette méthode prend du temps et peut perturber l'allaitement [4]. Dans de nombreux contextes, les bébés sont allaités fréquemment et à la demande, y compris la nuit, ce qui limite le recours à cette technique pour des raisons pratiques. Ces problèmes peuvent être surmontés par une méthode faisant appel à un isotope stable. La quantité de lait maternel consommée par le nourrisson pendant deux semaines peut être évaluée à l'aide de la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère (fig. 1), technique qui consiste à faire boire à la mère de l'eau marquée au deutérium et à suivre la disparition du deutérium chez la mère et son apparition chez son bébé (fig. 2). Cette méthode permet également d'estimer la quantité d'eau consommée par le nourrisson qui provient d'autres sources que le lait maternel et la composition corporelle de la mère [5-7]. Elle peut par exemple être utilisée pour évaluer l'efficacité des programmes de conseil et de sensibilisation sur le mode d'alimentation des nourrissons [8, 9], étudier la relation entre la consommation de lait maternel par un bébé et la composition corporelle de sa mère [10], apprécier les effets des programmes de nutrition communautaires destinés aux femmes allaitantes [11], évaluer l'impact de l'introduction d'aliments complémentaires sur la consommation de lait maternel chez les bébés nourris au sein [12] ou quantifier les flux de nutriments ou les transferts d'éléments toxiques de la mère au nourrisson [13, 14].



1. La mère boit du  $^2\text{H}_2\text{O}$

2. Le bébé consomme le  $^2\text{H}_2\text{O}$  contenu dans le lait maternel

3. La salive de la mère et de son bébé est enrichie en  $^2\text{H}_2\text{O}$

FIG. 1. Technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère afin d'évaluer la consommation de lait maternel.

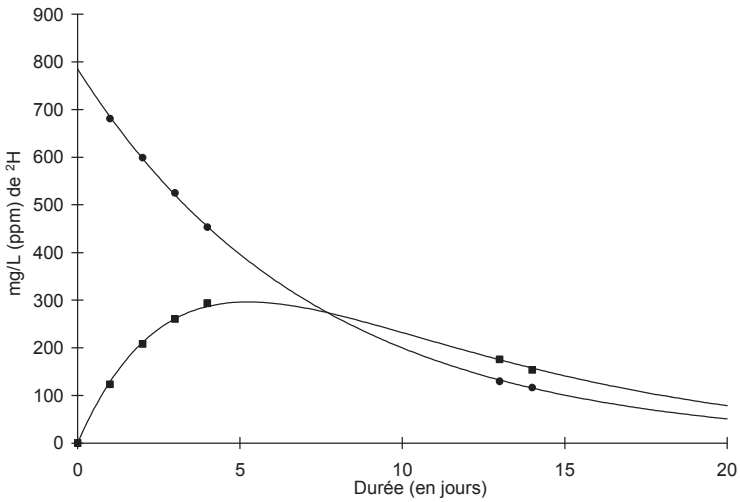


FIG. 2. Disparition du deutérium de l'eau corporelle de la mère (●) et apparition de deutérium dans celle de son bébé (■).

Le deutérium est un isotope stable (non radioactif) de l'hydrogène et son symbole est  $^2\text{H}$ . 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 métabolisée par le corps de

la même manière que l'eau normale et se mélange à l'eau corporelle au bout de quelques heures. Cette dernière 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) ou par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). La spectroscopie IRTF n'est pas adaptée à l'analyse de prélèvements d'urines ou de lait maternel. Elle n'est pas aussi sensible que la SMI et nécessite donc une dose d'eau deutérée plus importante. 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 lorsque les moyens sont limités.

## 1.2. OBJET

La présente publication est un guide pratique sur l'évaluation de la consommation de lait maternel chez les bébés nourris au sein à l'aide de la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère. Elle s'adresse à des nutritionnistes, à des chimistes analystes et à d'autres professionnels qui peuvent n'avoir aucune expérience des méthodes faisant appel à des isotopes stables.

## 1.3. CONTENU

Le présent manuel décrit une méthode quantitative d'évaluation de la consommation de lait maternel et de la consommation de liquides provenant d'autres sources que le lait maternel chez les bébés nourris au sein. Il présente également la technique de mesure de l'enrichissement des échantillons de salive en deutérium par spectroscopie IRTF.

## 1.4. STRUCTURE

À la suite de la présente introduction, la section 2 donne des informations générales sur la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère, technique utilisée pour évaluer la consommation de lait maternel chez les bébés nourris au sein. La section 3 décrit en détail la procédure : relevés anthropométriques sur la mère et son bébé, préparation des doses d'eau deutérée, consommation de la dose par la mère et prélèvement d'échantillons de salives chez la mère et le nourrisson. La section 4 présente la mesure de l'enrichissement en deutérium par spectroscopie IRTF. La section 5 indique

les précautions à prendre pour que les données soient de bonne qualité, tandis que la section 6 donne une liste du matériel nécessaire au laboratoire et sur le terrain. Enfin quatre appendices décrivent le modèle mathématique utilisé pour calculer la consommation de lait maternel et la consommation d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel chez le nourrisson, donnent des informations générales sur la sûreté de l'eau deutérée, présentent le fractionnement isotopique et expliquent la spectroscopie IRTF.

## 2. TECHNIQUE DE LA DOSE D'EAU DEUTÉRÉE ADMINISTRÉE À LA MÈRE AFIN D'ÉVALUER LA CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL

### 2.1. MODÈLE DES FLUX D'EAU À DEUX COMPARTIMENTS CHEZ LE COUPLE MÈRE-BÉBÉ

#### 2.1.1. Introduction

La technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère a été décrite pour la première fois par A. Coward et ses collègues en 1982 [5]. L'évaluation de la consommation de lait maternel et d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel repose sur un modèle à deux compartiments (fig. 3). Pour plus d'informations, se reporter à l'appendice I.

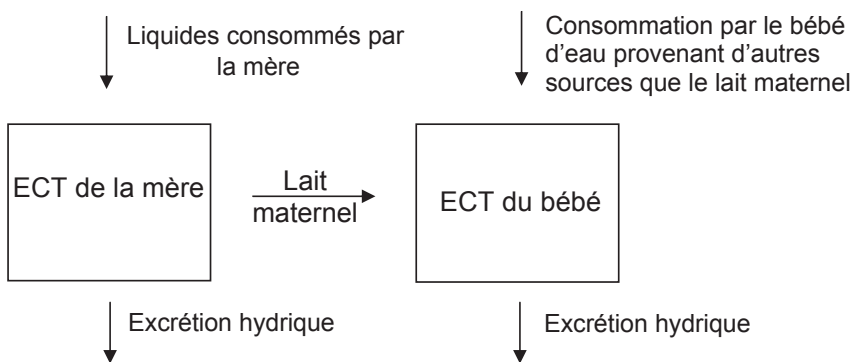


FIG. 3. Modèle des flux d'eau à deux compartiments chez le couple mère-bébé.

Dans le modèle à deux compartiments, le premier compartiment est l'eau corporelle totale (ECT) de la mère et le deuxième l'ECT du bébé. Ces deux compartiments sont reliés par le flux de lait maternel qui va de la mère au nourrisson. À l'équilibre, le volume d'eau qui arrive est égal au volume d'eau qui sort et la quantité d'eau présente dans chaque compartiment ne varie pas. Pour la durée de l'étude, c'est une bonne approximation pour la mère. En revanche, le volume d'ECT du bébé évolue au fur et à mesure que celui-ci grandit.

### 2.1.2. Ajustement de courbes et calculs

La consommation de lait maternel et d'eau provenant d'autres sources peut être évaluée en ajustant les courbes de l'enrichissement en deutérium à un modèle de vitesse de renouvellement de l'eau chez la mère et son bébé. La consommation de lait maternel par le nourrisson est calculée à partir du flux d'eau qui va de la mère au bébé. Au total, l'eau consommée par le nourrisson comprend l'eau issue de l'oxydation des protéines, des lipides et des glucides contenus dans le lait maternel, ainsi que celle qui provient d'autres sources que le lait maternel. Il convient de tenir compte de la croissance du bébé durant les deux semaines que dure l'étude. Pour plus d'informations, se reporter à l'appendice I.

La figure 4 représente le logarithme népérien ( $\ln$ ) de l'enrichissement en deutérium de l'eau corporelle d'une mère et de son bébé en fonction du moment où la dose d'eau deutérée a été consommée par la mère.

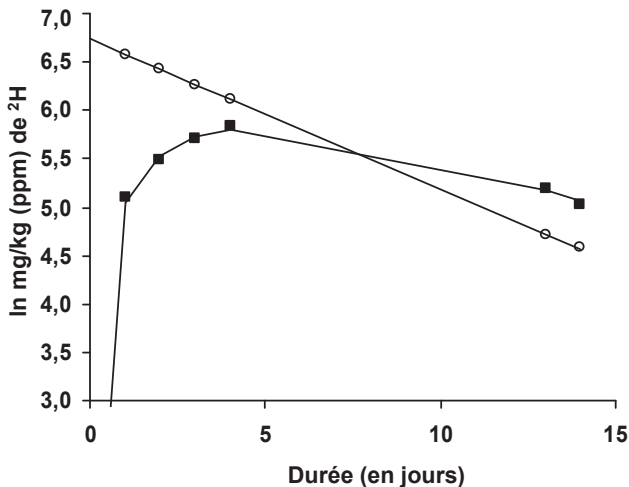


FIG. 4. Enrichissement en deutérium de l'eau corporelle chez la mère et son bébé Les symboles ( $\circ$  mère,  $\blacksquare$  bébé) représentent l'enrichissement en deutérium mesuré.

Les courbes sont ajustées à ces valeurs à l'aide de l'outil « Solveur » intégré à Microsoft Excel. Solveur applique une régression non linéaire afin de déterminer les valeurs des constantes qui permettent le mieux d'ajuster une courbe aux données. Chez la mère (○), l'élimination du deutérium s'effectue de manière linéaire sur le graphique. L'ECT de la mère et donc sa composition corporelle peuvent être estimées par rétroextrapolation à partir de l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées (voir la section 2.1.4).

Une erreur est associée à l'estimation de la consommation d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel par le bébé en raison des hypothèses utilisées dans le modèle. Cette erreur ( $25 \pm 62$  g/jour) se traduit par une petite consommation apparente d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel chez des nourrissons qui sont en réalité exclusivement nourris au sein [9].

### 2.1.3. Exemples de résultats

La figure 5 présente les résultats correspondant à deux couples mère-bébé différents :

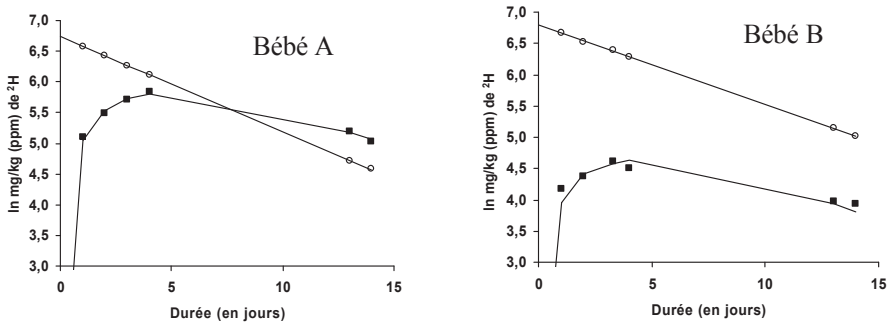


FIG. 5. Enrichissement en  $^2\text{H}$  de l'eau corporelle (salive) prélevée chez la mère (○) et son bébé (■).

- L'enrichissement en  $^2\text{H}$  de la salive du nourrisson est nettement plus élevé pour le bébé de gauche (bébé A) que pour le bébé de droite (bébé B) ;
- Le bébé A a consommé 950 g de lait maternel par jour et moins de 25 g d'eau provenant d'autres sources par jour ;
- Le bébé B a consommé 230 g de lait maternel par jour et 773 g d'eau provenant d'autres sources par jour.



### 2.1.4. Estimation de la composition corporelle de la mère

La composition corporelle de la mère est estimée à partir de son ECT, laquelle est mesurée par dilution de deutérium. Le calcul suppose que le corps est constitué d'une masse grasse et d'une masse maigre. La masse grasse représente la différence entre le poids corporel et la masse maigre et peut être estimée à partir de l'ECT comme suit.

Le volume d'ECT est légèrement inférieur au volume de distribution de la dose de deutérium, car une partie du deutérium est emprisonnée dans des substances non aqueuses (principalement des protéines) par un mécanisme appelé échange non aqueux.

$V_D$  est le volume de distribution du deutérium.

Lorsque l'on représente le logarithme népérien de l'enrichissement en deutérium de l'eau corporelle de la mère en fonction du temps, on obtient une droite.  $V_D$  est calculé à partir de l'intersection entre la droite de régression obtenue à partir des données et l'axe des ordonnées (fig. 6).

