

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Centre d'investigation clinique - CIC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Médecine

Présentée par :
Arnaud De Luca

Évaluation clinique et biologique de l'état nutritionnel de l'enfant

Directeur(s) de Thèse :
Régis Hankard

Soutenue le 08 décembre 2014 devant le jury

Jury :

Président	Pierre Ingrand	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	Frédéric Gottrand	Professeur des Universités, Université de Lille 2
Rapporteur	Christian Andrès	Professeur des Universités, Université de Tours
Membre	Régis Hankard	Professeur des Universités, Université de Tours
Membre	Samy Hadjadj	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Pierre Fafournoux	Directeur de recherche, Université de Clermont-Ferrand 1
Membre	Richard J. Robins	Directeur de recherche CNRS, Université de Nantes
Membre	Jean-François Dumas	Maître de conférences, Université de Tours

Pour citer cette thèse :

Arnaud De Luca. *Évaluation clinique et biologique de l'état nutritionnel de l'enfant* [En ligne]. Thèse Médecine. Poitiers : Université de Poitiers, 2014. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : n°524 Bio-santé du PRES Limousin-Poitou-Charentes

Secteur de Recherche : Médecine

Présentée par

Arnaud DE LUCA

Evaluation clinique et biologique de l'état nutritionnel de l'enfant

Directeur de Thèse

Professeur Régis HANKARD

Soutenue le 8 décembre 2014

devant la Commission d'Examen

JURY

Professeur Christian ANDRES	Rapporteur
Professeur Frédéric GOTTRAND	Rapporteur
Docteur Jean-François DUMAS	Examineur
Docteur Pierre FAFOURNOUX	Examineur
Professeur Samy HADJADJ	Examineur
Professeur Pierre INGRAND	Examineur
Docteur Richard ROBINS	Examineur
Professeur Régis HANKARD	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A Elodie et Augustine et ... pour votre soutien et votre patience

A ma famille et ma belle-famille, merci de votre présence

Au Pr Régis HANKARD pour l'encadrement de mes travaux, votre enthousiasme et votre soutien. Merci de tout ce que vous faites pour moi

Aux Pr Christian ANDRES, Pr Frédéric GOTTRAND et Dr Jean-François DUMAS, votre acceptation d'être membre de jury de ma thèse est pour moi un grand honneur

Aux Dr Pierre FAFOURNOUX, Pr Samy HADJADJ, Pr Pierre INGRAND et Dr Richard ROBINS, vous me faites l'honneur d'accepter de juger mon travail, je suis heureux de nos collaborations fructueuses passées et à venir

A l'équipe Inserm CIC1402, au Pr François GUILHOT-GAUDEFFROY, au Dr Pierre-Jean SAULNIER, à Elodie ROGEON qui m'ont accueilli

A l'équipe CNRS UMR 6230, au Dr Illa TEA, à Ingrid ANTREAUME, à Anne-Marie BROSSARD, à Maxime et Kévin

A l'équipe INRA UMR 1019, au Dr Céline JOUSSE

A l'équipe montréalaise du Dr Emile LEVY, merci de votre accueil chaleureux

A Karine BERNARDO, pour ton aide pour les expérimentations animales

Aux organismes qui m'ont financé pour réaliser ce travail : le GIRCI GO, la SFNEP, Nutricia Advanced Medical Nutrition, ADAIRC, Nestlé, Fresenius-Kabi

A mes amis

Table des matières

INTRODUCTION	6
1. LE METABOLISME PROTEIQUE ET SES METHODES D'EVALUATION	8
1.1 Le métabolisme protéique	8
1.1.1 Pools protéiques et d'acides aminés	9
1.1.2 Synthèse et protéolyse	10
1.1.2.1 Synthèse protéique	10
1.1.2.2 Protéolyse des AA	11
1.1.2.3 Echanges inter-organes en phase post-absorptive et en phase nourrie	15
1.1.2.4 Modulation du métabolisme protéique	17
1.1.2.5 Produits terminaux de l'azote	21
1.2 Méthodes cliniques et de recherche pour l'évaluation du métabolisme protéique	24
1.2.1 Bilan azoté	24
1.2.2 Méthodes invasives de mesure du renouvellement par traceurs	25
1.2.2.1 Méthode corps entier reposant sur la cinétique d'un AA marqué	25
1.2.2.2 Méthode des produits terminaux	29
1.2.2.3 Mesure de la synthèse protéique au niveau des tissus par incorporation des précurseurs	30
1.2.3 Approche par organes : mesure des différences artério-veineuses	31
1.2.4 Chromatographie des acides aminés	31
1.2.5 Mesure de la protéolyse	32
1.3 Utilisation de traceurs non radioactifs en abondance naturelle	33
1.3.1 Les isotopes	33
1.3.2 Abondance isotopique naturelle en ^{15}N et ^{13}C	34
1.3.2.1 AIN en ^{15}N	34
1.3.2.2 AIN en ^{13}C	36
1.3.3 Mesure de l'effet isotopique comme bio-marqueur métabolique	37
1.3.3.1 Au niveau moléculaire	38
1.3.3.2 Les études animales	41
1.3.3.3 En recherche clinique	43
1.3.4 Spectrométrie de masse de rapports isotopiques	46
1.3.5 Possibilités de prélèvements	49
2. TRAVAUX PUBLIES ET SOUMIS	53
2.1 Etudes de l'abondance isotopique naturelle en ^{15}N : bio-marqueur potentiel de l'état nutritionnel, et de la croissance chez l'enfant allaité	53
2.1.1 Etude EDEN portant sur le nouveau-né, reflet de la période fœtale (Publiée)	53

2.1.2 Etude en pathologie chez le diabétique de type 2 adulte avec ou sans néphropathie (Acceptée)	97
2.1.3 Etude REGULACT portant sur le nouveau-né et la composition du lait maternel (Soumise)	124
2.1.4 Résultats préliminaires chez la souris	150
2.2 Phénotype clinique de la malnutrition protéino-énergétique	158
2.2.1 Procédure diagnostique	159
2.2.2 Enquête e-Pinut 2010 (Publiée)	164
2.2.3 Enquête e-Pinut 2011 (Publiée)	168
2.2.4 Enquête e-Pinut 2012 (Soumise)	189
2.2.5 Syndrome du Cri-du-chat (Soumise)	208
3. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	222
CONCLUSION	229
BIBLIOGRAPHIE	230
LISTE DES FIGURES	244
LISTE DES TABLEAUX	246
ABBREVIATIONS	247
RESUME	248
ABSTRACT	249

INTRODUCTION

L'état nutritionnel normal est une situation métabolique d'équilibre entre les besoins et les apports en protéines, en énergie, vitamines, minéraux, oligo-éléments et eau. La particularité de l'enfant est d'être un organisme en croissance, nécessitant donc de prendre en compte ce paramètre dans l'évaluation des besoins nutritionnels. La malnutrition protéino-énergétique (MPE) est un état pathologique qui résulte d'une inadéquation entre les besoins et les apports protéino-énergétiques. Elle aboutit à une perte de la masse métabolique active ayant des conséquences fonctionnelles délétères dont un retard de croissance pondérale puis staturale chez l'enfant.

Le Comité de Nutrition de la Société Française de Pédiatrie a publié en 2012 des recommandations pour l'évaluation clinique de l'état nutritionnel qui permettent de donner des bases objectives au diagnostic de MPE (1). La première étape de son diagnostic est la recherche d'une insuffisance pondérale qui est définie par un indice de masse corporelle (IMC) inférieur au 3^{ème} percentile par rapport aux courbes de référence (2). Le seul calcul d'un index quel qu'il soit est insuffisant. La suite de la démarche nécessite un examen médical et une enquête anamnestique permettant de faire le diagnostic de MPE.

Le diagnostic de MPE est donc clinique, ce qui nécessite des moyens humains et thérapeutiques adaptés, afin d'obtenir une démarche diagnostique plus rigoureuse, préciser le diagnostic étiologique et intégrer une stratégie nutritionnelle dans la prise en charge globale de soins. Cette organisation n'est actuellement pas toujours possible dans les services hospitaliers. La MPE reste insuffisamment recherchée en pratique clinique, elle est donc sous-diagnostiquée et sous-traitée (3). Il apparaît donc nécessaire de promouvoir l'évaluation de l'état nutritionnel et de chercher des bio-marqueurs de dénutrition pertinents pour le diagnostic mais aussi pour guider la prise en charge nutritionnelle.

Le muscle joue un rôle central dans le métabolisme des acides aminés (AA) et est un marqueur pronostique de la MPE. La masse musculaire est un déterminant majeur de santé (4). Elle peut être estimée cliniquement par la mesure du périmètre brachial, qui permet aussi une estimation de la composition corporelle lorsqu'il est associé à la mesure des plis cutanés par pince anthropométrique ou par échographie (5). Les techniques de perfusion de substrats marqués par des isotopes stables permettent d'évaluer le métabolisme protéique en prenant en compte la croissance qui caractérise l'enfant (6,7). Elles sont coûteuses et de mise en place complexe, donc réservées au domaine de la recherche. Il manque un marqueur biologique simple et utilisable en pratique clinique quotidienne.

Pour cette raison nous nous sommes tournés vers la mesure de l'abondance isotopique naturelle (AIN) en azote 15 (^{15}N) et ses variations. L'azote 15 est un isotope stable non radioactif de l'azote, présent en faibles quantités dans les tissus à l'état naturel. Cette mesure est peu (sang) ou non invasive (cheveux, urines), de réalisation simple et peu coûteuse, permettant d'envisager des applications cliniques, ce qui renforce l'intérêt de développer ce marqueur. Cette approche isotopique est innovante car encore peu développée en clinique humaine.

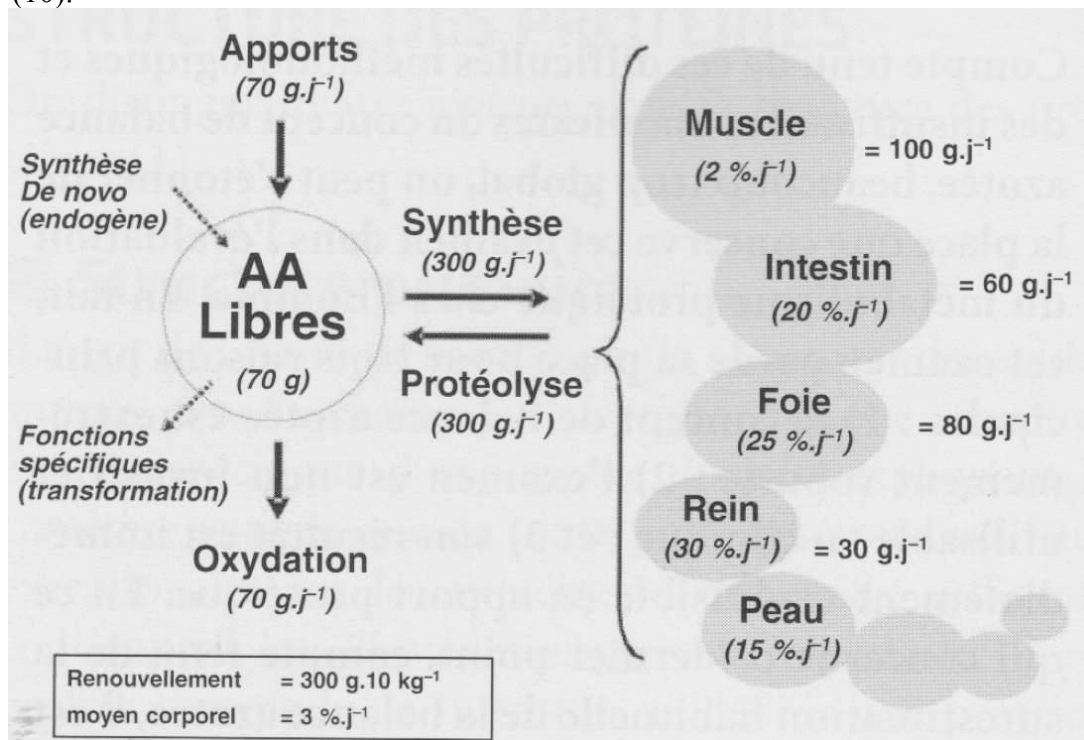
L'objet de la première partie de ce travail est d'étudier l'AIN en ^{15}N dans l'azote total de cheveux chez l'homme sain et malade et dans les poils et tissus d'animaux soumis à un régime appauvri en protéines. La deuxième partie porte sur l'évaluation clinique de l'état nutritionnel chez l'enfant hospitalisé au travers d'enquêtes épidémiologiques annuelles. Enfin, nous évoquerons les travaux en cours et les perspectives.