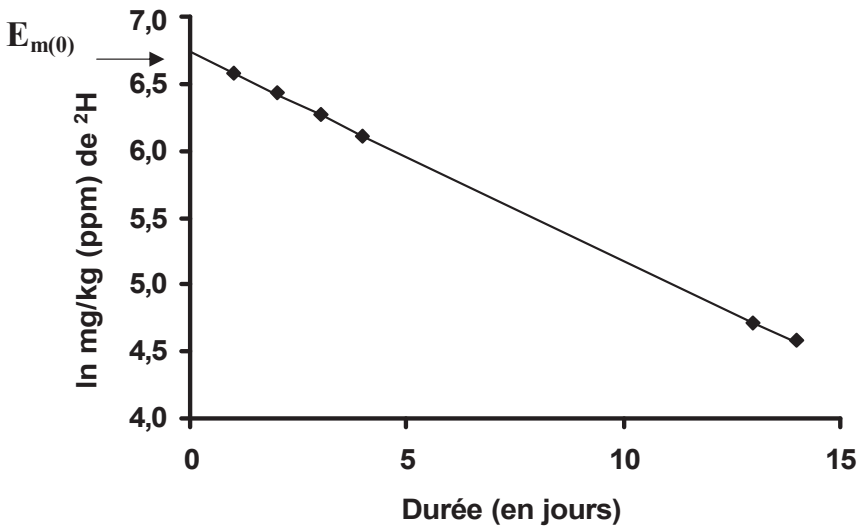


FIG. 6. Élimination du deutérium chez la mère.

L'ordonnée du point d'intersection de la droite de régression avec l'axe des ordonnées est notée  $E_{m(0)}$  (enrichissement en <sup>2</sup>H de l'eau corporelle de la mère à l'instant zéro) :

$$V_D \text{ (en kg)} = \text{dose d'eau deutérée (en mg)} \div (E_{m(0)})$$

$V_D$  doit être corrigé des échanges isotopiques non aqueux. Pour le deutérium, on suppose que ces échanges représentent 4,1 % du volume de distribution. L'ECT est donc obtenue en divisant  $V_D$  par 1,041 :

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

De manière remarquable, l'hydratation de la masse maigre dans le corps varie très peu en fonction des espèces, mais est plus élevée chez les petits que chez les adultes. Ici, seule la mère nous intéresse. On suppose que la masse maigre est constituée à 73,2 % d'eau chez l'adulte. C'est ce que l'on appelle l'hydratation de la masse maigre (MM). De ce fait :

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

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

$$\begin{aligned} \text{MG (en kg)} &= \text{poids corporel (en kg)} - \text{MM (en kg)} \\ \% \text{ de la MG} &= \text{MG (en kg)} \div \text{poids corporel (en kg)} \times 100 \end{aligned}$$

## 2.2. PLANIFICATION DE L'ÉTUDE

Si l'on veut aboutir à un résultat satisfaisant, une étude doit être planifiée avec soin. Lorsque l'on engage une étude, la phase la plus importante est celle où l'on détermine son objectif. Il convient de se concentrer sur une seule grande question et de se demander quelle est l'hypothèse qui est examinée :

- Combien de couples mère-bébé sont-ils nécessaires pour traiter cette question ? Il convient de calculer la taille de l'échantillon requis (voir la section 2.3) et de demander conseil à un biostatisticien.
- Comment les données seront-elles gérées ? Quels seront les tests statistiques effectués ? Il convient de 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 ?

### 2.2.1. Éthique

Toutes les études auxquelles participent des êtres humains doivent être examinées et approuvées par le comité local d'éthique. Celui-ci 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 d'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 ;
- Date de début envisagée ;
- Date de fin envisagée.

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

### **2.2.2. Étude pilote**

Si la technique décrite dans la présente publication n'a jamais été utilisée auparavant, il est recommandé de réaliser une étude pilote avant d'engager l'étude principale.

L'étude pilote 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 couples mère-bébé est généralement assez faible.

### 2.3. 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. Le calcul de la taille de l'échantillon représente une part importante de la planification d'une étude et est exigé 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 un résultat fiable.

#### *Exemple*

Pour calculer la taille d'échantillon requise pour une étude de la consommation de lait maternel chez des bébés nourris au sein, il faut connaître l'écart type de la consommation quotidienne de lait maternel chez ces mêmes bébés et fixer la différence entre des groupes de l'étude qui sera considérée comme significative. Ainsi, une différence de 100 grammes de consommation de lait maternel par jour pourrait être considérée comme la limite permettant de distinguer les bébés nourris essentiellement au sein de ceux qui sont partiellement nourris au sein [7].

Si l'on ne dispose d'aucune information particulière, il convient de fixer l'écart type ( $\sigma$ ) à 130 g/jour pour la consommation de lait maternel et la différence ( $\delta$ ) de consommation de lait maternel entre les groupes à 100 grammes. Pour une puissance de 80 %, un seuil de signification de 0,05 et une répartition des participants à l'étude en deux groupes, 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 :

$$n = 2 \times 7,85 \times \left( \frac{130}{100} \right)^2 = 27$$

Il faut au moins 27 couples mère-bébé 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 judicieux d'appliquer un coefficient à ce nombre pour tenir compte des abandons en fonction de l'expérience locale. Dans l'exemple présenté ci-dessus, il faut au moins 30 couples mère-bébé dans chaque groupe si l'on suppose que le taux d'abandon s'élève à 10 %, mais celui-ci peut être beaucoup plus élevé pour certains types d'études.

### **3. PROCÉDURE D'ÉVALUATION DE LA CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL**

La figure 7 récapitule les différentes étapes d'une évaluation de la consommation de lait maternel. Les sections qui suivent décrivent en détail la procédure associée à cette évaluation.

#### **3.1. PRÉPARATION ET STOCKAGE DES DOSES**

Tout le matériel qui est utilisé pour préparer les doses doit être parfaitement sec afin d'éviter toute contamination par de l'eau. La dose normalisée d'eau deutérée nécessaire à l'évaluation de la consommation de lait maternel en mesurant la concentration de deutérium par spectroscopie ITRF est de 30 grammes (teneur isotopique de 99,8 % en  $^2\text{H}$ ) pour toutes les mères quel que soit leur poids.

Tous les flacons qui contiennent les doses doivent être munis d'un bouchon à vis et être étanches (il peut s'agir par exemple 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. Les doses peuvent être préparées par lots et conservées au réfrigérateur jusqu'à ce que l'on en ait besoin. Chaque flacon doit comporter une étiquette qui précise le numéro de dose et la date à laquelle la dose a été préparée. Cette préparation doit être effectuée dans des cuisines et non dans un laboratoire de chimie. Dans un cahier de laboratoire, indiquer le numéro de lot de la solution mère d'eau deutérée utilisée pour préparer les doses, la date à laquelle cette préparation a été faite, le numéro de dose, le poids du flacon, le poids de

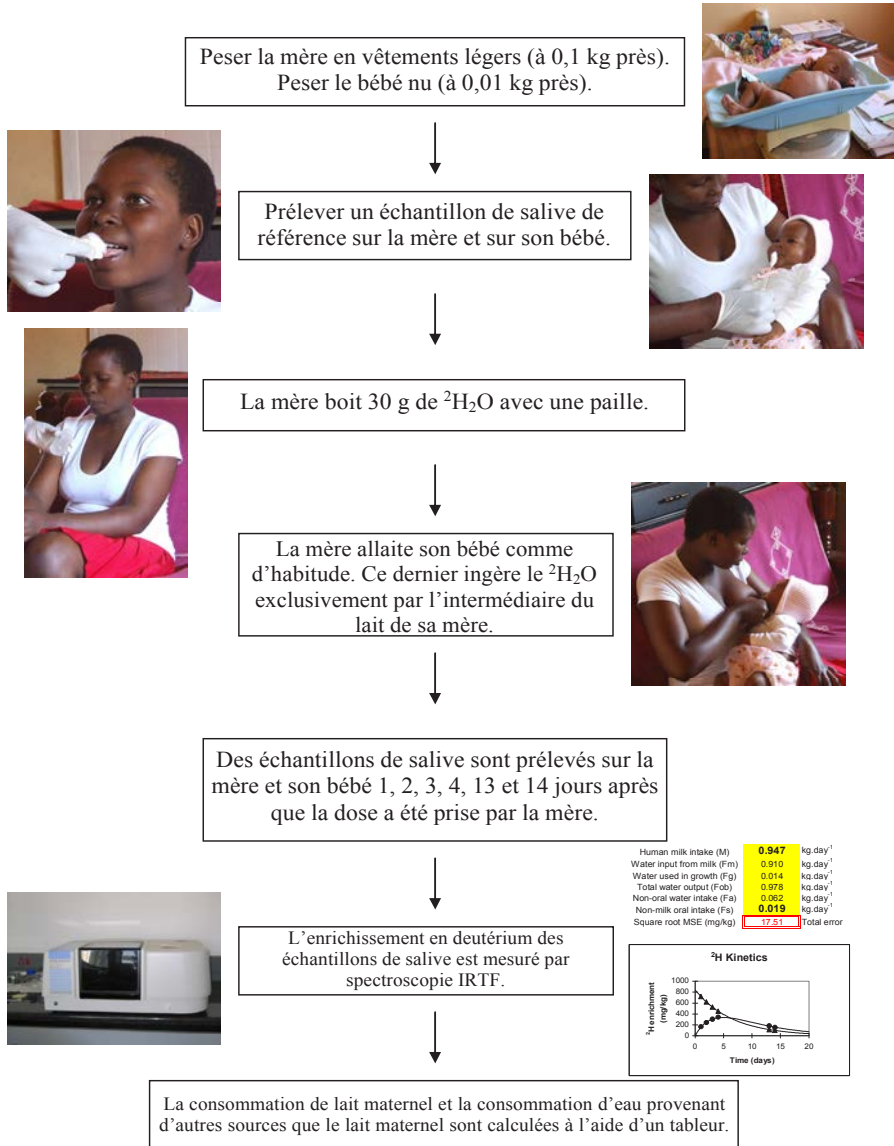


FIG. 7. Synthèse de la procédure d'évaluation de la consommation de lait maternel par la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère.

l'ensemble flacon plus dose et le poids de la dose. Ces informations peuvent être ultérieurement reportées sur un tableau.

Le protocole de préparation des doses, illustré par la figure 8, est le suivant :



FIG. 8. Préparation d'une dose. Cette opération doit être effectuée dans des cuisines et non en laboratoire.

- Peser ensemble le flacon étiqueté et son bouchon et noter le poids obtenu.
- Verser 30 ml de  $^2\text{H}_2\text{O}$  dans le flacon à l'aide d'une éprouvette graduée et refermer le bouchon.
- Peser à nouveau le flacon.
- Noter le poids exact d'eau deutérée contenue dans chaque dose.
- Le poids de  $^2\text{H}_2\text{O}$  ne sera pas exactement de 30 g, car la densité de ce composé est plus élevée que celle de l'eau (à 25 °C, densité du  $^2\text{H}_2\text{O}$  = 1,105 g/ml et densité du  $\text{H}_2\text{O}$  = 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 est possible de se servir de la même éprouvette graduée pour toutes les doses préparées au même moment à condition qu'elle ne soit utilisée que

pour de l'eau deutérée hautement enrichie. Elle ne doit pas être lavée entre deux doses, car elle serait alors contaminée par de l'eau, ce qui entraînerait une erreur sur la quantité de  $^2\text{H}_2\text{O}$  administrée à la mère.

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 à teneur isotopique en  $^2\text{H}$  de 99,8 % afin de préparer un étalon qui servira à l'analyse des échantillons de salive (voir la section 4.3).

Pour des questions d'hygiène et afin d'éviter les contaminations croisées, les doses ne devraient pas être stockées au même endroit que les échantillons de salive. L'enrichissement des échantillons en  $^2\text{H}$  peut atteindre 1 000 mg/kg [parties par million (ppm)] alors que, dans les doses, la teneur isotopique en  $^2\text{H}$  s'élève au moins à 99,8 %, soit un enrichissement de 998 000 mg/kg. 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 différents pour les doses et les échantillons de salive.

### 3.2. MESURE DU POIDS ET DE LA TAILLE

Pour pouvoir effectuer une estimation de la composition corporelle des mères, il faut mesurer leur poids de manière précise, car cette estimation repose sur la mesure de l'ECT. Il convient de demander aux mères 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. La mère doit être pesée au départ et à nouveau le quatorzième jour afin de s'assurer que son poids n'a pas substantiellement varié. Pour évaluer la consommation de lait maternel, il n'est pas nécessaire de déterminer la taille de la mère, mais la plupart des études de nutrition prévoient des mesures anthropométriques de base sur la mère et son bébé. L'indice de masse corporelle (IMC) de la mère est calculé à partir de son poids (en kg) et de sa taille (en cm) :

$$\text{IMC (en kg/m}^2\text{)} = \text{poids (en kg)} \div (\text{taille (en cm)} \div 100)^2$$



### 3.2.1. Mesure du poids de la mère

Le poids de la mère doit être mesuré à 0,1 kg près à l'aide d'une balance électronique ou de toute balance dont la précision est suffisante (fig. 9).