1. LE METABOLISME PROTEIQUE ET SES METHODES D'EVALUATION

1.1 Le métabolisme protéique

Le contenu protéique corporel total conditionne la morbidité et la mortalité dans les situations aiguës graves et en cas de MPE. Chez l'enfant, toute maladie chronique s'accompagne d'une restriction de croissance (limitation de l'accrétion protéique). Un infléchissement pondéral puis statural suggère un mécanisme nutritionnel devant une cassure de la croissance. Le contenu protéique est en renouvellement permanent. Deux cent cinquante à 300 grammes de protéines sont détruites et re-synthétisées tous les jours chez l'homme adulte (Figure 1). L'alimentation sert à couvrir les pertes irréversibles de protéines. Chez l'enfant, la synthèse est supérieure à la dégradation puisqu'il s'agit d'un organisme en croissance.

Figure 1 : Schématisation du métabolisme protéique corps entier. D'après Attaix et Boirie (10).



1.1.1 Pools protéiques et d'acides aminés

Les protéines sont constituées d'une succession d'acides aminés (AA) (20 différents) dont la formule brute est $\text{NH}_2\text{-R-COOH}$. Leurs fonctions sont très variées dans l'organisme, allant de la structure de la cellule, de la régulation cellulaire, de la signalisation, aux enzymes, au transport, à la défense immunitaire et au muscle. Elles représentent environ 15% du poids corporel chez l'adulte (~11kg), entre 13 et 17% chez l'enfant selon l'âge (8). On considère que 1g d'azote correspond à 6,25g de protéines en moyenne. Le muscle est l'organe qui contient le plus de protéines (5 kg chez l'adulte) suivi par le foie (320g) et l'intestin (300g).

Le pool précurseur de synthèse protéique correspond aux AA libres. Les AA libres représentent une faible quantité des AA totaux (environ 2%) et sont essentiellement situés en intracellulaire (9). Ce pool provient des AA plasmatiques, de la dégradation cellulaire des protéines ou d'une synthèse endogène pour les AA non indispensables. Ils sont utilisés notamment pour les échanges azotés entre organes et pour la synthèse des protéines.

Chez le sujet normal, les AA entrant dans le métabolisme protéique proviennent pour environ 20% de l'apport nutritionnel (apport exogène), et pour 80% du pool azoté corporel (source endogène) (Figure 1). La source endogène provient des protéines corporelles dégradées en AA dont la fonction amine est conservée (transamination) pour constituer un nouvel AA disponible pour la synthèse protéique. Les vitesses de renouvellement varient entre les différents organes, rapide pour le rein, le foie, l'intestin et lent pour le muscle.

Les besoins en protéines varient selon l'âge et le sexe et sont plus importants en phase de croissance rapide. Les Apports Nutritionnels Conseillés en protéines sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Apports Nutritionnels Conseillés en protéines chez l'enfant et l'adulte selon l'âge (11).

Age	Protéines (g/kg/j)
6-12 mois	1,25
1-3 ans	1
4-6 ans	0,9
7-9 ans	0,9
10-12 ans	0,85 (G) ; 0,9 (F)
13-15 ans	0,85 (G) ; 0,9 (F)
16-19 ans	0,83 (G) ; 0,8 (F)
Adulte	0,8
Personne âgée (>75 ans)	1
Femme enceinte / allaitante	0,9 / 1,4

G : garçon, F : fille

1.1.2 Synthèse et protéolyse

1.1.2.1 Synthèse protéique

La synthèse protéique comprend la transcription d'un gène (ADN nucléaire) codé à partir des 4 bases (adénine, cytosine, guanine et thymidine), en ARN messager (ARNm) grâce à une ARN polymérase, où seuls les exons codent pour la protéine. Cet ARNm migre vers le cytoplasme de la cellule où il se fixe aux ribosomes. La traduction de l'ARNm en séquence d'AA s'effectue par lecture de codons de 3 bases, grâce aux ARN de transfert complémentaires amenant les AA. Les AA sont reliés entre eux par des liaisons peptidiques aboutissant à la formation de la protéine. Cette protéine de structure primaire subit des modifications de conformation en hélice α ou en feuillet β (structure secondaire), et post-

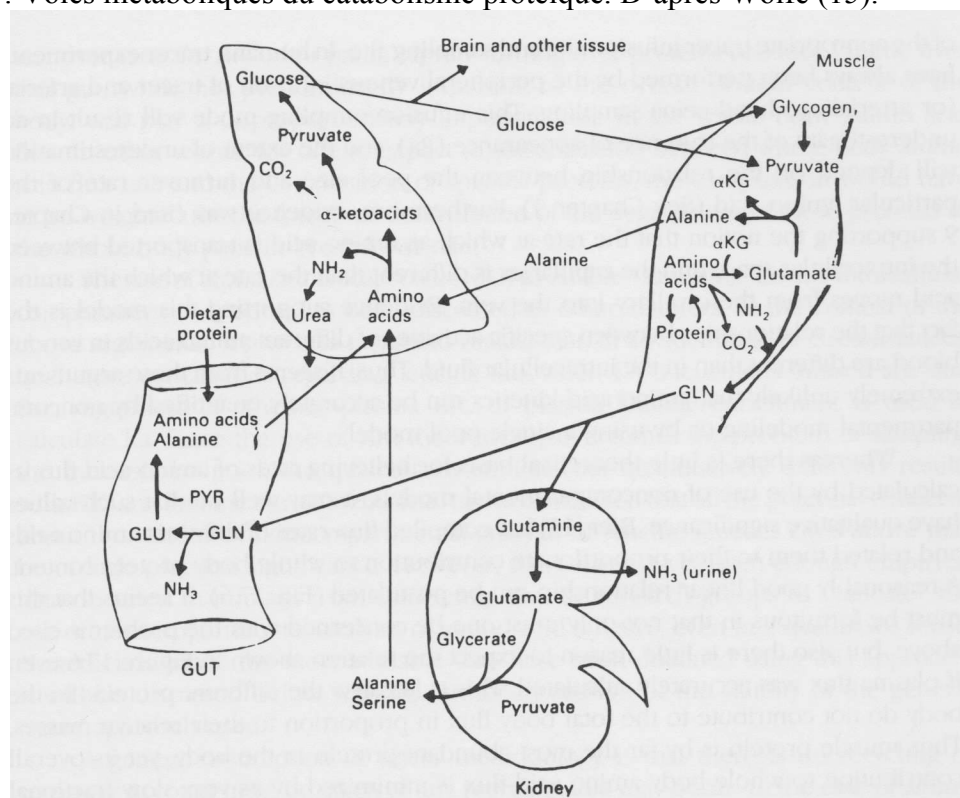
traductionnelles (glycosylation, hydroxylation, clivage...) notamment dans l'appareil de Golgi. Le repliement dans l'espace de la protéine en fonction des propriétés des AA correspond à sa structure tertiaire. Son association en polymères constitue la structure quaternaire. La fonction de la protéine découle complètement de sa structure et de son adressage. Chaque étape consomme de l'ATP et/ou du GTP, ce qui aboutit à un coût énergétique élevé d'environ 1 kcal/g de protéine synthétisée (12). Cela représente 15-20% de la dépense énergétique totale chez l'homme adulte (13).

Le foie a une fonction centrale dans le métabolisme protéique. Il représente 10% du renouvellement protéique corporel total. Il synthétise la majorité des protéines circulantes, la transformation des AA en glucose (néoglucogenèse) et l'élimination de l'azote excédentaire (uréogenèse).

1.1.2.2 Protéolyse des AA

La protéolyse intervient dans le renouvellement cellulaire, l'élimination des protéines en excès ou anormales. Le muscle contient la moitié des protéines corporelles et représente environ 20% du renouvellement protéique total. Les AA libérés par le muscle en période post-absorptive sont issus de réactions d'inter-conversion des AA (Figure 2). La navette azotée de l'organisme est la glutamine qui intervient dans le transfert azoté, la néoglucogenèse, l'ammoniogenèse et le métabolisme acide-base (14). L'alanine intervient dans la néoglucogenèse (cycle de Cahill). L'azote libéré par la protéolyse est donc réintégré dans la synthèse de nouvelles protéines ou composés azotés, excrété de façon irréversible sous forme d'urée ou intégré dans le métabolisme intermédiaire.

Figure 2 : Voies métaboliques du catabolisme protéique. D'après Wolfe (15).



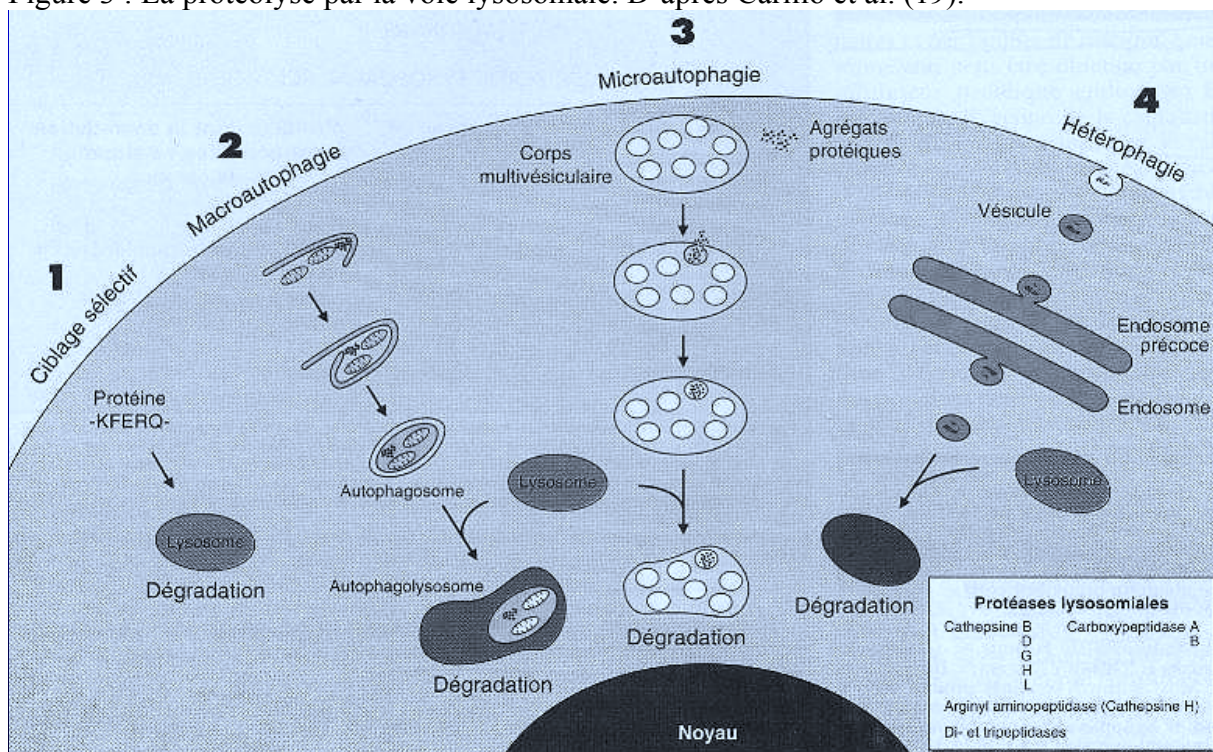
La transamination correspond à une interconversion entre une paire d'AA et une paire de cétoacides. L'alanine aminotransférase et la glutamate aminotransférase sont 2 transaminases importantes, catalysant le transfert d'azote de la plupart des AA pour former du pyruvate provenant de l'alanine et du glutamate provenant de l' α -cétooglutarate. L'aspartate aminotransférase permet la formation de glutamate et d'oxaloacétate participant au cycle de Krebs et alimentant le cycle de l'urée. La lysine, la proline, l'hydroxyproline et la thréonine ne participent pas aux réactions de transamination.

Dans le foie et le rein, l'azote peut être également transféré par désamination oxydative, issu d'une déshydrogénation par une flavine adénine nucléotide (FAD) formant un acide imine intermédiaire et du FADH₂. L'addition d'eau permet la dégradation en α -cétoacide correspondant et en ammoniac. Le FADH₂ réagit avec l'oxygène pour reformer du FAD et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dégradé par la catalase.

La protéolyse relève de 3 mécanismes différents dont les déterminants d'engagement sont mal connus :

1) la voie lysosomale : les lysosomes sont des structures intracellulaires présents surtout dans le foie et le rein, contenant des cathepsines (enzymes protéolytiques). Ils forment des vacuoles acides autour des protéines à dégrader (macroautophagie), des agrégats cellulaires (microautophagie) ou des protéines extracellulaires internalisées et après passage dans l'endosome (hétérophagie) (Figure 3) (16). C'est une voie non sélective mais la présence d'une séquence lysine-phénylalanine-glutamate-arginine-glutamine (KFERQ), reconnue par des heat shock proteins, semble la favoriser (17). Cette voie semble prédominante dans le foie et paraît peu intervenir dans le muscle même en situation de catabolisme (18).

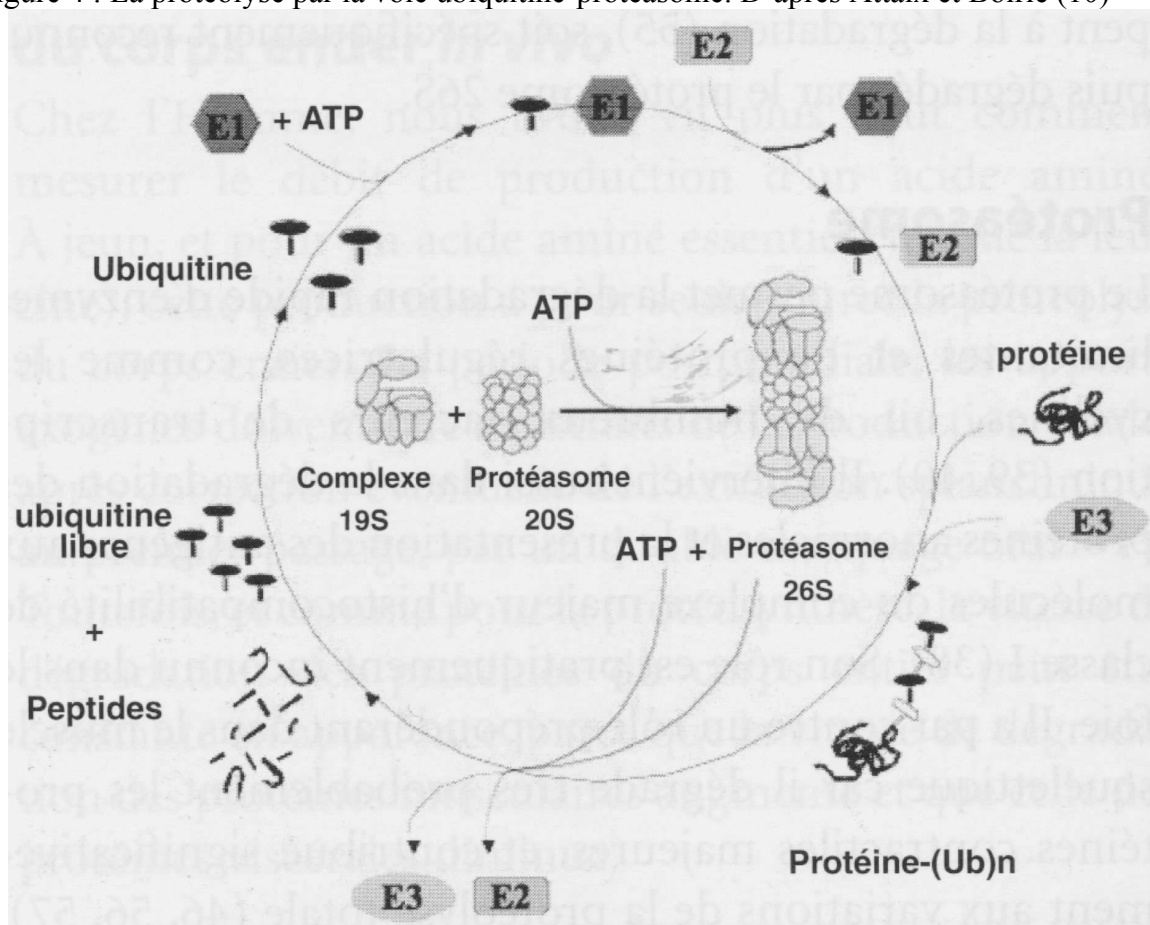
Figure 3 : La protéolyse par la voie lysosomale. D'après Carillo et al. (19).



2) la voie ubiquitine-protéasome : cette voie fait intervenir de nombreuses protéines (Figure 4) (20). Plusieurs molécules d'ubiquitine se lient avec les protéines à dégrader, permettant de

les marquer (poly-ubiquitination). Cette fixation se fait grâce à des liaisons covalentes entre le groupement COOH terminal de l'ubiquitine et le groupement NH₂ d'un résidu lysine de la protéine à dégrader (21). L'ubiquitination requiert plusieurs enzymes : l'ubiquitin activating enzyme (E1) qui active l'ubiquitine et nécessite de l'ATP, puis la liaison de l'ubiquitine à la protéine est catalysée par une ubiquitin conjugating enzyme (E2) de manière directe ou grâce à une 3^{ème} enzyme, une ubiquitin protein ligase (E3).

Figure 4 : La protéolyse par la voie ubiquitine-protéasome. D'après Attaix et Boirie (10)



Légende : E1 : ubiquitin activating enzyme ; E2 : ubiquitin conjugating enzyme ; E3 : ubiquitin protein ligase.

Des enzymes de déubiquitination permettent d'éviter la protéolyse avant la reconnaissance par le protéasome (22). L'AA en position N-terminale jouerait un rôle important dans la

reconnaissance par une E3, certains sont dits stabilisant (méthionine, sérine), d'autres déstabilisant (arginine, lysine, histidine) pouvant influencer sur la demi-vie de la protéine (23). Certains motifs polypeptidiques peuvent aussi entraîner une ubiquitination lorsqu'ils sont intégrés à une protéine (24). Le protéasome 26S, composé d'une unité régulatrice (19S) et d'une unité catalytique (20S), reconnaît les protéines marquées et les dégrade. L'unité catalytique possède des activités peptidasiques et protéolytiques. Le protéasome permet de dégrader les molécules de signalisation (protéines régulatrices, facteurs de transcription) et les molécules anormales. Cette voie semble prédominante dans le muscle notamment pour la dégradation des myosines et de l'actine.

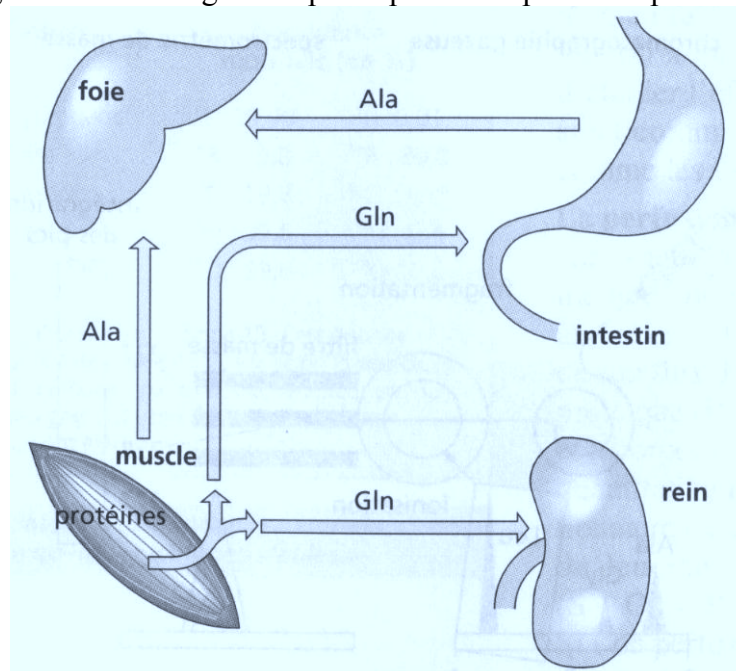
3) la voie calcium-dépendante : elle repose sur la calpaïne m et la calpaïne μ , 2 enzymes protéolytiques membranaires ou cytosoliques activées par les flux calciques et la calpastatine (inhibiteur endogène). La séquence proline-glutamate-sérine-thréonine (PEST) et l'ubiquitination pourraient favoriser son activation (25). Cette voie paraît mineure et semble impliquée notamment pour les protéines de demi-vie courte. Elle interviendrait essentiellement dans le muscle et son activation semble inconstante dans le catabolisme (18). Une 4^{ème} voie, celle des caspases, semble impliquée essentiellement dans l'apoptose. Les différents systèmes pourraient être interconnectés et travailler en synergie.

1.1.2.3 Echanges inter-organes en phase post-absorptive et en phase nourrie

La phase post-absorptive est une phase catabolique protéique nette. La source des AA est alors le muscle squelettique, permettant de fournir les AA aux organes, préférentiellement le foie et l'intestin (Figure 5). Le muscle est en déficit azoté, par ralentissement de la synthèse et augmentation de la protéolyse. Les AA formés sont pour 60% de l'alanine et de la glutamine. L'alanine est néosynthétisée dans le muscle après transamination à partir d'AA ramifiés puis

est libérée dans la circulation et rejoint le foie pour subir une nouvelle transamination. Le pyruvate ainsi formé permet la néoglucogenèse (cycle alanine-glucose) (26). La glutamine est captée en priorité par l'intestin principalement pour couvrir ses besoins énergétiques mais aussi pour la synthèse des acides nucléiques, pour la synthèse du glutathion (défense antioxydante), de citrulline et d'arginine (13). Elle peut être captée par le rein (5-10%) en grande partie à destination de l'ammoniogenèse mais aussi par le foie où elle participe à l'uréogénèse en tant que donneur d'azote. La proline et la glycine participent également à la néoglucogenèse.