FIG. 9. Pesée. Cette mesure est effectuée en vêtements légers et sans chaussures.

Cette mesure s'effectue comme suit :

- La balance doit être posée sur une surface plane dont la planéité doit être contrôlée à l'aide d'un niveau à bulle.
- La mère doit porter des vêtements légers et retirer ses chaussures. Si elle ne souhaite pas porter des vêtements légers durant la pesée, sa tenue doit être ensuite pesée séparément et son poids déduit afin d'obtenir une mesure précise du poids corporel.
- Sur la fiche de données de la mère, noter le poids mesuré à 0,1 kg près.
- L'exactitude de la balance doit être vérifiée quotidiennement à l'aide d'un poids étalon dont la masse est connue.

### 3.2.2. Mesure de la taille de la mère

La taille de la mère doit être mesurée à 0,1 cm près à l'aide d'une toise.  
Cette mesure s'effectue comme suit :

- La toise doit être posée sur une surface plane dont la planéité doit être contrôlée à l'aide d'un niveau à bulle. L'exactitude de la toise doit être vérifiée périodiquement en utilisant des pignes.
- La taille est mesurée sans chaussures.
- La mère doit se tenir droite, les talons contre le mur ou contre la tige de la toise. Ses genoux doivent être droits.
- Demander à la mère de regarder droit devant elle. Il convient de s'assurer que ses yeux sont au même niveau que ses oreilles (fig. 8).



FIG. 10. Mesure de la taille : cheveux retombés, regard tourné vers l'avant.

- Abaisser le curseur jusqu'à ce qu'il touche le sommet du crâne. Les coiffures élaborées doivent être défaites. Sur la fiche de données de la mère, noter la taille (en cm à 0,1 cm près). Cette mesure doit être effectuée deux fois et les deux valeurs obtenues doivent être consignées et leur moyenne calculée.

### 3.2.3. Mesure du poids et de la taille du bébé

Il est nécessaire de mesurer le poids (P) du bébé avec exactitude afin de pouvoir estimer le volume de distribution du deutérium dans l'organisme du bébé ( $V_b$ ) [15] :

$$V_b = 0,84 \times P^{0,82}$$

Le bébé doit être pesé au départ et à J14.

L'Organisation mondiale de la Santé 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>.

### 3.2.3.1. Pesée du bébé

Le nourrisson doit être pesé nu à l'aide d'une balance précise à 0,01 kg près (fig. 11).



FIG. 11. Pesée d'un bébé.

Le poids du bébé doit être mesuré comme suit :

- Laisser 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 le bébé nu sur le tissu dans la nacelle.
- Il est nécessaire d'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 importe de manipuler la balance avec précaution afin que les mesures soient exactes. La balance doit toujours rester propre et doit être stockée à une température d'intérieur normale et à l'abri de l'humidité.

Il convient d'étalonner la balance chaque semaine, par exemple tous les lundis, 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 10 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. Si elle ne peut pas être réétalonnée, elle doit être remplacée.

### 3.2.3.2. *Mesure de la taille du bébé*

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. 12).



FIG. 12. *Mesure de la taille d'un bébé.*

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 le bébé est allongé sur l'axe central de l'infantomètre 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 le bébé 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.
- 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.

### 3.3. ADMINISTRATION DE LA DOSE

Il faut prélever les échantillons de salive de référence sur la mère et son bébé avant que la mère ne consomme la dose. La procédure de prélèvement de ces échantillons est décrite en détail dans la section 3.4. Le flacon contenant la dose 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, car l'eau de condensation subit un fractionnement par rapport au reste du liquide. Pour plus d'informations sur le fractionnement, consulter l'appendice III.

La dose doit être administrée comme suit :

- Le flacon ne doit pas être ouvert avant le moment où la dose doit être consommée ;

- Noter le numéro du flacon et le moment où la dose a été ingérée sur la fiche de données de la mère.
- Cette dernière doit boire sa dose avec une paille afin d'éviter d'en renverser (fig. 13) ;



*FIG. 13. La mère boit la dose avec une paille.*

- Verser environ 50 ml d'eau potable dans le flacon et demander au participant de la boire avec la paille. Effectuer une deuxième fois cette opération afin de s'assurer qu'il ne reste pas d'eau marquée au deutérium dans le flacon.

### 3.4. PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS DE SALIVE

#### 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 à la mère la méthode appliquée avant d'effectuer un prélèvement.

Avant de commencer, il faut vérifier que l'on dispose bien du matériel suivant (fig. 14) :

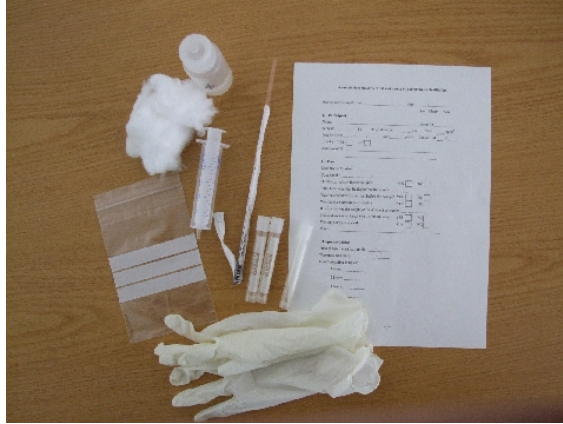


FIG. 14. Matériel requis pour un prélèvement de salive.

— Ouate et tampons :

- Boules d’ouate utilisées pour prélever des échantillons de salive sur la mère ;
- Tampons d’ouate et ouate supplémentaire pour prélever des échantillons de salive sur le bébé.

— Tubes utilisés pour conserver les échantillons :

- 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.
- Doivent être parfaitement secs avant d’être utilisés.
- 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).
- Doivent comporter 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 :
- Doivent être parfaitement sèches avant d’être utilisées.
- 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 trois sachets zip par couple mère-bébé : un pour l'échantillon de référence prélevé sur la mère et sur son bébé, un pour les échantillons prélevés sur la mère après administration de la dose et un pour les échantillons prélevés sur le nourrisson après administration de la dose.
  - Un autre sachet zip plus grand pour conserver ensemble tous les échantillons prélevés sur un couple mère-bébé.
  - 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 la section 3.5.

### **3.4.2. Procédure point par point pour le prélèvement d'un échantillon de salive : la mère**

Le mode opératoire à appliquer pour prélever un échantillon de salive sur la mère est décrit ci-après et est illustré sur la figure 15 :





*FIG. 15. Prélèvement d'un échantillon de salive sur la mère.*

- 1) Il faut utiliser des gants propres pour chaque participant.
- 2) Lorsque l'on prélève des échantillons, il faut s'assurer que la mère n'a rien mangé ni bu dans la demi-heure qui précède le prélèvement.
- 3) Donner une boule d'ouate à la mère afin qu'elle 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.
- 4) Retirer le piston d'une seringue neuve jetable de 20 ml.
- 5) Demander à la mère de ramener l'ouate vers l'avant de sa bouche et de la faire passer directement de sa bouche au corps de la seringue.
- 6) Remettre le piston dans le corps de la seringue.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Jeter les seringues, l'ouate et les gants entre chaque participant. Ne réutiliser ni les tubes ayant contenu des échantillons ni les seringues.
- 11) Prélever de la salive au départ puis 1, 2, 3, 4, 13 et 14 jours après ingestion de la dose par la mère, de préférence au même moment de la journée à chaque fois. Coller sur chaque tube une étiquette où figurent l'identifiant du participant et la date et l'heure où le prélèvement a été effectué.
- 12) Les informations nécessaires doivent être soigneusement conservées. Noter toutes les dates et heures de prélèvement sur la fiche de données du participant et sur les flacons. Ces renseignements doivent être reportés sur un tableur dès que possible.

### 3.4.3. Procédure point par point pour le prélèvement d'un échantillon de salive : le bébé

Le mode opératoire à appliquer pour prélever un échantillon de salive sur le nourrisson est décrit ci-après et est illustré sur la figure 16 :

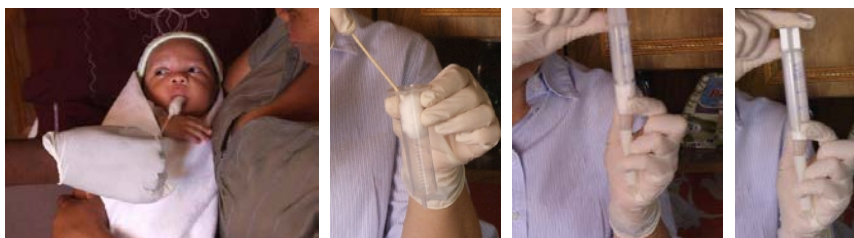


FIG. 16. Prélèvement d'un échantillon de salive sur le bébé.

- 1) Utiliser des gants propres pour chaque nourrisson.
- 2) Lorsque l'on prélève un échantillon, attendre au moins quinze minutes après que le bébé a été nourri pour la dernière fois de sorte qu'il ne reste ni lait ni aucun autre aliment dans sa bouche.
- 3) Chez les nourrissons, les échantillons de salive sont prélevés à l'aide de tampons d'ouate. 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).
- 4) Enlever 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.
- 5) Remettre le piston dans le corps de la seringue.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

- 10) Prélever de la salive sur le bébé au départ puis 1, 2, 3, 4, 13 et 14 jours après ingestion de la dose par la mère, de préférence au même moment de la journée à chaque fois. Coller sur chaque tube une étiquette où figurent l'identifiant du participant et la date et l'heure où le prélèvement a été effectué.
- 11) Les informations nécessaires doivent être soigneusement conservées. Noter toutes les dates et heures de prélèvement sur la fiche de données du participant et sur les flacons. Ces renseignements doivent être reportés sur un tableur dès que possible.

#### **3.4.4. Conservation des échantillons de salive**

Au total, sept échantillons seront prélevés sur la mère et sept sur son bébé. Une étude importante donne donc lieu à des centaines et des centaines de prélèvements et il est essentiel de gérer et d'étiqueter les échantillons de salive avec soin. Les tubes contenant les échantillons de salive correspondant au même couple mère-bébé doivent être conservés au même endroit.

Points importants concernant le stockage des échantillons de salive :

- Il faut utiliser des récipients de bonne qualité et munis d'un bouchon à vis pour le stockage des échantillons de salive ;
- Fermer soigneusement les récipients afin d'empêcher les pertes en eau par évaporation et la contamination croisée entre échantillons.
- Conserver les tubes contenant les échantillons dans des sachets zip afin d'éviter les contaminations croisées entre participants et entre échantillons prélevés avant et après administration de la dose.
- Les échantillons de référence prélevés sur la mère et son bébé doivent être mis dans le même sachet ;
- Utiliser un sachet différent pour les échantillons prélevés sur la mère après administration de la dose et encore un autre pour les échantillons prélevés sur le nourrisson après administration de la dose ;
- Mettre ensuite tous ces sachets dans un sac zip plus grand ;
- Inscrire l'identifiant du participant sur les tubes qui contiennent les échantillons et sur les sachets zip ;
- Noter les prélèvements effectués dans un tableur ;
- Afin de limiter autant que possible le développement des bactéries, les échantillons de salive doivent être conservés dans un réfrigérateur ou une glacière jusqu'à ce que l'on puisse les transférer dans un congélateur à 20 °C avant qu'ils soient analysés.

Afin d'éviter toute contamination des échantillons :

- Ne jamais conserver les échantillons et les doses au même endroit.
- Vérifier systématiquement que le bouchon des tubes qui contiennent les échantillons est fermé hermétiquement afin d'éviter les pertes par évaporation et la contamination par la vapeur d'eau contenue dans l'atmosphère.

### 3.5. DONNÉES À SAISIR

Les données à saisir sont les suivantes :

- Poids, taille, date de l'étude, numéro de dose, date et heure d'administration de la dose et date et heure des prélèvements de salive à J0 et 1, 2, 3, 4, 13 et 14 jours après administration de la dose pour la mère ;
- Poids, taille, date de l'étude et date et heure des prélèvements de salive à J0 et 1,2, 3, 4, 13 et 14 jours après administration de la dose pour le bébé.

La figure 17 montre un exemple de fiche de données du participant.

	Mère	Bébé
Date d'administration de la dose (J0)		
Identifiant du participant		
Date de naissance		
Poids (en kg) à J0		
Poids (en kg) à J14		
Taille (en cm)		
Date et heure du prélèvement de l'échantillon de référence		
Numéro de dose		Sans objet
Date et heure d'administration de la dose		Sans objet
Date et heure du prélèvement de salive à J1		
Date et heure du prélèvement de salive à J2		
Date et heure du prélèvement de salive à J3		
Date et heure du prélèvement de salive à J4		
Date et heure du prélèvement de salive à J13		
Date et heure du prélèvement de salive à J14		

FIG. 17. Exemple de fiche de données du participant.

## 4. MESURE DE L'ENRICHISSEMENT EN DEUTÉRIUM PAR SPECTROSCOPIE IRTF

L'enrichissement des échantillons de salive en deutérium peut être mesuré par spectroscopie IRTF [16]. La figure 18 présente un modèle courant de spectromètre IRTF.



*FIG. 18. Modèle courant de spectromètre IRTF.*

### 4.1. LE LABORATOIRE D'IRTF

Le spectromètre IRTF doit être installé dans une pièce bien ventilée afin d'éviter l'accumulation de  $\text{CO}_2$  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 produites 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 %. Si le spectromètre contient un dessiccateur, il convient de le remplacer à chaque fois que l'indicateur change de couleur. Lorsque le climat est humide, cette opération est parfois effectuée toutes les semaines.

## 4.2. 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.

On trouvera une brève description des principes de la spectroscopie IRTF dans l'appendice IV. 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.

## 4.3. 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 ( $D_2O$ , teneur isotopique de 99,8 % en  $^2H$ ) et en la diluant dans de l'eau potable. Notons que la densité de l'eau deutérée est de 1,105 g/ml.

Il convient de signaler les points suivants :

- Il est pratique 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 alors 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 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 importe 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  $\mu\text{m}$ .
- 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 (précise à 0,0001 g près ou de préférence à 0,00001 g près), peser une fiole jaugée de 50 ml, propre, sèche et munie de son bouchon ou 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  $\text{D}_2\text{O}$  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 de l'eau deutérée 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  $\text{D}_2\text{O}$  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  $\text{D}_2\text{O}$  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  $\text{D}_2\text{O}$  et B le poids de l'eau potable plus le  $\text{D}_2\text{O}$  dans la fiole d'un litre, le poids de l'eau potable ajoutée est égal à  $B - A$ .
  - Par exemple, si poids de  $\text{D}_2\text{O} = 1,0015 \text{ g}$  (A) et

- Poids de l'eau potable plus D<sub>2</sub>O dans la fiole d'un litre = 1 000,1 g (B)
- Alors poids de l'eau potable ajoutée = 1 000,1 g – 1,0015 g  
= 999,0985 g (B – A)
- Enrichissement de l'étalon en D<sub>2</sub>O =  $A \div (B - A) \times 10^6$  mg/kg  
= 1,0015 g ÷ 999,0985 g × 10<sup>6</sup> mg/kg  
= 1 002 mg/kg (ppm)

Il convient de noter que 1 mg/kg = 1 mg/L, car la densité du H<sub>2</sub>O est égale à 1,0 kg/L à 25 °C. La concentration de D<sub>2</sub>O dans l'étalon s'élève donc à peu près à 1 000 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.

#### 4.3.1. 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 l'eau deutérée hautement enrichi (teneur isotopique de 99,8 % en <sup>2</sup>H). 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.

#### 4.4. 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 (fig. 19). On peut préparer des volumes d'étalons plus petits (par exemple 100 ml) en diluant, dans une



fiolle jaugée, du D<sub>2</sub>O 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.

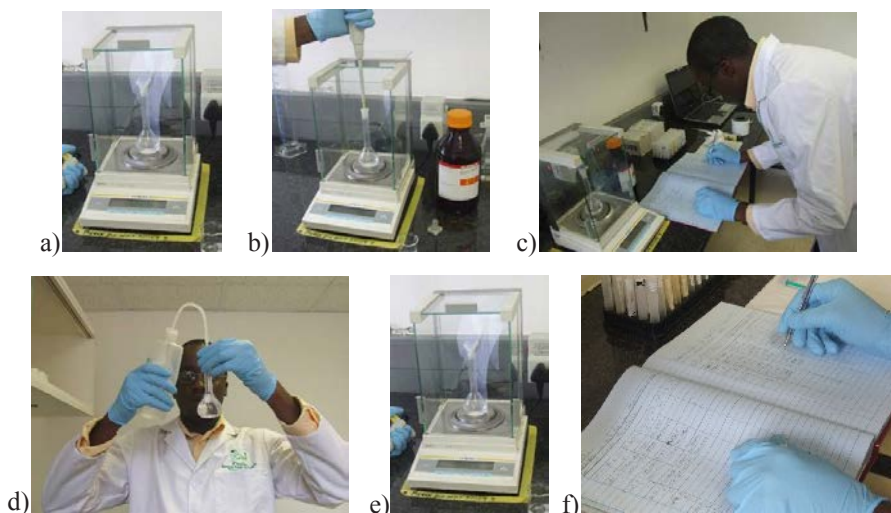


FIG. 19. Préparation d'étalons. a) Pesée de la fiole jaugée munie de son bouchon ; b) introduction de la pipette de D<sub>2</sub>O dans un volume d'eau préalablement pesé ; c) nouvelle pesée et consignation du poids ; d) l'opérateur complète au trait de jauge ; e) nouvelle pesée ; f) consignation du poids. Calcul de l'enrichissement de l'étalon en D<sub>2</sub>O.

Il faut préparer (dans 100 ml d'eau potable) les étalons présentés dans le tableau ci-après (tableau 1). On peut pipetter le volume de D<sub>2</sub>O (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. La figure 20 présente un exemple de courbe étalon.

TABLE 1. PRÉPARATION D'ÉTALONS POUR UNE IRTF

Enrichissement visé (en mg de D <sub>2</sub> O/kg)	µl de D <sub>2</sub> O	Poids de D <sub>2</sub> 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		
1000	90		
1500	140		
2000	180		

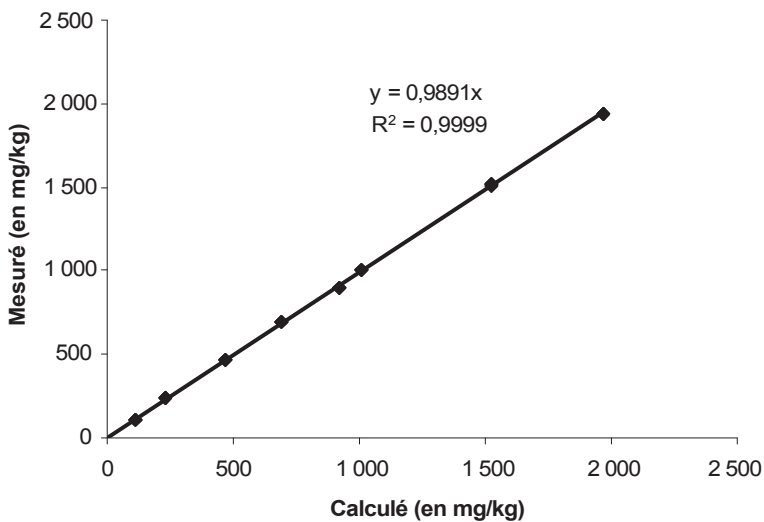


FIG. 20. Courbe étalon obtenue par spectroscopie FTIR pour du deutérium.

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

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.

#### 4.5. 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. De plus, il convient de s'assurer que l'interface et le miroir fonctionnent correctement. Enfin, vérifier que l'appareil est réglé de la manière suivante :

- Mode de mesure : *Absorbance*
- Apodisation : *Triangular*
- Nombre de *scans* : 32
- Résolution : 2,0
- Plage (en  $\text{cm}^{-1}$ ) : 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  $2\,504\text{ cm}^{-1}$  (fig. 21).

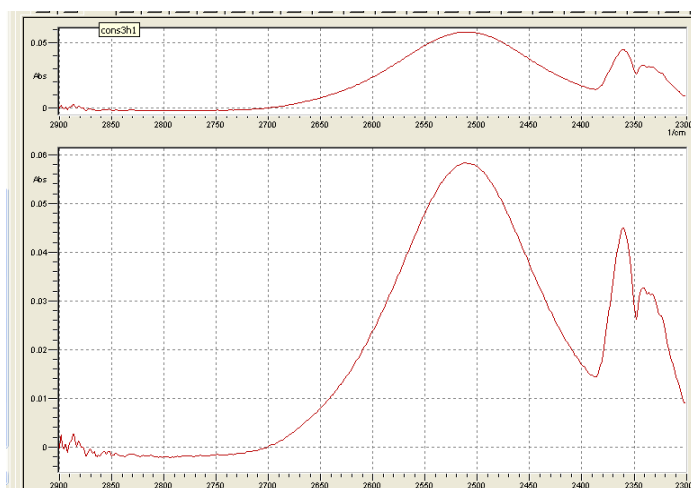


FIG. 21. Spectre IRTF classique pour un échantillon d'eau enrichie en deutérium après prise en compte de la référence.

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.

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.

#### 4.5.1. Spectres IRTF classiques

Le CO<sub>2</sub> atmosphérique provoque la formation d'un doublet prononcé sur l'épaule du signal correspondant à l'eau deutérée. Ces pics peuvent être soit positifs (fig. 21), soit négatifs (fig. 22). On obtient des pics négatifs lorsque la concentration de CO<sub>2</sub> 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.

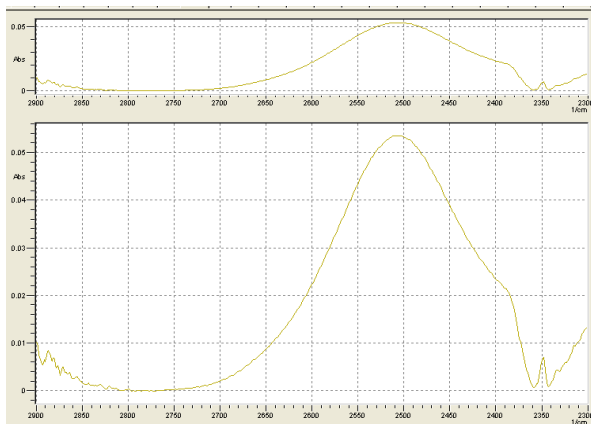


FIG. 22. SPECTRE IRTF classique corrigé de l'échantillon de référence et qui présente des pics de CO<sub>2</sub> négatifs.

Le pic large observé à 2 504 cm<sup>-1</sup> est le pic correspondant à l'eau deutérée. Le doublet qui apparaît à 2 350 cm<sup>-1</sup> est dû au CO<sub>2</sub> présent dans le compartiment échantillon.

Des précautions doivent être prises afin de réduire autant que possible la hauteur du pic du  $\text{CO}_2$  sur la queue du pic associé la liaison D–O.

- 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 4.7, 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.

#### 4.6. CELLULE DU SPECTROMÈTRE

Il est recommandé de se servir de cellules en fluorure de calcium d'une épaisseur (chemin optique) de  $10^{-4}$  m (100  $\mu\text{m}$ ) 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 endommagent. On trouvera sur la figure 23 le schéma d'une cellule de spectromètre IRTF (Omni-cell, référence de la pièce Specac : 1800). La méthode à suivre pour remplir une cellule est décrite dans la section 4.7. Les cellules en chlorure de sodium, généralement fournies avec le spectromètre, ne conviennent pas pour analyser des échantillons qui contiennent de l'eau.

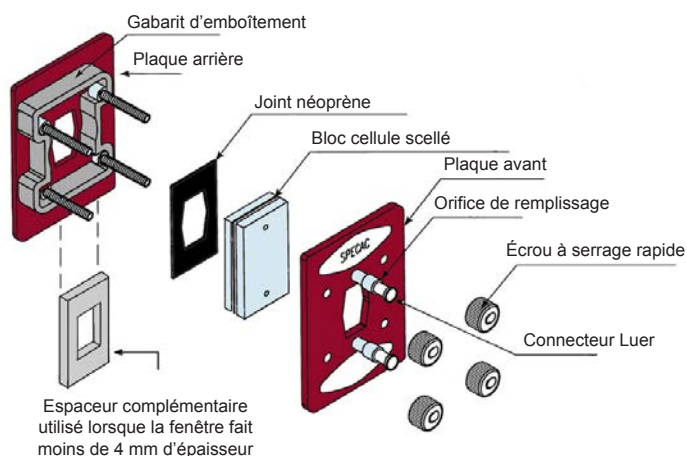


FIG. 23. SCHEMA d'une cellule de spectromètre IRTF (copyright Specac Ltd., Royaume-Uni ; reproduit avec l'accord de l'entreprise).

#### 4.6.1. 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 des cellules 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.

#### 4.7. REMPLISSAGE D'UNE CELLULE DE SPECTROMÈTRE IRTF

Pour remplir les cellules, on se sert de seringues jetables d'un millilitre (fig. 24).



FIG. 24. Cellule de spectromètre IRTF et seringue d'un millilitre insérée dans un des orifices de remplissage. La cellule est soulevée d'un côté à l'aide d'un objet adéquat, par exemple un crayon.

##### 4.7.1. Introduction

Il convient de prendre les précautions suivantes :

- Les échantillons de salive doivent être complètement dégelés avant d'être analysés.

- 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.
- 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.
- 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  $\mu\text{l}$ . Le versement d'un millilitre de salive ou d'eau de référence permet d'éliminer les traces de l'échantillon précédent.