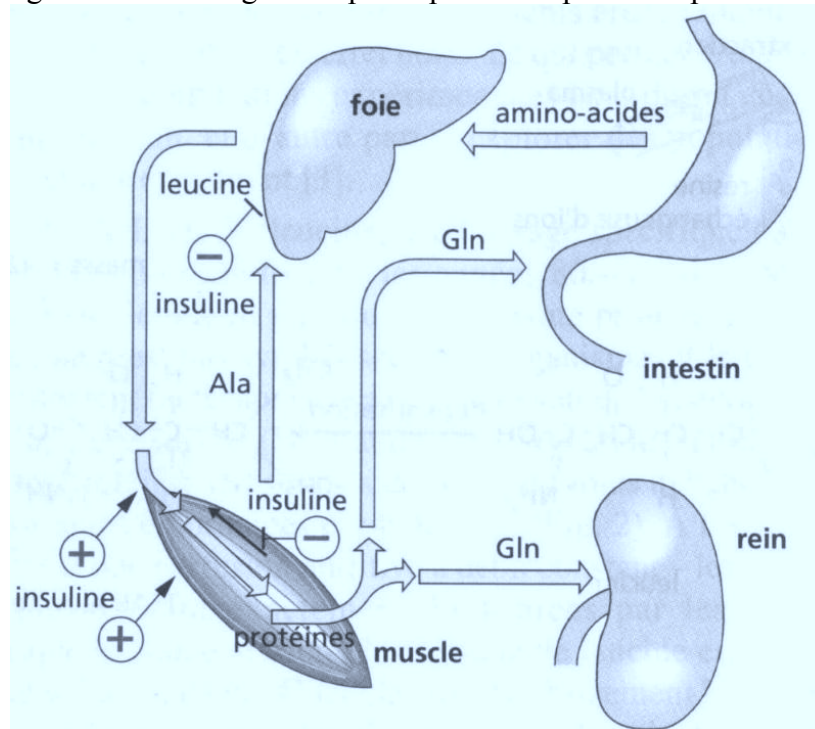
Figure 5 : Echange d'AA inter-organe en phase post-absorptive. D'après Darmaun (27).



A la phase nourrie, les AA sont absorbés et récupérés par le territoire splanchnique (Figure 6). Une partie des AA va être utilisée pour la synthèse protéique hépatique, une autre pour l'uréogénèse. La dernière partie va être relarguée dans la circulation générale en proportion variable selon l'AA, riche en AA ramifiés indispensables, à destination essentiellement du

muscle squelettique afin de reconstituer son stock d'AA libres (28). On observe alors une augmentation de la synthèse et une diminution de la dégradation protéique (29).

Figure 6 : Echange d'AA inter-organe en phase post-absorptive. D'après Darmaun (27).



1.1.2.4 Modulation du métabolisme protéique

Le renouvellement protéique chez l'enfant est plus élevé, en lien avec la croissance, de l'ordre de 8g/kg/j chez le nouveau-né pour 4g/kg/j chez l'adulte (30). Ce niveau élevé de renouvellement protéique permet une meilleure adaptation aux besoins. Le renouvellement est abaissé dans la MPE de 10 à 30% pour limiter le catabolisme protéique à des fins de néoglucogenèse et son impact sur la masse et la fonction musculaires (31).

Les nutriments ont un rôle influent dans la modulation du métabolisme protéique. Le glucose a un effet de freinage de la dégradation donc d'épargne protéique, probablement lié à l'insuline (32). Les triglycérides à chaîne longue auraient un effet faible de diminution

d'oxydation de la leucine par inhibition de la branched chain keto acid dehydrogenase (BCKDH) (29). La perfusion de triglycérides à chaîne moyenne permet de réduire d'un tiers la concentration d'AA plasmatique, montrant ainsi un effet similaire (33). Les triglycérides à chaîne courte réduisent l'oxydation de moitié (34). L'oxydation est inhibée par ces deux nutriments en lien avec la compétition des substrats (35).

Un apport d'AA intraveineux entraîne une augmentation de la synthèse protéique et de l'oxydation et une diminution de la protéolyse sans variation de l'insulinémie (36). En cas d'apports élevés en protéines, on peut observer une augmentation de la synthèse et de l'oxydation. Plus les apports sont élevés, plus l'oxydation devient prépondérante, diminuant ainsi le rendement du gain protéique (29). Une augmentation importante de l'aminoacidémie (de l'ordre de 100%) aurait un effet favorisant la synthèse alors qu'une augmentation modérée n'entraînerait qu'une diminution de la protéolyse et une augmentation de l'oxydation (37).

Certains AA peuvent influencer le renouvellement protéique comme la glutamine et la leucine. La glutamine inhibe la protéolyse musculaire et hépatique, probablement par modification des échanges ioniques (38). En situation de stress, alors que l'utilisation de la glutamine est accrue, un apport spécifique de glutamine permet d'améliorer le bilan azoté (39). La glutamine est ainsi considérée comme un AA conditionnellement indispensable. La leucine inhibe la protéolyse musculaire et hépatique (40). Elle stimule également la synthèse protéique musculaire via mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (41).

Le métabolisme protéique subit aussi une influence hormonale. Comme cité plus haut, l'insuline a un effet anabolique protéique par freinage de la protéolyse. Elle favorise également le transport intracellulaire des AA neutres en stimulant le système sodium-dépendant, comme les glucocorticoïdes et le glucagon (42). L'hormone de croissance (GH) et l'insulin-like growth factor (IGF1) stimulent spécifiquement la synthèse protéique et une

inhibition de la protéolyse (43). Les androgènes, notamment la testostérone, stimulent la synthèse protéique de façon importante (43). A l'inverse, les glucocorticoïdes ont un effet catabolique en augmentant à la fois la dégradation protéique donc leur libération musculaire et l'oxydation, stimulant l'uréogénèse (44). Le glucagon a un effet catabolique faible par augmentation de la captation hépatique des AA (donc diminution de leur concentration plasmatique), associé à une augmentation de la néoglucogénèse (45). Les hormones thyroïdiennes sont anabolisantes en euthyroïdie mais responsables d'une protéolyse en cas d'hyperthyroïdie. Les catécholamines ont un effet anabolisant protéique peu important par augmentation de la synthèse et diminution de la protéolyse (46), l'adrénaline stimule la consommation de glutamine par le rein (47). En situation inflammatoire d'agression, l'augmentation de cytokines comme l'interleukine 6 (IL6) et le Tumor necrosis factor (TNF) stimule la synthèse des protéines de l'inflammation et majore l'effet du glucagon dans le foie et du cortisol dans le muscle, aboutissant à un catabolisme protéique par orientation vers la néoglucogénèse et la dégradation protéique musculaire (48). Ces effets peuvent être synergiques ou atténués par l'implication de plusieurs hormones lors d'un même stimulus.

En situation de stress, le catabolisme musculaire est important avec une augmentation des besoins en glutamine. La production musculaire de glutamine et d'alanine augmente à destination notamment de l'intestin grêle où la glutamine est convertie en alanine pour alimenter la néoglucogénèse. La concentration des AA ramifiés circulants augmente par diminution de captation par le foie. Leur dégradation débute par une transamination dans le cytosol des cellules musculaires, réversible, conduisant à la formation du cétoacide correspondant puis les AA ramifiés sont décarboxylés de manière irréversible dans la mitochondrie. Cette réaction est catalysée par un complexe déshydrogénase qui est régulé par

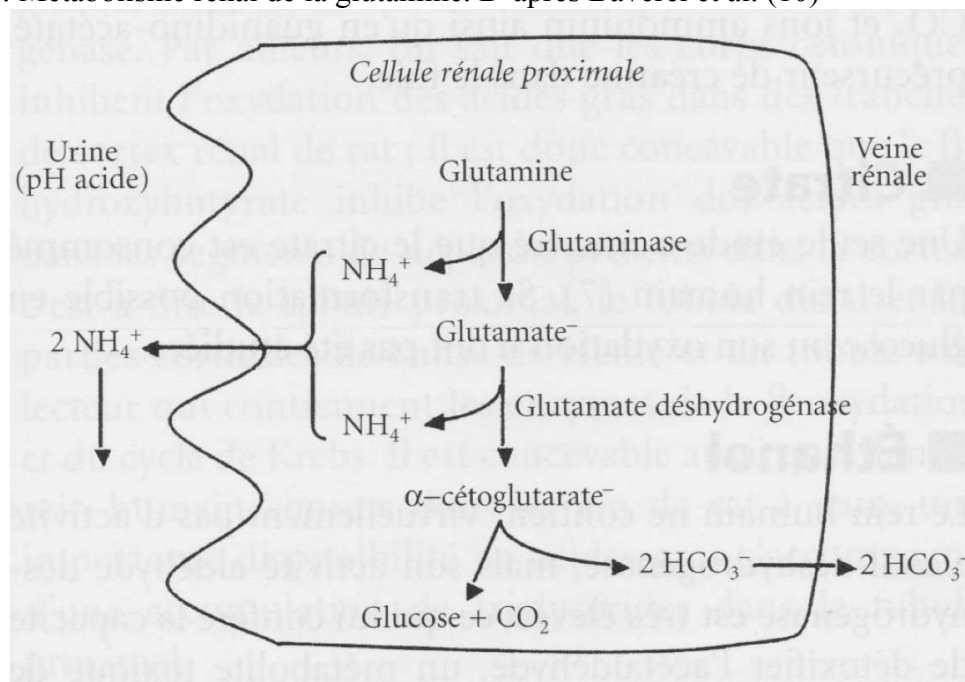
une phosphorylation/déphosphorylation. En cas de stress, son activité augmente mais elle est l'étape limitante du processus d'oxydation (49).

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est une sérine/thréonine protéine kinase permettant l'adaptation de la cellule à l'environnement. Elle est impliquée dans la coordination de l'activité métabolique par le contrôle des voies consommant de l'ATP et productrices d'énergie. Au niveau hépatique, l'AMPK diminue la synthèse protéique par inhibition de mTOR, limitant la consommation d'ATP (50). En situation de stress, la synthèse musculaire est diminuée afin de favoriser la synthèse de protéines de l'inflammation ou l'utilisation des AA comme substrats énergétiques. Des données suggèrent que cette diminution serait en lien avec une diminution de l'efficacité des ribosomes plutôt qu'une diminution de leur nombre (51). L'augmentation de la protéolyse au cours du catabolisme est corrélée à la sévérité, ce qui n'est pas retrouvée pour la protéosynthèse (51). Dans ce cas, la protéolyse est essentiellement liée à l'activation du système ubiquitine-protéasome, permettant une dégradation de l'actine et des myosines (18).

Au niveau rénal, la glutamine est consommée en situation physiologique par le rein et dans de nombreuses situations pathologiques comme l'insuffisance hépatique, le jeûne prolongé, le diabète. Son oxydation partielle permet d'obtenir du glucose (cf. plus haut), ou si elle est complète, de l'alanine, de la sérine ou encore du lactate (52). La glutamine fournit également de l'ATP, source d'énergie des transports rénaux (Figure 7). Elle est à l'origine de la formation des ions ammonium (cf. plus bas). La transamination du glutamate dans le rein permet la formation d'alanine et de sérine (52). L'insuffisance rénale chronique entraîne une diminution de la consommation de glutamine par le rein en lien avec l'altération de la fonction rénale et l'acidose (53), et une activation du système ubiquitine-protéasome (54). Une production de glutamine au niveau du rein est le reflet d'une protéolyse car la glutamine

synthétase n'y est pas exprimée. Les autres AA consommés par le rein sont la glycine, la citrulline, la proline. Les AA produits par le rein sont l'alanine, la sérine, l'arginine, le glutamate et la tyrosine.