#### 4.7.2. Méthode recommandée pour remplir une cellule de spectromètre IRTF

La méthode recommandée pour remplir une cellule de spectromètre FTIR est la suivante (fig. 25) :



FIG. 25. Méthode de remplissage d'une cellule. La cellule est remplie à l'aide d'une seringue d'un millilitre, l'absence de bulles d'air est vérifiée en l'exposant à la lumière, puis elle est mise dans le compartiment échantillon du spectromètre.

- 1) Verser l'échantillon (étalon ou salive) dans une seringue d'un millilitre.
- 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.

- 6) Si des bulles sont visibles dans la cellule, rajouter de l'échantillon suivant la méthode décrite cidessus jusqu'à ce que toutes les bulles aient été chassées.
- 7) L'absorbance doit être mesurée entre 2 300 et 2 900  $\text{cm}^{-1}$ .
- 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, reprendre la procédure à l'étape 1.
- 11) Lorsque tous les échantillons ont été analysés, rincer la cellule avec de l'eau potable avant de la ranger.

## **5. OPÉRATIONS ESSENTIELLES À EFFECTUER POUR QUE LES DONNÉES OBTENUES SOIENT DE BONNE QUALITÉ**

### 5.1. PRÉPARATION DES DOSES

Les doses doivent être pesées avec précision (à au moins 0,01 g près). Cette opération doit être effectuée au laboratoire d'analyse par du personnel qualifié.

### 5.2. SUR LE TERRAIN

Sur le terrain, les points suivants jouent un rôle important :

- Des hommes de terrain bien formés peuvent apporter leur concours aux relevés anthropométriques 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 mères doivent être pesées (à 0,1 kg près) en vêtements légers. Les bébés doivent être pesés à 0,01 kg près.
- Il convient de s'assurer que les mères ne mangent ni ne boivent dans la demi-heure qui précède le prélèvement de salive.
- Il convient de s'assurer que les bébés n'ont pas été nourris dans le quart d'heure qui précède le prélèvement de salive.



- 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 à la mère de la boire, et ce à deux reprises.
- Veiller à ce qu'aucune contamination croisée ne se produise entre les flacons qui contiennent les doses et les tubes d'échantillons.
- 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 tableau, par exemple Microsoft Excel, dès que possible.
- Les fiches papier doivent être conservées par mesure de précaution.

### 5.3. AU LABORATOIRE

Au laboratoire, les points suivants jouent un rôle important :

- Le spectromètre IRTF ne doit pas être déplacé une fois qu'il a été installé. S'il est nécessaire de le déplacer, faire appel à un technicien pour vérifier l'alignement des miroirs.
- À l'intérieur de l'appareil, le taux d'humidité doit être inférieur à 60 %. Si le spectromètre contient un dessiccateur, il convient de le remplacer à chaque fois que l'indicateur change de couleur. Lorsque le climat est humide, cette opération est parfois effectuée toutes les semaines.
- Veiller à ce que les échantillons de salive soient 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.

## 6. LISTE DE MATÉRIEL

### 6.1. AU LABORATOIRE

Eau deutérée (teneur en  $^2\text{H}$  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'échantillons.

Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

Cellules en fluorure de calcium pour la spectroscopie.

Seringues jetables d'un millilitre 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  $\mu\text{L}$  et 20  $\mu\text{L}$ ) 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.

## 6.2. SUR LE TERRAIN

Doses (préparées au laboratoire).

Eau potable.

Pailles.

Balance précise à 0,1 kg près pour peser les mères.

Balance précise à 0,01 kg près pour peser les bébés.

Toise destinée à mesurer la taille des mères.

Infantomètre (toise pour bébé) destinée à mesurer la taille des nourrissons.

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'échantillons.

Stylos indélébiles pour écrire sur les étiquettes.

Boules d'ouate pour les prélèvements d'échantillons sur les mères.

Tampons d'ouate pour les prélèvements d'échantillons sur les bébés.

Seringues en plastique de 20 millilitres.

Gants jetables.

Sachets zip en plastique destinés à conserver les échantillons de salive. Mettre les échantillons de référence prélevés sur la mère et son bébé dans le même sachet. Utiliser un sachet différent pour les échantillons prélevés sur la mère après administration de la dose et encore un autre pour les échantillons prélevés sur le nourrisson après administration de la dose. Mettre ensuite tous ces sachets dans un sac zip plus grand. Trois sachets zip de taille moyenne et un grand sac zip par couple mère-bébé.

Montre (pour noter l'heure à laquelle 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 I

### MODÈLE DES FLUX D'EAU À DEUX COMPARTIMENTS CHEZ LE COUPLE MÈRE-BÉBÉ

#### I.1. INTRODUCTION

La technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère a été décrite pour la première fois par A. Coward et ses collègues en 1982 [5]. Le présent appendice s'appuie sur la référence [5] et sur les travaux plus récents de Haisma, réalisés sous la direction de Coward [7].

Le calcul de la consommation de lait maternel et de la consommation d'eau provenant de sources autres que le lait maternel repose sur un modèle stable à deux compartiments [17]. Celui-ci est représenté sur la figure 26.

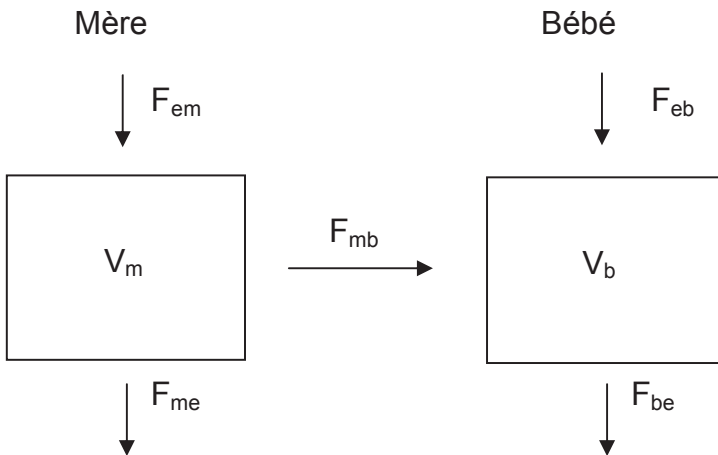


FIG. 26. Modèle des flux d'eau à deux compartiments chez le couple mère-bébé.  $F$  = flux ;  $m$  = mère ;  $b$  = bébé ;  $e$  = extérieur ;  $V$  = volume d'ECT ;  $V_m$  = volume d'ECT de la mère ;  $V_b$  = volume d'ECT du bébé ;  $F_{em}$  = de l'extérieur vers la mère ;  $F_{eb}$  = de l'extérieur vers le bébé (consommation de liquides provenant d'autres sources que le lait maternel) ;  $F_{mb}$  = de la mère au bébé (consommation de lait maternel) ;  $F_{me}$  = de la mère vers l'extérieur ;  $F_{be}$  = du bébé vers l'extérieur.

Dans le modèle à deux compartiments, le premier compartiment est l'eau corporelle de la mère ( $V_m$ ) et le deuxième l'eau corporelle du bébé ( $V_b$ ). Ces

deux compartiments sont reliés par le flux de lait maternel qui va de la mère au bébé (Fmb). À l'équilibre, le volume d'eau qui arrive est égal au volume d'eau qui sort. Sur la figure 26, F représente un flux d'eau. La première lettre après le F indique d'où le flux vient et la deuxième, où il va. Ainsi, Fmb correspond au flux de la mère vers son bébé, c'est-à-dire à la consommation de lait maternel par le nourrisson. Le schéma montre également le flux de l'extérieur (e) vers la mère (Fem), c'est-à-dire l'eau qu'elle boit, et le flux de la mère vers l'extérieur, autrement dit l'eau qu'elle perd par les urines, les selles, la sueur et la respiration. De même, Feb est le flux qui va de l'extérieur vers le bébé, c'est-à-dire la consommation d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel par l'enfant. Le dernier flux (Fbe) va du bébé vers l'extérieur. Il s'agit de l'eau que le nourrisson perd par les urines, les selles, la transpiration, la salive et la respiration.

## I.2. HYPOTHÈSES DU MODÈLE

Le modèle stable à deux compartiments repose sur plusieurs hypothèses. Lorsque celles-ci ne sont pas valables, une correction est intégrée aux calculs.

Les hypothèses sont les suivantes :

- Pour chaque personne, l'eau corporelle n'est constituée que d'un seul compartiment, chez la mère comme chez le bébé.
- La dose de deutérium s'équilibre rapidement et uniformément dans tout le compartiment eau de la mère et de son bébé.
- Chez la mère, la taille du compartiment eau est constante. Chez le nourrisson, on suppose qu'elle varie linéairement avec le temps en raison de la croissance de l'enfant.
- Quelle que soit la voie de sortie, toute l'eau est marquée au deutérium dans les mêmes proportions que la présence de deutérium dans le compartiment eau de l'organisme.
- Le deutérium ne sort de l'organisme que dans des molécules d'eau.
- Le bébé n'est alimenté en eau que par ingestion.

Le deutérium est pris sous forme d'eau marquée au deutérium, également appelée eau deutérée ( $^2\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{D}_2\text{O}$ ).

### I.2.1. Validité des hypothèses

- Hypothèse 1 : Chez la mère comme chez le bébé, l'eau corporelle n'est constituée que d'un seul compartiment. Cette affirmation est exacte.

- Hypothèse 2 : La dose de deutérium s'équilibre rapidement et uniformément dans tout le compartiment eau de la mère et de son bébé. Cette affirmation est exacte. Le deutérium est complètement réparti dans l'organisme de la mère quelques heures seulement après administration de la dose.
- Hypothèse 3 : Chez la mère, la taille du compartiment eau est constante, mais, chez le nourrisson, elle varie linéairement avec le temps. Chez l'adulte en bonne santé et dont le poids est stable, le volume d'eau qui entre est égal au volume d'eau qui sort sur une période de deux semaines. Si le poids de la mère change, cela peut être dû à des changements dans sa masse grasse, ce qui n'a pas d'incidence sur la taille du compartiment eau de l'organisme, ou à des changements dans sa masse maigre, ce qui modifie la taille de ce même compartiment. Par ailleurs, pendant les deux semaines que dure l'étude, le bébé grandit et, de ce fait, son ECT augmente. Il faut intégrer une correction pour tenir compte des modifications de l'ECT du nourrisson. L'ECT initiale de la mère est mesurée par dilution isotopique, mais, lorsque la mère ingère la dose d'eau deutérée, il n'est pas possible de déterminer l'ECT du bébé à moins de lui administrer un autre isotope stable (par exemple de l'oxygène 18). Cette étape compliquerait la procédure et la rendrait beaucoup plus coûteuse. De plus, l'oxygène 18 impose une analyse par spectrométrie de masse. C'est pourquoi l'ECT du bébé est déduite de son poids (P) par la formule de Wells [15] :

$$ECT = 0,84 \times P^{0,82}$$

- Hypothèse 4 : Quelle que soit la voie de sortie, toute l'eau est marquée au deutérium dans les mêmes proportions que la présence de deutérium dans le compartiment eau de l'organisme. Cette hypothèse est fautive. Une correction doit être intégrée afin de tenir compte du fractionnement isotopique qui se produit dans l'eau perdue par le corps au cours de la respiration et par évaporation.
- Hypothèse 5 : Le deutérium ne sort de l'organisme que dans des molécules d'eau. Ce n'est pas tout à fait exact. Une petite partie des particules de deutérium se substitue à des atomes d'hydrogène (principalement dans des protéines) chez la mère comme chez son bébé. C'est ce que l'on appelle les échanges non aqueux. L'erreur introduite par le fait d'estimer l'ECT du bébé plutôt que de la calculer est plus importante que celle qui est induite par les échanges non aqueux. Il n'est donc pas nécessaire de tenir compte de ces échanges pour évaluer la consommation de lait maternel.
- Hypothèse 6 : Le bébé n'est alimenté en eau que par ingestion. En réalité, de l'eau atmosphérique peut être absorbée par la peau et les poumons du nourrisson, les échanges alvéolaires étant les plus importants. Il faut

intégrer une correction pour tenir compte de cet apport en eau par voie non orale, apport dont on estime qu'il représente 6,3 % du total de l'eau qui pénètre dans l'organisme.

### I.3. CALCUL DE LA CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL (L) ET DE LA CONSOMMATION D'EAU PROVENANT D'AUTRES SOURCES QUE LE LAIT MATERNEL (FS) CHEZ LE BÉBÉ

La consommation de lait maternel et d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel peut être calculée en ajustant les courbes de l'enrichissement en deutérium à un modèle de vitesse de renouvellement de l'eau chez la mère et son bébé. La figure 27 en donne un exemple.

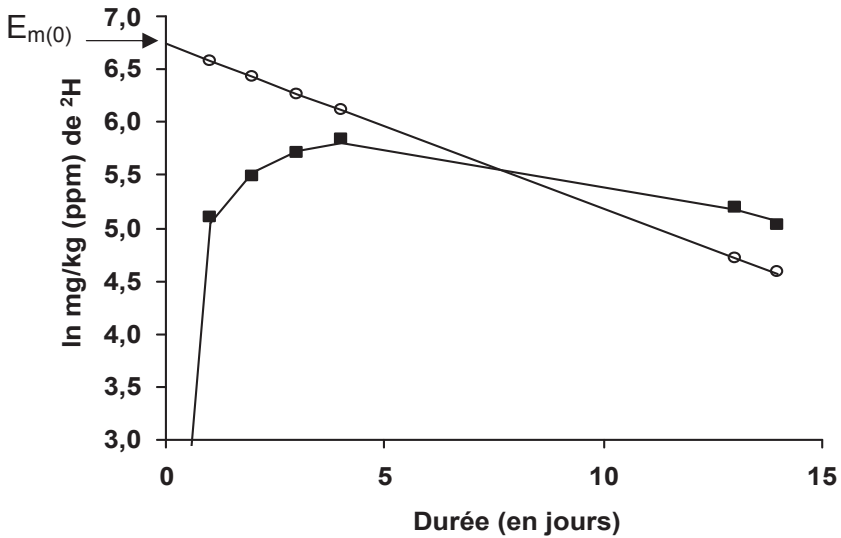


FIG. 27. Enrichissement en deutérium de l'eau corporelle de la mère (○) et de son bébé (■).

À l'équilibre, la vitesse de renouvellement de l'eau chez la mère est donnée par l'équation monoexponentielle suivante :

$$\frac{E_{m(t)}}{E_{m(0)}} = e^{-k_{mm}t}$$

où

- $E_{m(t)}$  est l'enrichissement en deutérium de l'eau corporelle de la mère à la date  $t$  en mg/kg (ppm) ;
- $t$  est la durée écoulée (en jours) depuis que la dose a été administrée ;
- $E_{m(0)}$  est l'enrichissement en deutérium de l'eau corporelle de la mère à l'instant zéro en mg/kg (ppm), c'est-à-dire l'ordonnée de l'intersection de la courbe d'élimination de l'isotope (relation log-linéaire entre l'enrichissement en  $^2\text{H}$  de l'eau corporelle et le temps écoulé) avec l'axe des ordonnées (voir la figure 27) ;
- $k_{mm}$  est la vitesse de renouvellement de l'eau chez la mère (en kg/jour), autrement dit la pente de la courbe d'élimination de l'isotope (fig. 27).

Les valeurs obtenues pour le bébé sont ajustées à la formule multiexponentielle suivante :

$$E_{b(t)} = E_{m(0)} \left( \frac{F_{bm}}{V_b} \right) \left( \frac{e^{-k_{mm}t} - e^{-(F_{bb}/V_b)t}}{(F_{bb}/V_b) - k_{mm}} \right)$$

où

- $E_{b(t)}$  est l'enrichissement en deutérium de l'eau corporelle du bébé à la date  $t$  en mg/kg (ppm) ;
- $t$  est la durée écoulée (en jours) depuis que la dose a été administrée ;
- $E_{m(0)}$  est l'enrichissement en deutérium de l'eau corporelle de la mère à l'instant zéro en mg/kg (ppm), c'est-à-dire l'ordonnée de l'intersection de la courbe d'élimination de l'isotope (relation log-linéaire entre l'enrichissement en  $^2\text{H}$  de l'eau corporelle et le temps écoulé) avec l'axe des ordonnées (voir la figure 27) ;
- $F_{mb}$  représente la quantité d'eau donnée par la mère à son enfant sous forme de lait maternel (en kg/jour) ;
- $V_b$  est le volume de distribution total du  $^2\text{H}$  dans l'organisme du bébé (en kg). On suppose que  $V_b$  varie linéairement, ses valeurs initiales et finales étant déterminées à partir du poids du bébé ( $P$ , en kg).  $V_b = 0,84 \times P^{0,82}$  [15] ;
- $k_{mm}$  est la vitesse de renouvellement de l'eau chez la mère (en kg/jour), autrement dit la pente de la courbe d'élimination de l'isotope (fig. 27) ;
- $F_{bb}$  représente les pertes en eau totales chez le bébé (en kg/jour).

L'ajustement des courbes peut être effectué à l'aide de la fonctionnalité « Solveur » intégrée à Microsoft Excel. Pour se servir de cette fonction, il faut aller dans le menu « Outils » puis cliquer sur « Solveur ». Cela fait apparaître une boîte de dialogue qui permet de choisir une cellule cible pour laquelle, en



l'espèce, on cherche à ce que la valeur soit minimale. Il convient de noter que, si la commande « Solveur » n'apparaît pas dans le menu « Outils », il faut l'ajouter. Pour ce faire, sélectionner la commande « Macros complémentaires » du menu « Outils », puis cocher la case intitulée « Solveur ». Le « Solveur » applique une régression non linéaire afin de déterminer, par itération, les valeurs des constantes qui permettent le mieux d'ajuster une courbe à une série de données, c'est-à-dire de rechercher le minimum de la somme des carrés des différences entre les valeurs observées et les valeurs ajustées pour l'ensemble des données associées à la mère et à son bébé. Cela impose de fixer des valeurs initiales pour les paramètres inconnus ( $E_{m(0)}$ ,  $F_{mb}$ ,  $k_{mm}$  et  $F_{bb}$ ) puis d'affiner les résultats afin de converger vers les meilleures valeurs d'ajustement. Le volume d'eau corporelle de la mère ( $V_m$ ) peut être calculé à partir de la dose administrée et  $E_{m(0)}$  et la consommation d'eau par la mère peuvent être estimés à l'aide de la formule suivante :

$$F_{em} = V_m \times k_{mm}$$

#### I.4. CALCUL DE L : CONSOMMATION DE LAIT MATERNEL PAR LE BÉBÉ

La consommation de lait maternel par le bébé est calculée à partir du flux d'eau qui va de la mère à son bébé en supposant que l'eau représente 87,1 % du lait maternel [18].

$$L = F_{mb} \div 0,871 \text{ kg/jour}$$

La consommation de lait maternel mesurée est souvent exprimée en grammes/jour.

#### I.5. CALCUL DE $F_s$ : CONSOMMATION D'EAU PROVENANT D'AUTRES SOURCES QUE LE LAIT MATERNEL PAR LE BÉBÉ

Au total, la consommation d'eau par le bébé comprend l'eau produite par oxydation de la matière sèche du lait (protéines, lipides et glucides) et l'eau provenant d'autres sources que le lait maternel. La quantité d'eau totale qui pénètre dans l'organisme grâce à la consommation de lait maternel est notée  $F_m$ . Le calcul de  $F_s$  suppose qu'il y a autant d'eau qui entre que d'eau qui sort. Il convient de tenir compte de la croissance du bébé ( $F_c$ ), de l'augmentation de l'ECT durant les deux semaines pendant lesquelles de la salive est prélevée, du

fait que l'eau perdue par le nourrisson au cours de la respiration et par évaporation ( $F_{be}$ ) est soumise au fractionnement isotopique (pour plus d'informations sur ce fractionnement, se reporter à l'appendice III) et de l'absorption de l'eau atmosphérique par la peau et surtout par les poumons ( $F_a$ ). Flux d'eau entrant = ( $F_m + F_a + F_s$ ).

Le flux d'eau entrant ( $F_m + F_a + F_s$ ) est égal à la somme du flux d'eau sortant et de l'eau conservée pour la croissance du bébé ( $F_{be} + F_c$ ). De ce fait :

$$F_s = F_{be} + F_c - F_m - F_a$$

### 1.5.1. Calcul de la quantité totale d'eau consommée par le bébé par suite de l'allaitement maternel ( $F_m$ )

Le flux d'eau qui va de la mère à son bébé ( $F_{mb}$ ) est constitué de l'eau présente sous forme libre dans le lait et ne prend pas en compte l'eau produite par oxydation de la matière sèche du lait (protéines, lipides et glucides) :

- On suppose que le lait maternel contient 87,1 % d'eau, 1,3 % de protéines, 4,1 % de lipides et 7,2 % de glucides [18] ;
- Un gramme de protéines donne 0,41 gramme d'eau, un gramme de lipides 1,07 gramme d'eau et un gramme de glucides 0,55 gramme d'eau.

L'oxydation de la matière sèche contenue dans 100 grammes de lait maternel produit donc environ neuf grammes d'eau.

Au total, la quantité d'eau consommée par le bébé par suite de l'allaitement maternel ( $F_m$ ) est donnée par la formule suivante :

$$F_m = F_{mb} + 0,09 \times L$$

### 1.5.2. Correction appliquée pour tenir compte de la croissance du bébé ( $F_c$ )

La croissance du bébé pendant la durée de l'étude se traduit par une petite modification du volume de distribution du deutérium dans son organisme, volume lié à l'ECT et noté ici  $V_b$ . On suppose que  $V_b$  évolue linéairement, ses valeurs initiales et finales étant déterminées par le poids ( $P$ , en kg) du nourrisson.  $V_b = 0,84 \times P0,82$  [15].

La quantité d'eau conservée pendant la durée de l'étude est notée  $F_c$  et est donnée par la formule suivante :

$$F_c = (V_{b,J14} - V_{b,J0}) \div 14$$

### **1.5.3. Correction appliquée pour tenir compte du fractionnement isotopique ( $F_{be}$ )**

Le deutérium quitte l'eau corporelle par la respiration et de manière insensible par la peau (évaporation) plus lentement que l'hydrogène pour les raisons exposées plus haut. Le  $F_{bb}$  doit donc être corrigé du fractionnement isotopique.

La quantité d'eau totale qui sort du bébé, c'est-à-dire le flux qui va du bébé vers l'extérieur ( $F_{be}$ ) et qui comprend l'eau perdue par les urines, la sueur, les selles et la respiration, intègre une correction pour tenir compte du fractionnement isotopique. Pour le deutérium, le facteur de fractionnement isotopique entre la vapeur d'eau et l'eau liquide est égal à 0,946 à 37 °C. On suppose que 85 % de l'eau qui quitte l'organisme n'est pas fractionnée et que les 15 % restants sont fractionnés avec un facteur de 0,946. Le coefficient de correction vaut donc  $0,85 + (0,946 \times 0,15) = 0,9919$ .

$F_{be}$  est donné par la formule suivante :

$$F_{be} = F_{bb} \div 0,9919$$

### **1.5.4. Correction appliquée pour tenir compte de l'eau absorbée par la peau ( $F_a$ )**

S'agissant des apports en eau par voie non orale chez le nourrisson ( $F_a$ ), il faut appliquer un coefficient de correction pour tenir compte de l'eau environnante qui pénètre dans son organisme et qui est constituée d'eau atmosphérique absorbée par la peau et les poumons. Les échanges alvéolaires en représentent la part la plus importante. On estime que les apports en eau par voie non orale s'élèvent à 6,3 % du total de l'eau qui pénètre ou se forme dans l'organisme [19]. Comme ce total est égal à la somme de l'eau qui sort et de celle qui est conservée,  $F_a$  est donné par la formule suivante :

$$F_a = 0,063 \times (F_{be} + F_c)$$

## **1.6. CALCUL DES APPORTS EN EAU PAR VOIE ORALE PROVENANT D'AUTRES SOURCES QUE LE LAIT MATERNEL ( $F_s$ )**

$$F_s = F_{be} + F_c - F_m - F_a$$

Il existe une erreur associée à l'estimation de la consommation d'eau provenant d'autres sources que lait maternel par le bébé en raison des hypothèses retenues pour effectuer les calculs. Cette erreur ( $25 \pm 62$  ml/jour) se traduit par une petite consommation apparente d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel chez des nourrissons qui sont en réalité nourris exclusivement au sein [9].

## Appendice II

### INFORMATIONS GÉNÉRALES CONCERNANT LA SÛRETÉ DE L'EAU DEUTÉRÉE

#### II.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 « abondance 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  $^1\text{H}$  et le deutérium par  $^2\text{H}$ . Le deutérium est également souvent symbolisé par la lettre D. Il a été découvert en 1932.

Le noyau de l' <b>hydrogène</b> comporte un proton	$^1\text{H}$ (isotope stable)
Si le noyau contient un seul neutron, il s'agit de <b>deutérium</b>	$^2\text{H}$ (isotope stable)
Si le noyau contient deux neutrons, il s'agit de <b>tritium</b>	$^3\text{H}$ (isotope radioactif)

L'abondance naturelle du deutérium s'élève à 0,015 %. Cela signifie qu'une femme adulte de 55 kg dont la masse d'eau corporelle est égale 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  $\text{D}_2\text{O}$  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).