Figure 7 : Métabolisme rénal de la glutamine. D'après Baverel et al. (10)

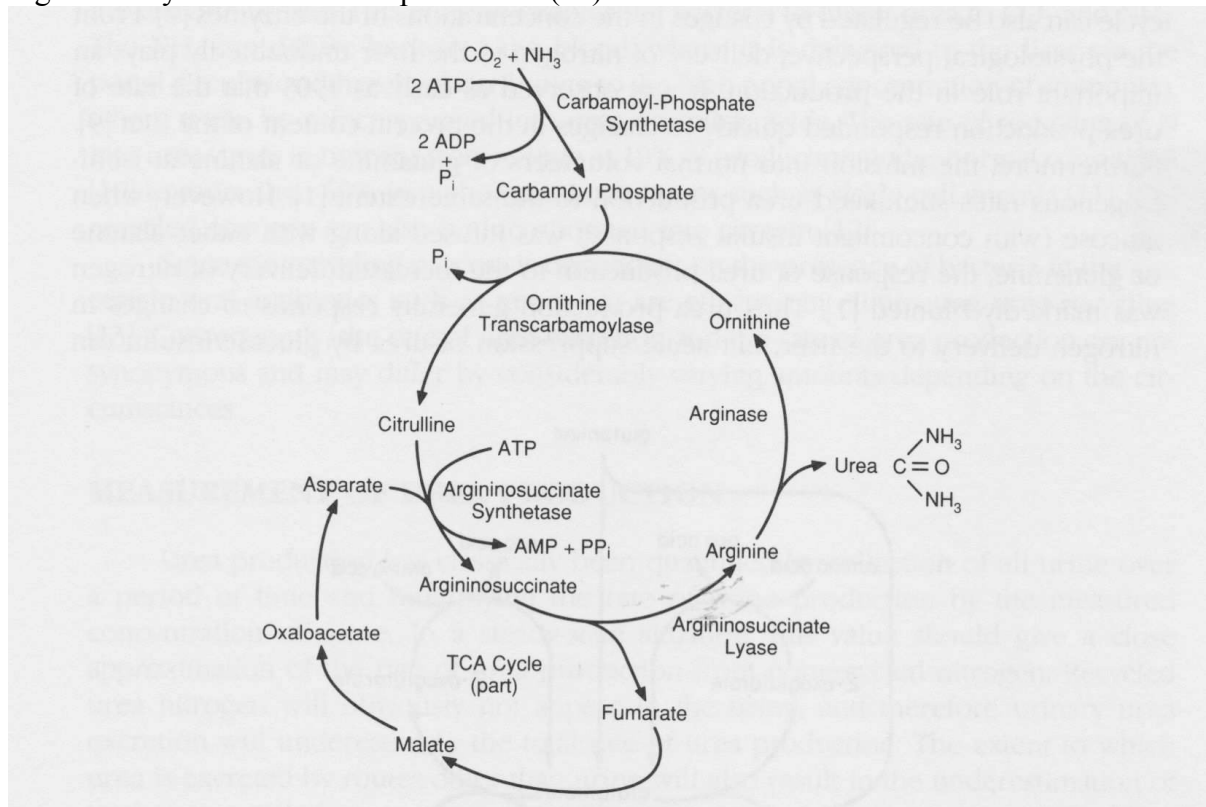


1.1.2.5 Produits terminaux de l'azote

L'élimination de l'azote excédentaire passe par les produits terminaux du métabolisme qui sont l'urée et l'ammoniac mais aussi par la créatinine, l'acide urique, les AA libres et des protéines de faible poids moléculaire (55). La voie préférentielle est celle de l'urée contenant 2 azotes ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), non toxique au contraire de l'ammoniac qui a une toxicité sur le système nerveux central. La voie d'élimination principale de l'azote est l'urine, les autres voies sont les fèces, la perspiration, les cheveux, les sécrétions nasales, les menstruations et le sperme. L'azote éliminé est issu du renouvellement protéique, de l'utilisation des AA comme substrat énergétique et de l'oxydation postprandiale directe des AA.

L'uréogénèse s'effectue au niveau des hépatocytes périportaux. Son cycle est localisé dans le cytoplasme et la mitochondrie (Figure 8) (56). L'azote provient pour les $\frac{3}{4}$ des AA et pour $\frac{1}{4}$ de l'ammoniac portal (57). L'uréogénèse est régulée par 3 mécanismes distincts : le flux de précurseurs, la régulation enzymatique et la régulation hormonale (décrite plus haut). L'urée est éliminée à 80% dans l'urine, le reste va dans le tube digestif où les bactéries possédant une uréase la transforme en CO_2 et NH_3 . L'azote peut alors retourner au foie et être réincorporé dans les AA ou l'urée. Ce recyclage peut varier de 10% en situation physiologique à plus de 60% en situation pathologique (58,59).

Figure 8 : Cycle de l'urée. D'après Wolfe (15).



Les AA prédominants dans l'uréogénèse sont la glutamine, l'alanine, l'aspartate et l'arginine (26). La glutamine est hydrolysée par une glutaminase en glutamate et ammoniac. L'ammoniac est ensuite intégré dans le carbamoyl-phosphate par la carbamoylphosphate

synthétase, dont l'action est régulée par le N-acétylglutamate, issu de la réaction précédente. L'arginine est le précurseur de l'urée, formant également l'ornithine dans la réaction d'uréogénèse. Lorsque qu'une épargne azotée est nécessaire, l'uréogénèse est réprimée en partie par la transformation de l'arginine en citrulline au niveau de l'intestin par l'ornithine carbamoyltransférase (OCT), permettant un transport vers le rein sans captation par le foie. Le rein permet alors la synthèse de novo de l'arginine à destination du muscle (60).

L'ammoniac est issu principalement de la glutamine et est synthétisé par le rein. Il représente environ 10% de l'excrétion urinaire d'azote en situation physiologique mais sa production peut augmenter de 5 à 10 fois en situation pathologique. Il peut donc jouer un rôle important dans la balance azotée. La glutamine est un AA central dans l'élimination de l'azote excédentaire, intervenant à la fois dans l'uréogénèse et dans la synthèse d'ammoniac.

La glutaminase la plus importante dans ce système est activée par l'acidose et l'ammoniac, transformant la glutamine en glutamate et ammoniac, réaction réversible par la glutamate déshydrogénase. Le glutamate peut subir une transamination formant l'alanine et l' α -cétooglutarate ou être soumis à une déshydrogénase formant une 2^{ème} molécule d'ammoniac, ce qui permet d'augmenter sa synthèse. Ce mécanisme permet de réguler l'équilibre acido-basique.

La variation des apports entraîne une variation similaire de l'ammoniac, afin de garder une balance nette nulle (61). La dégradation protéique est accrue dans de nombreuses situations pathologiques (stress, infection, traumatisme...) et entraîne une augmentation de l'uréogénèse. En situation d'acidose, la glutaminase hépatique responsable de la synthèse d'urée est inhibée et la glutamine synthétase est activée. L'ammoniac sera alors utilisé par les hépatocytes

périveineux pour synthétiser la glutamine nécessaire pour lutter contre l'acidose au niveau du rein, permettant également d'épargner les bicarbonates.

1.2 Méthodes cliniques et de recherche pour l'évaluation du métabolisme protéique

1.2.1 Bilan azoté

Il mesure l'évolution de la masse protéique sur un temps limité en évaluant les apports et les pertes, aboutissant à la balance azotée. Il est supposé pour cette mesure que l'azote soit stocké uniquement sous forme protéique et que le pool non protéique soit stable.

Cette méthode a de nombreuses limites. Elle ne prend pas en compte la cinétique du métabolisme protéique. Les apports sont difficiles à mesurer hormis en situation d'alimentation contrôlée comme une nutrition entérale totale. En effet, la quantification des apports est difficile et l'équivalent dans les tables de composition peut être approximatif. La mesure de l'excrétion d'urée urinaire donne accès à un reflet global du métabolisme protéique à court terme, sans pouvoir attribuer une variation à la synthèse, la protéolyse ou les deux. La production immédiate d'urée après un repas représente plus de 50% de l'azote absorbé alors qu'elle est ralentie au cours du jeûne prolongé par diminution de la circulation des AA (62). L'excrétion d'urée ne reflète donc pas exactement sa production dans les états non stables, nécessitant un recueil de 24h afin de l'estimer correctement, ce qui limite l'appréciation fine de son métabolisme. Ceci nécessite un recueil urinaire scrupuleux difficile à mettre en place en dehors des soins intensifs et est associé à de nombreuses sources d'erreur (63).

Le recueil de l'azote total urinaire (méthode de Kjeldahl) est plus pertinent mais les autres pertes ne sont pas comptabilisées et peuvent représenter une part non négligeable de

l'élimination de l'azote comme dans certaines dermatoses étendues. Sa durée sur 3 jours est une autre limite à sa réalisation.

1.2.2 Méthodes invasives de mesure du renouvellement par traceurs

Le renouvellement protéique global de l'organisme est d'environ 300 g/j chez l'adulte sain soit 3%/j, la vitesse étant différente selon l'organe (Figure 1). Ce renouvellement peut être estimé en mesurant le flux de certains AA dans le compartiment plasmatique par dilution isotopique (15).

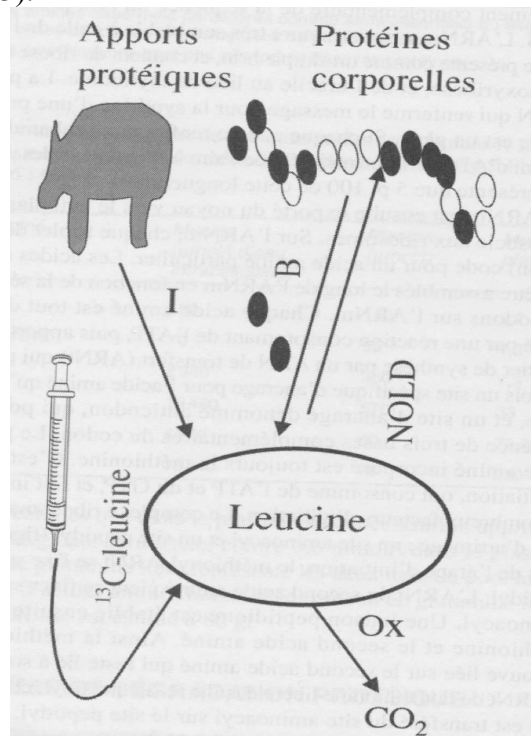
Les isotopes sont des éléments de la classification périodique, ayant un nombre de charge Z identique et un nombre différent de neutrons donc une masse atomique différente. Le marquage isotopique des molécules permet d'évaluer les flux d'AA et de protéines, c'est-à-dire de suivre de façon dynamique l'apparition ou la disparition d'une molécule dans l'organisme en administrant à un débit connu cette même molécule marquée avec un isotope stable.

1.2.2.1 Méthode corps entier reposant sur la cinétique d'un AA marqué

La perfusion d'AA marqués par un isotope stable est la méthode de référence d'évaluation du métabolisme protéique global. Les isotopes stables sont les plus utilisés et parmi eux le carbone 13 (^{13}C), notamment intégré à la leucine ($1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Leu}$). D'autres isotopes stables sont employés comme le ^{15}N , le ^2H et le ^{18}O (64). Dans ces modèles de perfusion de traceurs, on considère que les isotopes ne modifient pas le comportement de la molécule qu'ils intègrent.

Dans ce modèle, le compartiment intracellulaire est considéré comme un seul compartiment, simplifiant le pool de protéines et d'AA, ce qui en constitue sa principale limitation (Figure 9).

Figure 9 : Modèle de mesure du métabolisme protéique par injection de leucine marquée.
D'après Darmaun (13).



Légende : NOLD : utilisation non oxydative de la leucine (non oxydative leucine disposal) ; Ox : oxydation, synthèse protéiques ; I : apports alimentaires ; B : protéolyse ; CO₂ : dioxyde de carbone.

D'autres modèles à plusieurs compartiments, plus complexes, peuvent être utilisés. La leucine est un AA ramifié donc principalement métabolisé dans le muscle. C'est un AA indispensable (non synthétisé), sa source est donc alimentaire (I) ou réutilisée à partir de la protéolyse (B). Les sorties de leucine sont soit l'oxydation (Ox) en CO₂ soit la synthèse protéique (S). A l'état stable, la concentration de leucine dans le plasma est stable, c'est-à-dire que les flux entrant (Ra) et sortant (Rd) sont à l'équilibre. On obtient donc $Ra = I + B = Rd = S + Ox$.

La perfusion intraveineuse de 1-¹³C-Leu à débit constant (f) permet d'atteindre un plateau d'enrichissement isotopique après dilution dans l'organisme représenté par le rapport de la molécule marquée sur la molécule non marquée. On obtient $[^{13}\text{C-Leu}/^{12}\text{C-Leu}] = f/Ra$. Ainsi, en mesurant le rapport isotopique, on peut déduire Ra. Cette mesure est effectuée en mesurant

le $^{13}\text{CO}_2$ dans l'air expiré (E^{13}CO_2) estimant l'oxydation de leucine et corrigée par l'incorporation d'une partie du $^{13}\text{CO}_2$ dans le pool des bicarbonates (taux de récupération ou recovery).

La synthèse est déduite par soustraction de l'excrétion au renouvellement qui correspond à l'utilisation non oxydative de la leucine ($\text{NOLD} = \text{Rd} - \text{Ox}$), qui est un index de la synthèse protéique (la leucine représente environ 8% des AA dans les protéines).

Le plasma est considéré comme le reflet de l'organisme. La mesure de l'enrichissement dans le plasma n'est pas directement mesurée sur la leucine mais approximée par son α -cétoacide circulant correspondant (α -céto-isocaproate ou KIC) issu de la transamination de la leucine intracellulaire. Le Ra de leucine intracellulaire peut être calculé à partir du quotient entre la vitesse de perfusion du traceur et une valeur d'enrichissement moyen corporel calculée à partir du KIC plasmatique.

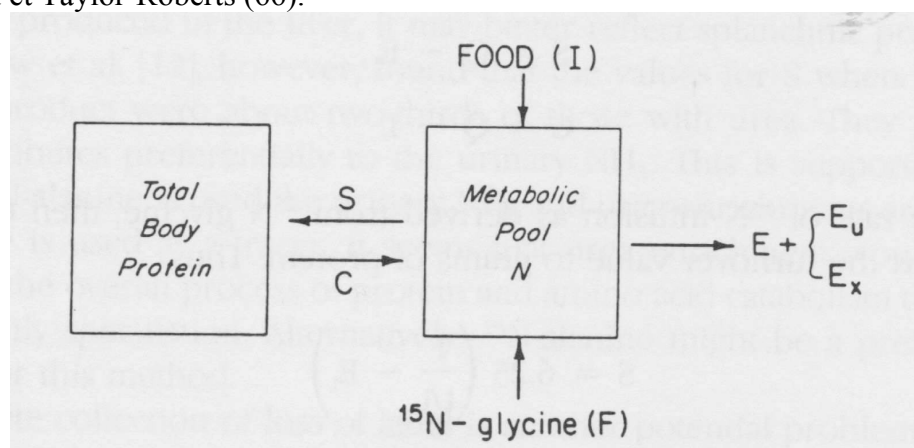
D'autres AA ont été étudiés sur le même principe, y compris des AA non indispensables comme la glutamine où la mesure de synthèse endogène peut être estimée à partir de la part du flux total non expliqué par la protéolyse (44).

Le métabolisme splanchnique peut également être évalué plus spécifiquement par un double marquage isotopique par de la ^{13}C -Leu intraveineuse et de la $^2\text{H}_3$ -Leu par voie entérale, permettant de mesurer la captation de la leucine par l'intestin et le foie (premier passage splanchnique) (65).

La mesure de la ^{15}N -glycine en perfusion intraveineuse continue permet d'estimer le renouvellement des acides aminés au niveau plasmatique (Figure 10) (66). La méthode nécessite des prélèvements veineux répétés et la mesure est effectuée par spectrométrie de

masse après déprotéinisation du plasma, isolation de la glycine par chromatographie et dérivatisation.

Figure 10 : Schéma du modèle exploré par la perfusion continue de ^{15}N -glycine. D'après Picou et Taylor-Roberts (66).



Légende : I : taux d'apport protéique (mg N/h) ; F : taux d'infusion d'AA marqué au ^{15}N (mg ^{15}N /h) ; C : taux de catabolisme protéique (mg/h) ; S : taux de synthèse protéique (mg N/h) ; E : taux d'excrétion urinaire total (mg N/h) ; E_u : taux d'excrétion d'urée urinaire (mg N/h) ; E_x : taux d'excrétion urinaire non uréique (mg N/h)

Le modèle de Picou et Taylor-Roberts considère que le pool métabolique est constant pendant la perfusion de traceur, qu'il n'y a pas de recyclage du ^{15}N , pas de discrimination d'isotope (effet isotopique, cf. plus bas), pas de différence entre les AA d'origine endogène et exogène et enfin que la ^{15}N -glycine est un traceur représentatif de l'azote aminé. Le ^{15}N est échangé par transamination avec les autres AA, sa concentration étant mesurée sur l'urée et l'ammoniac.

Certains points limitent cette méthode comme le délai nécessaire à un état stationnaire (au moins 30 à 40 heures) qui affaiblit le postulat de taille constante du pool métabolique et le fait que la glycine provient à la fois de la dégradation protéique et d'une néosynthèse tissulaire. Le délai peut être raccourci grâce à l'injection d'une dose de charge.

1.2.2.2 Méthode des produits terminaux

La mesure de production de l'urée peut être effectuée par méthode isotopique en utilisant l'urée marquée au ^{15}N , ^{14}C , ^{13}C ou ^{18}O . Schématiquement, la production de l'urée est exclusivement hépatique, l'intégralité est déversée dans le sang sans perte irréversible au niveau du foie. L'excrétion se fait par la filtration rénale, considérée comme irréversible.

L'utilisation d'un double marquage de $^{15}\text{N}_2$ -urée en perfusion intraveineuse continue avec dose de surcharge permet d'estimer la production d'urée à la phase d'équilibre. L'avantage de ce traceur est qu'il permet également de mesurer l'hydrolyse de l'urée dans l'intestin donc le taux de recyclage intestinal de l'azote uréique. L'urée synthétisée à partir du NH_3 intestinal sera de la ^{15}N -urée (marquage simple) puisqu'on peut considérer que la probabilité de réincorporer deux ^{15}N dans l'urée est très faible. Les mesures peuvent être réalisées dans le sang et l'urine.

La difficulté est d'identifier la phase de plateau isotopique car la taille du pool est importante et son taux de renouvellement fractionnaire est lent. Une dose de surcharge adaptée permet de limiter ce problème mais sa quantification est délicate. Une autre limitation est que cette technique est adaptée seulement aux mesures du Ra urée à court terme.

La mesure de la ^{15}N -glycine en perfusion intraveineuse continue peut être utilisée pour estimer les produits terminaux. Le choix du produit terminal est alors important. Comme dit plus haut, l'incorporation dans l'urée est lente et nécessite donc un temps important avant de mesurer une différence d'enrichissement. Produite dans le foie, elle reflète plus volontiers le métabolisme hépatique. Pour l'ammoniac qui a une excrétion rapide et qui dérive prioritairement de l'azote amidé de la glutamine, la glycine n'est sans doute pas le meilleur traceur car elle ne représente qu'une partie du pool total d'azote. De plus, la glutamine

provenant essentiellement du muscle, l'ammoniac reflète plus largement le renouvellement protéique musculaire (15).

1.2.2.3 Mesure de la synthèse protéique au niveau des tissus par incorporation des précurseurs

Le renouvellement au niveau d'un tissu peut être mesuré par marquage isotopique où la quantité d'AA marqués incorporée dans les protéines est mesurée (15). La synthèse peut être mesurée par injection d'une dose de surcharge de traceur. Elle s'exprime par le taux de synthèse fractionnaire (FSR ou ks) d'une protéine spécifique en % par unité de temps, qui correspond à la pente d'intégration de l'AA marqué par rapport à la quantité de traceur dans le pool précurseur d'AA, déterminé à l'aide de modèles compartimentaux. La mesure de l'enrichissement du pool précurseur de synthèse est facilitée par l'injection d'une dose de surcharge. L'autre avantage est d'avoir une quantité suffisante de traceur pour mesurer des variations sur de courtes périodes de temps ou dans un tissu ayant un renouvellement lent comme le muscle (67).

Le taux de synthèse protéique (masse/unité de temps) peut être calculé si la masse protéique totale est connue. Ceci suppose qu'on considère que la synthèse protéique n'est pas influencée par la perfusion de cette dose de surcharge, qui est une quantité d'AA en excès pouvant augmenter la synthèse protéique et l'oxydation. Ces mesures nécessitent un accès au compartiment protéique et ne peuvent être effectuées que sur un nombre limité de tissus dont le muscle, les protéines circulantes, le foie, et l'intestin grêle notamment. Cette technique est difficile de mise en place et sa fiabilité est controversée.

1.2.3 Approche par organes : mesure des différences artério-veineuses

Cette technique permet une mesure régionale du métabolisme protéique, par exemple au niveau d'un groupe musculaire au niveau d'un membre (avant-bras par exemple), permettant de mesurer le métabolisme musculaire (15). Le principe est la mesure de part et d'autre d'un organe. La captation du traceur par le muscle, la synthèse lorsque l'AA est non oxydable comme la phénylalanine, peuvent être mesurées grâce à l'enrichissement intracellulaire (biopsie musculaire), dans l'artère ou dans la veine.

La protéolyse peut être calculée par cette méthode. La mesure simultanée permet d'obtenir les flux entre les compartiments capillaire et intramusculaire. La captation est variable selon l'AA, dépendant de la vitesse de passage de la membrane cellulaire et de l'utilisation pour l'oxydation (leucine).

Cette technique suppose que l'ensemble des flux vasculaires est destiné à la masse cellulaire active donc sans shunt au niveau cutané. Les mêmes postulats que pour la méthode des produits s'appliquent à cette méthode. De plus, la technique peut être risquée pour l'artère cathétérisée et les différences mesurées sont proches de l'erreur de mesure liée à l'appareillage.