## II.2. SÛRETÉ DE L'EAU DEUTÉRÉE

Les isotopes stables sont utilisés dans les études sur le métabolisme humain depuis plus d'un demi-siècle. Les isotopes stables de l'hydrogène n'émettent aucun rayonnement potentiellement nocif. Par ailleurs, la masse du deutérium est de deux ( $^2\text{H}$ ) et la masse de l'hydrogène de un ( $^1\text{H}$ ). La différence de masse entre le deutérium et l'hydrogène (en proportion de la masse atomique de l'hydrogène) s'élève donc à deux et 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 [20]. 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. Une concentration de deutérium de 15 % doit être maintenue par une

absorption continue de doses avant que des effets indésirables ne deviennent manifestes [20]. Chez les mammifères, aucun effet nocif n'a été détecté lorsque la concentration de deutérium est inférieure à 15 %. 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 % [20]. Certains ont avancé que des effets secondaires transitoires visibles peuvent se produire 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 [20]. 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 III

### 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. 28). Ainsi, dans un échantillon d'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm) d'eau deutérée, la probabilité qu'un H quelconque soit un  $^2\text{H}$  est égale à 0,001 et la probabilité qu'il soit un  $^1\text{H}$  s'élève à 0,999.

In the image above, please replace the dots by comasand add a n-b space between the figure and the percent (e.g. 99.8001% should be 99,8001 %).

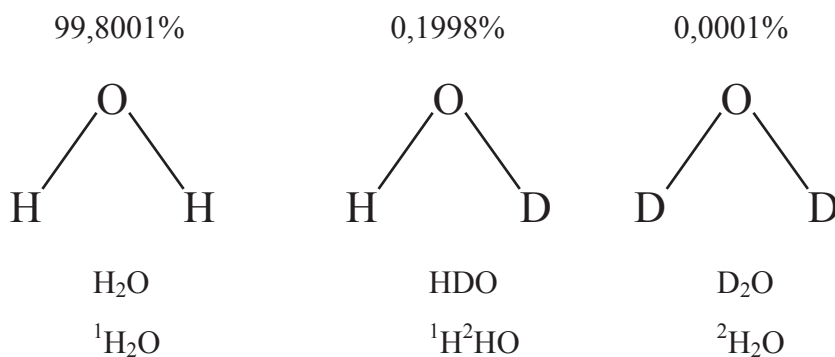


FIG. 28. Proportions respectives des différentes molécules dans un échantillon d'eau contenant 1 000 mg/kg de  $\text{D}_2\text{O}$ .

Pour toute molécule d'eau, la probabilité que les deux H soient des  $^1\text{H}$  ( $^1\text{H}-\text{O}-^1\text{H}$ ) 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  $^2\text{H}$  ( $^2\text{H}-\text{O}-^2\text{H}$ ) 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  $^1\text{H}$  et un  $^2\text{H}$  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.

L'énergie de la liaison entre le deutérium ( $^2\text{H}$  ou D) et l'oxygène (O) est légèrement plus élevée que celle de la liaison entre l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) 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, pertes qui contiennent moins de deutérium que l'eau corporelle, a donc pour effet de concentrer l'eau deutérée qui reste. Cela peut conduire à une sous-estimation de l'ECT chez la mère et, par conséquent, à une surestimation de sa masse grasse et à une sous-estimation de la consommation d'eau provenant d'autres sources que le lait maternel par le bébé. Les participants ne doivent donc pas pratiquer une activité physique excessive durant les quatorze jours que durent les prélèvements, mais doivent continuer à mener leurs activités quotidiennes.

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.

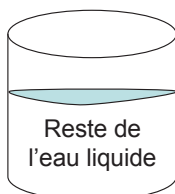
L'exemple suivant (fig. 29) montre l'effet du fractionnement lorsque 100  $\mu\text{l}$  de buée sont collés au bouchon d'un tube contenant 4 ml de salive et dont la concentration initiale en  $^2\text{H}$  s'élevait à 1 000 mg/kg.

100 µl de buée  
(941 ppm de <sup>2</sup>H)



Probabilité <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O = 99,8119 %  
Probabilité <sup>1</sup>H<sup>2</sup>HO = 0,1880 %

3,9 ml de salive  
(1 001,5 ppm de <sup>2</sup>H)



Probabilité <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O = 99,8999 %  
Probabilité <sup>1</sup>H<sup>2</sup>HO = 0,2001 %

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

FIG. 29. Effet du fractionnement isotopique sur un échantillon de salive de quatre millilitres contenant initialement 1 000 mg/kg (ppm) de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O.

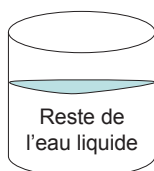
L'effet du fractionnement est plus prononcé lorsque le volume de salive est faible. Par exemple, si un tube qui contient un millilitre de salive reste ouvert et si 100 µl de liquide s'évaporent, il ne restera dans le tube que 900 µl (0,9 ml), qui contiendront 1 006 mg/kg de <sup>2</sup>H (fig. 30).

100 µl de condensation  
(941 ppm de <sup>2</sup>H)



Probabilité <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O = 99,8119 %  
Probabilité <sup>1</sup>H<sup>2</sup>HO = 0,1880 %

0,9 ml de salive  
(1 006 ppm de <sup>2</sup>H)



Probabilité <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O = 99,7989 %  
Probabilité <sup>1</sup>H<sup>2</sup>HO = 0,2010 %

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

FIG. 30. Effet du fractionnement isotopique sur un échantillon de salive d'un millilitre contenant initialement 1 000 mg/kg (ppm) de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O.

## Appendice IV

### 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 4. Le présent appendice constitue une introduction aux principes de la spectroscopie IRTF.

#### IV.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. 31).

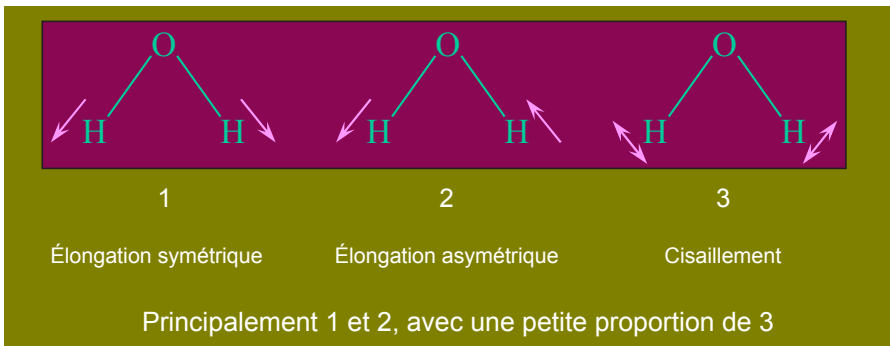


FIG. 31. Modes de vibration de la liaison O-H dans la molécule d'eau.

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. 32).

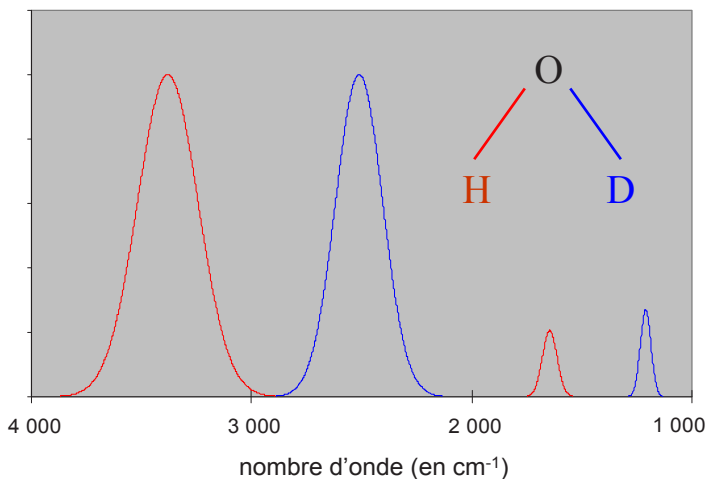


FIG. 32. Représentation schématique du spectre infrarouge dû aux liaisons O–H et O–D.

Les positions des pics sont généralement indiquées par un nombre d'onde (en  $\text{cm}^{-1}$ ), une fréquence (en THz) ou une longueur d'onde (en  $\mu\text{m}$ ) (fig. 33). Le pic dû au  $\text{D}_2\text{O}$  se situe à  $2\,504\text{ cm}^{-1}$  (75,07 THz ou  $3,994\ \mu\text{m}$ ).



FIG. 33. Comparaisons entre la longueur d'onde, l'absorbance et la fréquence.

Il convient de noter qu'au fur et à mesure que l'énergie augmente, la fréquence et le nombre d'onde sont plus élevés, 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. 34). 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 recombinaient, 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. 35).

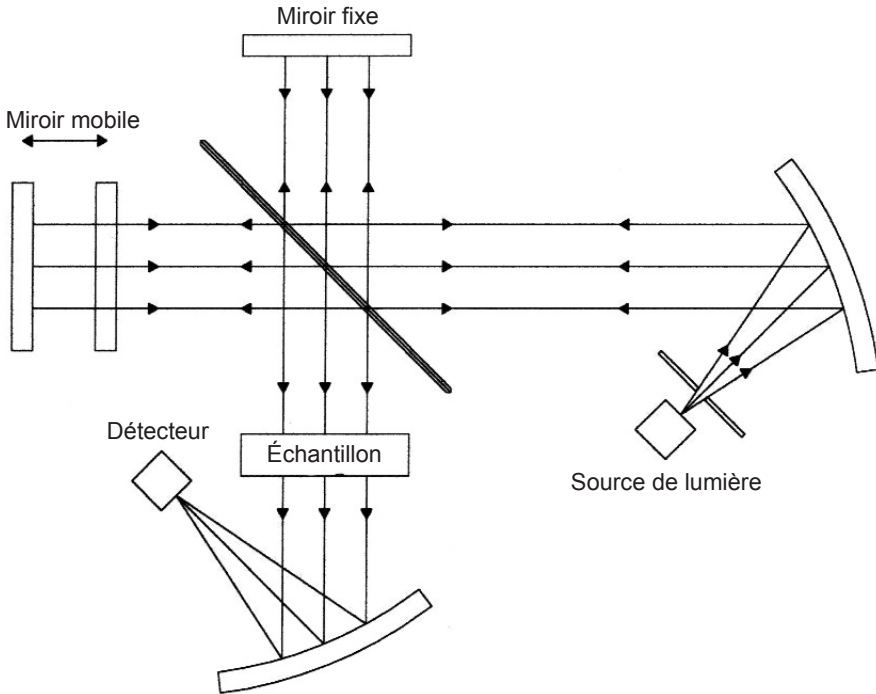


FIG. 34. Représentation schématique d'un spectromètre IRTF.

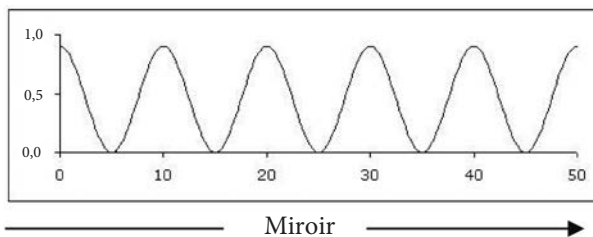


FIG. 35. Onde sinusoïdale formée par recombinaison d'un faisceau qui ne comporte qu'une seule longueur d'onde.

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. 36).

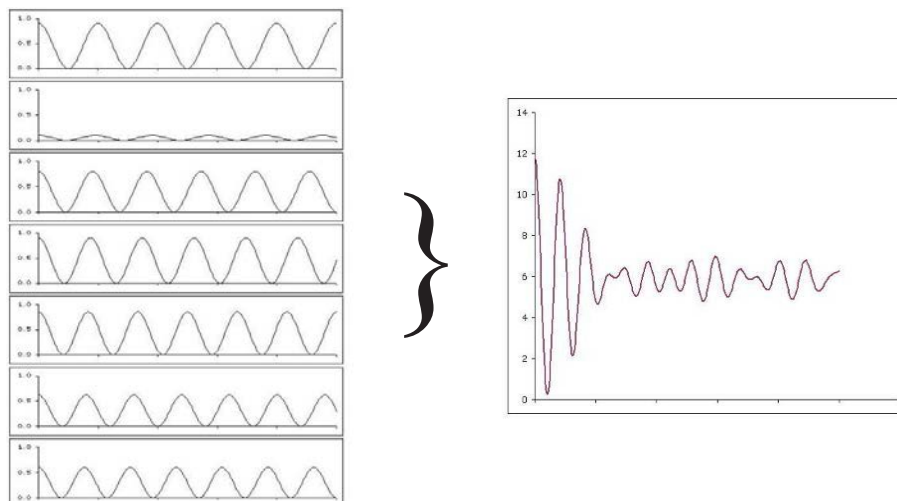


FIG. 36. Représentation d'un interférogramme formé par sept longueurs d'onde différentes.

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 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.

Étant donné que la teneur d'un échantillon en deutérium est très faible (fig. 37), environ 1 000 mg/kg (ppm), et que 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, qui 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 ( $l$ ) ».

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

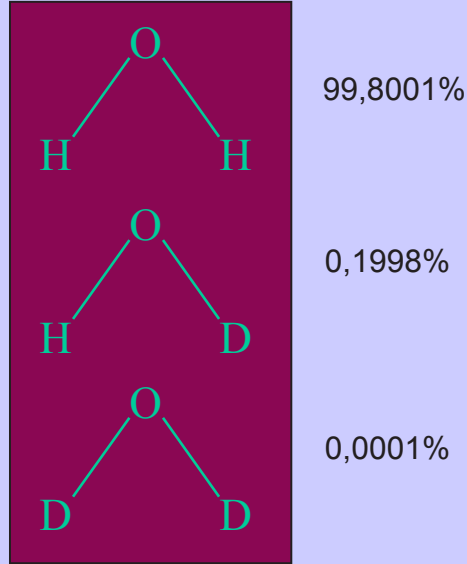


FIG. 37. Répartition du deutérium dans un échantillon d'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm) de  $^2\text{H}$ .

A est proportionnel à  $c \times l$

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

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

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

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. 38). En outre, le  $\text{CO}_2$  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. Cette difficulté peut être contournée 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  $2\,504\text{ cm}^{-1}$ . Le logiciel de l'appareil soustrait automatiquement l'absorbance de la référence à l'absorbance des échantillons enrichis (fig. 39). Lorsque l'on analyse des échantillons de salive, le prélèvement effectué avant administration de la dose sert de référence.

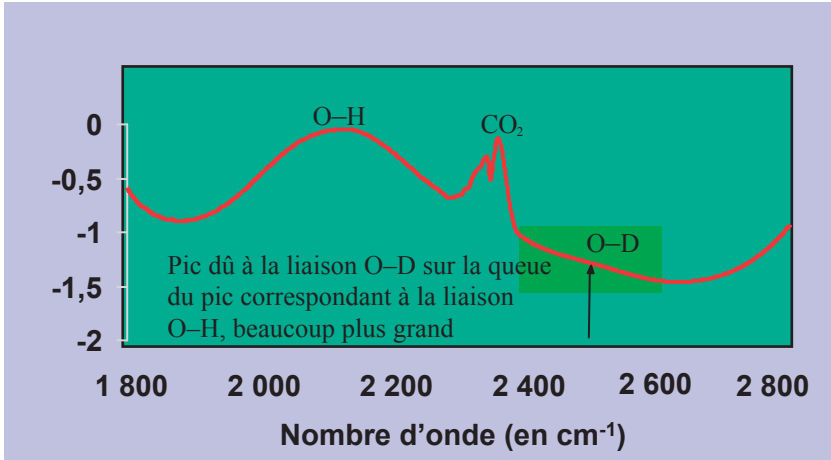


FIG. 38. Spectre d'absorption obtenu par IRTF pour de l'eau contenant 1 000 mg/kg (ppm) de  $\text{D}_2\text{O}$ .

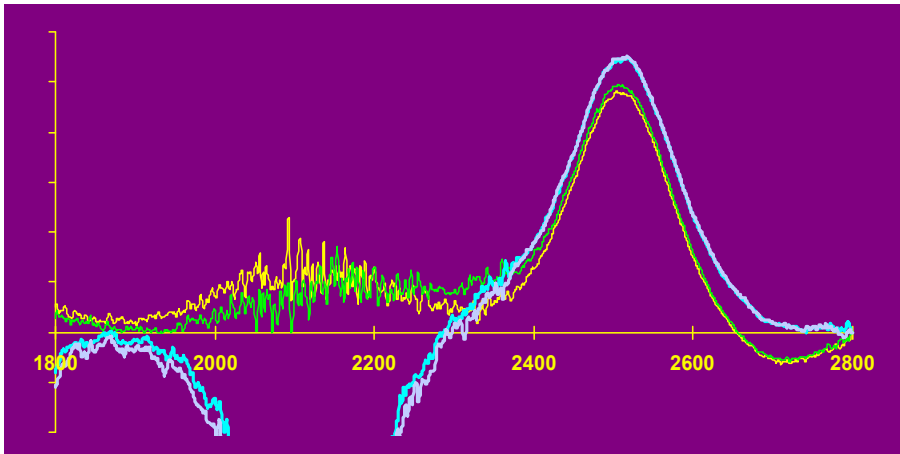


FIG. 39. Spectre IRTF obtenu après soustraction de la référence.



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 [16]. Cette méthode existe aujourd'hui sous forme d'un programme<sup>1</sup> 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.

## IV.2. UNITÉS

En spectroscopie IRTF, l'enrichissement est généralement exprimé sous forme de concentration de deutérium en 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.

Il convient de noter qu'en SMI, l'unité d'enrichissement est la teneur excédentaire en <sup>2</sup>H, également parfois appelée ppm de <sup>2</sup>H 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. Afin d'éviter cette confusion, il est déconseillé d'utiliser les ppm.

---

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



## GLOSSAIRE

**deutérium.** Isotope stable de l'hydrogène dont le symbole est  $^2\text{H}$ .

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

**échange isotopique.** Le deutérium ( $^2\text{H}$ ) peut se substituer à des atomes d'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) 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. L'enrichissement en deutérium de l'eau corporelle peut être mesuré par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). La référence est automatiquement soustraite lorsque l'on détermine l'enrichissement en deutérium par cette méthode.

**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  $^1\text{H}$  par un  $^2\text{H}$ . Ce processus est appelé équilibre.

**fractionnement.** L'expression « fractionnement isotopique » désigne 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. Pour plus d'informations sur le fractionnement, consulter l'appendice III.

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

Le noyau de l' <b>hydrogène</b> comporte un proton	$^1\text{H}$ (isotope stable)
Si le noyau contient un seul neutron, il s'agit de <b>deutérium</b>	$^2\text{H}$ (isotope stable)
Si le noyau contient deux neutrons, il s'agit de <b>tritium</b>	$^3\text{H}$ (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 une concentration appelée « abondance naturelle » de l'isotope. L'hydrogène compte deux isotopes stables : le  $^1\text{H}$  ou protium, son isotope stable le plus important, et le  $^2\text{H}$  ou deutérium, plus rare. Dans l'eau naturelle, environ 0,015 % des atomes d'hydrogène se trouvent sous forme de deutérium ( $^2\text{H}$ ).

**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 [21], mais son hydratation est plus élevée chez les enfants, après le premier trimestre de grossesse et dans certaines conditions cliniques.

**mesure de l'eau corporelle totale 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.** 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  ${}^3\text{H}$  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] WORLD HEALTH ORGANIZATION, The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding. A Systematic Review, WHO, Geneva (2002).
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION, Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding, Rep. Expert Consultation, WHO, Geneva (2002).
- [3] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, Stratégie mondiale pour l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant, OMS, Genève (2003).
- [4] SAVENIJE, O.E.M., BRAND, P.L.P., Accuracy and precision of test weighing to assess milk in newborn infants, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 91 (2006) F330–F332.
- [5] 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.
- [6] BUTTE, N.F., et al., Human-milk intake measure by administration of deuterium oxide to the mother: a comparison with the test-weighing technique, *Am. J. Clin. Nutr.* 47 (1988) 815–821.
- [7] HAISMA, H., et al., Breast milk and energy intake in exclusively, predominantly and partially breast-fed infants, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 1633–1642.
- [8] ALBERNAZ, E., et al., Lactation counselling increases breast-feeding duration but not breast milk intake as measured by isotopic methods, *J. Nutr.* 133 (2003) 205–210.
- [9] MOORE, S.E., PRENTICE, A.M., COWARD, W.A., Use of stable-isotope techniques to validate infant feeding practices reported by Bangladeshi women receiving breastfeeding counselling, *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (2007) 1075–1082.
- [10] ETTYANG, G.A., et al., Assessment of body composition and breast milk volume in lactating mothers in pastoral communities in Pokot, Kenya, using deuterium oxide, *Ann. Nutr. Metabol.* 49 (2003) 110–117.
- [11] CISSÉ, A.R., et al., Use of Fourier transformed infrared spectrophotometer (FTIR) for determination of breast milk output by the deuterium dilution method among Senegalese women, *Food Nutr. Bull.* 23 3 (2002) 138–141.
- [12] GALPIN, L., et al., Breast milk intake is not reduced more by the introduction of energy dense complementary food than by typical infant porridge, *J. Nutr.* 137 (2007) 1828–1833.
- [13] CISSÉ, A.S., et al., Stable isotope aided evaluation of Community Nutrition Program: effect of food supplementation schemes on maternal and infant nutritional status, *Food Nutr. Bull.* 23 3 (2002) 169–173.
- [14] SIAN, L., KREBS, N.F., WESTCOTT, J.E., Zinc homeostasis during lactation in a population with a low zinc intake, *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (2002) 99–103.
- [15] WELLS, J.C.K., communication personnelle.
- [16] JENNINGS, G., et al., The use of infrared spectrophotometry for measuring body water spaces, *Clin. Chem.* 45 7 (1999) 1077–1081.
- [17] SHIPLEY, R.A., CLARK, R.E., *Tracer Methods for in Vivo Kinetics. Theory and Applications*, Academic Press, New York and London (1972).
- [18] HOLLAND, B., WELCH, A.A., McCance and Widdowson's *The Composition of Foods*, 5th edn, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1991).

- [19] WELLS, J.C., DAVIES, P.S., Correction for environmental water influx in measurement of milk volume intake by deuterium turnover in infants, *Early Human Develop.* 41 (1995) 177–182.
- [20] JONES, P.J., LEATHERDALE, S.T., Stable isotopes in clinical research: Safety reaffirmed, *Clin. Sci.* 80 (1991) 277–280.
- [21] 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.



## PERSONNES AYANT CONTRIBUÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN

Bluck, L.	Conseil de la recherche médicale, Recherche sur la nutrition humaine (Royaume-Uni)
Butte, N.	École de médecine Baylor (États-Unis d'Amérique)
Davidsson, L.	Agence internationale de l'énergie atomique
Good, S.	École polytechnique fédérale de Zurich (Suisse)
Haisma, H.	Université des sciences appliquées Hanze (Pays-Bas)
Haskell, M.	Université de Californie à Davis (États-Unis d'Amérique)
Hills, A.P.	Université de technologie du Queensland (Australie)
Kabir, I.	Centre international de recherche sur les maladies diarrhéiques (Bangladesh)
Mokhtar, N.	Université Ibn Tofail (Maroc)
Mosetha, K.	Centre national de recherche sur la technologie alimentaire (Botswana)
Sarr Cissé, A.	Université Cheikh Anta Diop (Sénégal)
Slater, C.*	Consultant privé (Royaume-Uni)
Valencia Juillerat, M.	Centre de recherche sur l'alimentation et le développement (Mexique)
Wade, S.	Université Cheikh Anta Diop (Sénégal)
Wells, J.C.	Institut de la santé infantile (Royaume-Uni)

### Réunion de consultants

Vienne (Autriche) : 2-3 février 2006

### Réunion technique

Vienne (Autriche) : 19-21 novembre 2007

---

\* 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

Willstätterstrasse 15, 40549 Düsseldorf, ALLEMAGNE

Téléphone : +49 (0) 211 49 8740 • Fax : +49 (0) 211 49 87428

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 : +32 3 9210 7788

Courriel : [books@dadirect.com.au](mailto: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](mailto:jean.de.lannoy@euronet.be) • Site web : <http://www.jean-de-lannoy.be>

### CANADA

#### **Renouf Publishing Co. Ltd.**

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

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

Courriel : [order@renoufbooks.com](mailto: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](mailto: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 • Fax : +34 917 43 4023

Courriel : [compras@diazdesantos.es](mailto: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](mailto:orders@bernan.com) • Site web : <http://www.bernan.com>

#### **Renouf Publishing Co. Ltd.**

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

Téléphone : +1 888 551 7470 • Fax : +1 888 551 7471

Courriel : [orders@renoufbooks.com](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:livres@appeldulivre.fr) • Site web : <http://www.appeldulivre.fr>

## HONGRIE

### **Librotrade Ltd., Book Import**

PF 126, 1656 Budapest, HONGRIE

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

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

## INDE

### **Allied Publishers**

1<sup>st</sup> Floor, Dubash House, 15, J.N. Heredi Marg

Ballard Estate, Mumbai 400001, INDE

Téléphone : +91 22 2261 7926/27 • Fax : +91 22 2261 7928

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

### **Bookwell**

3/79 Nirankari, Delhi 110009, INDE

Téléphone : +91 11 2760 1283/4536

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>

## 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>

## 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](http://www.mladinska.com/cankarjeva_zalozba)

## NATIONS UNIES (ONU)

300 East 42<sup>nd</sup> 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>







La présente publication a été réalisée par un groupe international d'experts et fait partie intégrante des efforts engagés par l'AIEA pour favoriser les transferts de technologie et de connaissances concernant une technique faisant appel à un isotope stable (non radioactif) – la technique de la dose d'eau deutérée administrée à la mère – au bénéfice des nutritionnistes, des chimistes analystes et d'autres professionnels. Elle donne des informations sur le cadre théorique et l'application pratique de cette méthode d'évaluation de la consommation de lait maternel chez les bébés nourris au sein.

## COLLECTION SANTÉ HUMAINE DE L'AIEA

AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE  
VIENNE

ISBN 978-92-0-207914-4

ISSN 2075-3772