1.2.4 Chromatographie des acides aminés

La mesure directe des concentrations plasmatiques d'AA par chromatographie donne un aperçu des acides aminés plasmatiques à un instant donné. Une diminution de la concentration plasmatique en certains AA est présente en cas de MPE sévère. Cependant, cette méthode explore une petite partie du pool d'AA (<1%) et ne permet pas d'accéder à des mesures de synthèse, de protéolyse ou d'oxydation, rendant son interprétation complexe.

1.2.5 Mesure de la protéolyse

Cette mesure est difficile. Des dispositifs *in vitro* d'évaluation de la protéolyse existent sur milieu spécifique, avec mesure de la tyrosine dans le muscle, de la valine dans le foie. Il est possible d'inhiber spécifiquement chacune des voies, ce qui permet de mesurer l'activité de chacune dans la protéolyse.

Mesure de la 3-méthylhistidine (3-MH)

La protéolyse peut être estimée de manière simplifiée par la mesure de la 3-MH. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle de l'actine dans le muscle squelettique et lisse, ajoutant un radical méthyl à l'histidine. La 3-MH n'étant pas catabolisée, elle est excrétée dans les urines et est mesurable.

L'absence de distinction entre la dégradation (rapide) dans le muscle lisse et (lente) dans le muscle strié et la possibilité d'un apport exogène (viande, poisson) rend cette mesure peu robuste (68). Le muscle strié représenterait 91% du pool de la 3-MH et l'élimination urinaire d'origine extra-musculaire représenterait entre 15% et 25% (69).

La masse musculaire peut être estimée indirectement par l'excrétion de créatinine, 2% environ de la créatine subissant une conversion irréversible en créatinine. La 3-MH peut donc être exprimée en fonction de la créatinine afin de rapporter la protéolyse à la masse musculaire totale.

Autres méthodes d'évaluation de la protéolyse

La mesure des quantités d'ARNm permet d'avoir une quantification de l'expression génique donc un reflet de la quantité de protéines synthétisées, par exemple dans le système ubiquitine-protéasome.

Chez l'animal, de nouvelles techniques par infusion d'AA non marqués précédant l'infusion marquée de 2 traceurs (phénylalanine et thréonine dans ce cas) permettent de déterminer le FSR et le taux de protéolyse fractionnaire (FBR) à l'état non stable physiologique, au niveau d'un membre (70).

1.3 Utilisation de traceurs non radioactifs en abondance naturelle

1.3.1 Les isotopes

Les isotopes sont des éléments de la classification périodique, ayant un nombre de charge Z identique et un nombre différent de neutrons donc une masse atomique différente. Le ^{15}N est un isotope stable, non radioactif, de l'azote 14 (^{14}N) et est présent en faible quantité à l'état naturel (environ 0,4 %) dans notre alimentation et nos tissus, 1,1% pour le ^{13}C .

Un isotopologue est une molécule de même formule chimique, contenant des isotopes différents. Ainsi la ^{15}N -urée est un isotopologue de la ^{14}N -urée. L'isotope peut être à une position différente dans la molécule, par exemple le ^{15}N peut se trouver dans la glutamine en position aminée (position 2) ou amidée (position 5), formant ainsi deux isotopomères.

La mise en évidence des isotopes passe par la mesure de la masse moléculaire en spectrométrie de masse de rapports isotopiques (irm-MS) permettant de déterminer le rapport d'abondance entre l'isotope lourd sur l'isotope léger soit $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (abondance ou teneur isotopique). La comparaison de ce rapport à une référence internationale permet d'obtenir des résultats précis exprimés dans l'échelle relative δ (‰). Une valeur positive signifie un enrichissement par rapport à la référence, c'est-à-dire une teneur plus élevée en isotope lourd, et une valeur négative un appauvrissement, c'est-à-dire une teneur moins élevée en isotope lourd.

La mesure des variations de l'AIN en ^{15}N , donc sans administration de molécule marquée, au sein d'une molécule dans différentes situations physiologiques ou pathologiques pourrait fournir des données sur le métabolisme protéique.

1.3.2 Abondance isotopique naturelle en ^{15}N et ^{13}C

1.3.2.1 AIN en ^{15}N

La mesure de l'AIN en ^{15}N a permis d'obtenir une évaluation des apports protéiques chez l'homme des glaces et les animaux préhistoriques (71). Des variations ont pu être observées à chaque étape de l'évolution du mode alimentaire humain, passant de la chasse à la domestication et au développement de l'agriculture (72,73). En effet, elle varie en fonction de la quantité et de la qualité des protéines (74).

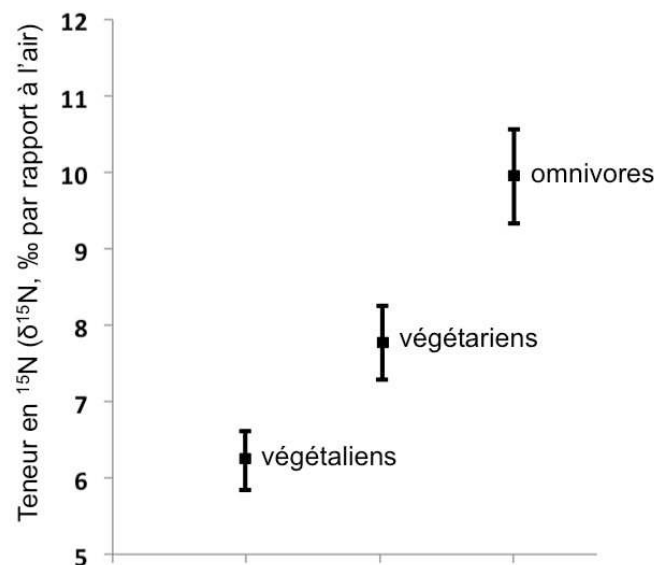
Un enrichissement croissant en ^{15}N est observé en montant dans la chaîne alimentaire. Un organisme a donc une AIN en ^{15}N plus élevée que ce qu'il mange. C'est l'effet trophique ou « trophic level effect » qui peut être quantifié par :

$$\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{tissu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{alimentation}} (\text{‰})$$

Cette valeur varie habituellement entre 3 à 5‰ (75). L'homme a des teneurs élevées car il est au sommet de la chaîne alimentaire. L'AIN en ^{15}N des nouveau-nés allaités est supérieure à celle de sa mère (76). Ceci a permis de déterminer le régime alimentaire des nouveau-nés et l'âge du sevrage du lait maternel pendant l'Ancien Régime. En comparant l'AIN en ^{15}N du collagène osseux (qui a un renouvellement lent, de l'ordre de plusieurs années) et des cheveux (renouvellement modéré de l'ordre de plusieurs mois) des mêmes individus, il a été possible de déterminer si les nourrissons étaient nourris au sein et l'âge du sevrage du lait maternel (77).

L'AIN en ^{15}N varie en fonction du régime protéique alimentaire (78). Il existe une corrélation positive entre la consommation de protéines animales ou végétales et l'AIN en ^{15}N . Il existe une gradation entre les végétaliens (consommant uniquement des produits végétaux) qui ont les teneurs les plus basses puis les végétariens (alimentation excluant la viande et les poissons mais comprenant les produits dérivés des animaux comme le lait et les œufs) où les teneurs sont intermédiaires et enfin les omnivores (régime alimentaire diversifié complet) qui ont les teneurs les plus élevées (Figure 11) (79). L'enrichissement naturel en ^{15}N est plus élevé lorsque les protéines proviennent de poissons plutôt que d'animaux terrestres (79).

Figure 11 : Teneurs en ^{15}N selon le type de régime alimentaire. Enrichissement progressif avec un régime de plus en plus carnivore. D'après Petzke et al. (79)



Une analyse de la comparaison de différentes sections de cheveux d'individus passés d'un régime omnivore à un régime végétarien a montré que l'inertie de l'AIN en ^{15}N et ^{13}C était quasi nulle. Par la suite, elles diminuaient de manière simultanée et progressive jusqu'à atteindre un équilibre entre sept et douze mois (78). Cet aspect progressif pourrait s'expliquer par la vitesse de renouvellement cellulaire variable selon les organes et à l'établissement d'un

nouvel équilibre corps entier. Les AA du pool de synthèse protéique proviennent pour environ 20% de l'apport exogène, et pour 80% de source endogène. Ce qui signifie qu'une modification du régime alimentaire aura un effet partiel par dilution des protéines issues de l'alimentation dans le pool d'AA. Ceci signifierait que les changements de régime alimentaire sont rapidement observables et qu'un équilibre des AIN en ^{13}C et ^{15}N serait obtenu lorsque le pool protéique est renouvelé entièrement, ce qui prend plusieurs mois, en particulier pour le muscle.

Dans une autre étude, deux groupes de femmes (n=14) avec un apport protéique comparable en pré-étude (1,4 g/kg/j) ont modifié pendant 4 semaines leurs apports protéiques pour des apports plus faibles mais restant élevés (1,15 g/kg/j) et très élevés (2,25 g/kg/j, supplément de protéines animales) en protéines (80). L'AIN en ^{15}N était plus élevée après intervention dans les 2 groupes dans le plasma mais pas dans les cheveux, sans doute à cause du délai court de mesure après intervention. La comparaison des AIN en ^{15}N ne montrait pas de différences dans le plasma et les cheveux entre les groupes après intervention mais il existait une AIN en ^{15}N plus faible dans les urines pour le groupe très élevé, pouvant traduire une augmentation de l'oxydation directe des AA.

1.3.2.2 AIN en ^{13}C

Ce raisonnement s'applique à d'autres éléments comme le carbone. L'AIN en ^{13}C augmente également en montant la chaîne alimentaire, avec des paliers d'environ 1‰ par niveau (78).

La photosynthèse offre un exemple d'effet isotopique responsable d'une AIN en ^{13}C plus élevée chez les plantes en C_4 (entre -15‰ et -11‰) par rapport aux plantes en C_3 (entre -32‰ et -23‰) alors que l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 ambiant est de l'ordre de -8‰ (79). Cet

effet est en partie lié au couplage de la carboxylation (menant à des composés organiques) à un cycle dépendant de l'enzyme malique et de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) dans les plantes en C₄.

Les plantes en C₄ comprennent le maïs, le sorgho, le mil et le sucre de canne et les plantes en C₃ comprennent le blé, l'orge, le soja, les pommes de terre, les fruits et légumes. Les Européens consomment moins de plantes en C₄ (maïs principalement) que les Américains du Nord, leur AIN en ¹³C est par conséquent inférieure.

Cette mesure a une application industrielle quotidienne dans le contrôle de la fabrication des vins en recherchant un enrichissement anormal du carbone en cas de mélange de sucre ou d'alcool (81).

1.3.3 Mesure de l'effet isotopique comme bio-marqueur métabolique

Un accroissement de l'AIN en ¹⁵N de l'ordre de 3‰ est retrouvé pour chaque palier de niveau trophique de la chaîne alimentaire (cf. plus haut). L'utilisation préférentielle d'un isotopologue en fonction de l'intensité d'une réaction chimique constitue le fractionnement isotopique, dépendant des constantes d'équilibre. On distingue l'effet isotopique cinétique pour des réactions chimiques irréversibles non totales, généralement favorable à l'incorporation du ¹⁴N grâce à une énergie de liaison plus faible. L'effet isotopique thermodynamique est retrouvé dans les réactions réversibles, permettant un équilibre entre le ratio des produits sur les substrats et pouvant être favorable ou défavorable à l'isotope lourd.

Plusieurs études suggèrent que le métabolisme protéique est un déterminant majeur de l'AIN en ¹⁵N, incluant le métabolisme des AA et le renouvellement protéique. La cinétique des réactions biochimiques est étroitement liée à la composition isotopique des molécules et l'effet isotopique se produit lors des modifications du renouvellement protéique. Cette

propriété permettrait d'estimer l'intensité du renouvellement protéique chez l'homme sain et malade. A notre connaissance, il n'existe aucune étude publiée chez l'animal ou chez l'homme comparant l'AIN en ^{15}N à l'infusion de traceurs.

1.3.3.1 Au niveau moléculaire

Il existe peu de données permettant de démontrer une variation de l'effet isotopique. Lorsqu'une réaction est composée de plusieurs étapes, l'effet isotopique final est lié aux effets isotopiques de chaque étape de la réaction (82). Les facteurs de fractionnement isotopique et leur influence dans le métabolisme de l'azote restent peu connus.

Un effet isotopique a été retrouvé in vitro lors de réactions de transaminations hépatiques, plus particulièrement avec l'aspartate aminotransférase sur le transfert de l'azote aminé de l'acide glutamique vers l'oxaloacétate formant l'acide aspartique, dont la vitesse de réaction favorise l'incorporation du ^{14}N (1,0083 plus rapide) dans le produit de la réaction (83), chaque étape intermédiaire de l'action de l'aspartate aminotransférase étant favorable au ^{15}N (84). La réaction inverse de transfert de NH_2 de l'acide aspartique vers l' α -cétoglutarate favorise ici encore le ^{14}N (1,0017 plus rapide). Une mutation de l'aspartate aminotransférase entraîne une modification de l'effet isotopique par changement du fractionnement (85).

Un effet isotopique a aussi été mis en évidence au niveau de 2 étapes du cycle de l'urée, sur l'arginosuccinate synthétase catalysant le transfert du groupement NH_2 de l'acide aspartique vers la citrulline qui devient alors l'acide arginosuccinique et sur la carbamoyl phosphate synthétase qui synthétise le carbamoyl phosphate faisant entrer l'ammoniac dans le cycle de l'urée (86). L'urée et l'ammoniac auraient ainsi des AIN plus faibles et les protéines synthétisées par le foie des AIN plus élevées à cause d'un effet isotopique plus important. Certains auteurs suggèrent qu'une augmentation de la production d'urée pourrait conduire à

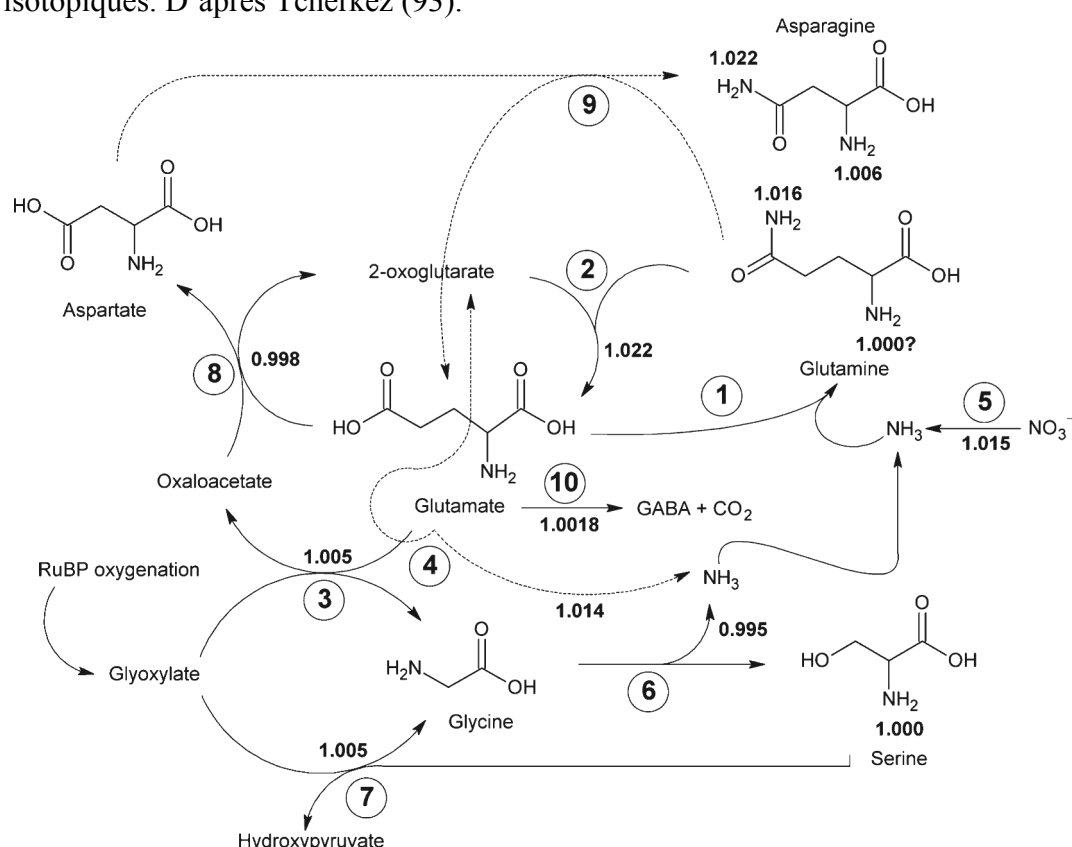
un enrichissement en ^{15}N des protéines, avec une rétention du ^{15}N dans le corps (87). Ceci pourrait être expliqué par une excrétion urinaire de produits appauvris en ^{15}N et l'incorporation des AA résiduels riches en ^{15}N (88).

La synthèse protéique semble engendrer un effet isotopique (89). La réaction de peptidyltransférase de la sous-unité 50s du ribosome paraît soumise à un effet isotopique cinétique (irréversible). Le ribosome semble jouer un rôle catalytique propre dans la formation de liaisons peptidiques, car cet effet n'est pas modifié par le pH.

La protéolyse est aussi soumise à un effet isotopique lors de la cassure des liaisons peptidiques, comme cela a été montré *in vitro* avec l'hydrolyse du dipeptide glycylglycine en 2 glycines, variant selon le pourcentage de la réaction d'hydrolyse et la température (90). *In vitro*, la déamination de la cytidine peut aussi être responsable d'un effet isotopique, pouvant être modifié par une mutation (91). La fonction amidée peut aussi être concernée par un effet isotopique comme dans l'hydrolyse de la glutamine par la carbamoyl phosphate synthétase (92).

Une revue de littérature sur le métabolisme protéique végétal a mis en évidence 10 localisations d'effets isotopiques principaux (Figure 12) (93). Dans cette revue, l'auteur suggère que les variations de l'AIN sont en lien à la fois avec les effets isotopiques des différentes réactions et avec les flux métaboliques impliqués. La complexité déjà présente au niveau végétal permet de juger de la difficulté d'une localisation des effets isotopiques chez l'homme.

Figure 12 : Schéma simplifié du métabolisme protéique végétal montrant les principaux effets isotopiques. D'après Tcherkez (93).



Légende : 1 : glutamine synthétase ; 2 : glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase ; 3 : glutamate-glyoxylate aminotransférase ; 4 : glutamate déshydrogénase ; 5 : nitrate réductase ; 6 : glycine décarboxylase ; 7 : sérine-glyoxylate aminotransférase ; 8 : aspartate aminotransférase ; 9 : asparagine synthétase ; 10 : glutamate décarboxylase.

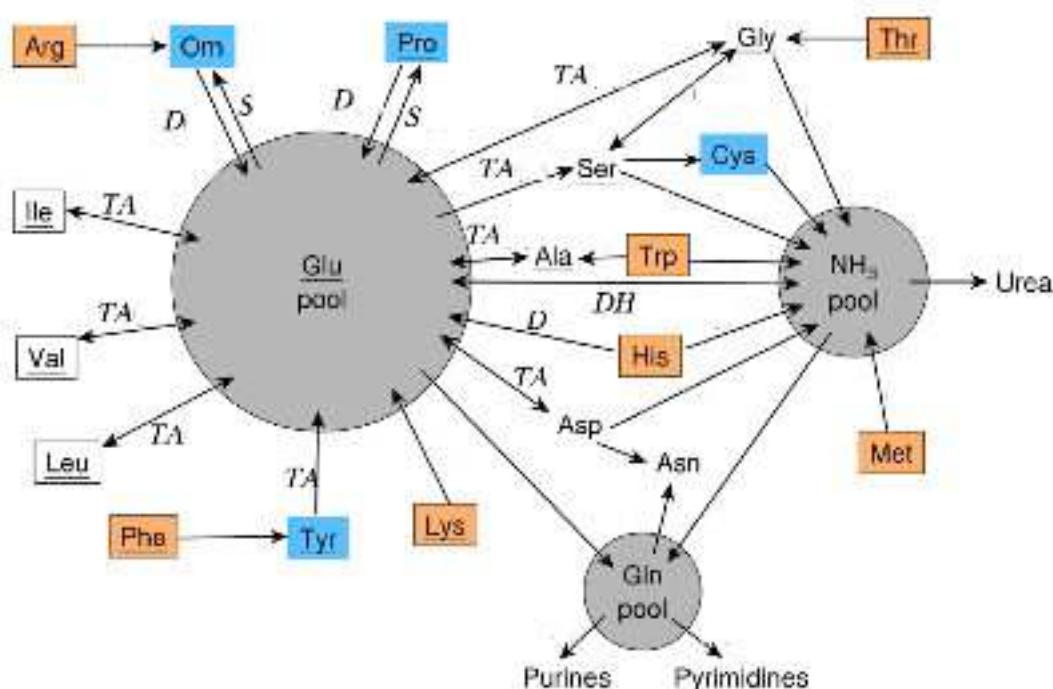
L'effet isotopique peut être observé dans d'autres voies métaboliques. Dans le métabolisme lipidique, les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation non enzymatique par les espèces réactives de l'oxygène. Cette réaction peut être bloquée lors de l'ajout de deutérium sur le site bis-allélique de l'acide linoléique (C18:2 ω 6) par un effet isotopique cinétique, démontré chez la levure *S. cerevisiae* (94,95). La présence de deutérium dans le système conjugué pourrait jouer un rôle dans un effet isotopique cinétique secondaire. Ceci suggère que l'effet isotopique pourrait aussi être un marqueur du métabolisme énergétique.

1.3.3.2 Les études animales

Chez l'animal, les tissus ont des AIN en ^{15}N qui diffèrent selon le renouvellement protéique de chaque organe (96). Poupin et al. apportent des arguments robustes à la variation de l'AIN en ^{15}N selon le métabolisme protéique chez le rat (97,98). La méthode est proche des études de traceurs intraveineux avec une dose de charge en ^{15}N dans une alimentation administrée par voie entérale. Ceci leur a permis de modéliser les compartiments corporels impliqués dans le métabolisme protéique. Leurs résultats suggèrent que l'AIN en ^{15}N dépend du renouvellement protéique et qu'il existe un niveau basal d'AIN en ^{15}N différent dans le muscle, le plasma et le foie, cohérent avec le renouvellement protéique de chacun de ces compartiments. En effet, le foie avait une AIN en ^{15}N supérieure au muscle dont le renouvellement protéique est plus lent. L'urée plasmatique avait une AIN en ^{15}N inférieure au foie, ce qui pourrait confirmer qu'un effet isotopique est en faveur des protéines nouvellement synthétisées par le foie. Dans leur étude, les AIN en ^{15}N étaient plus élevées dans les protéines que dans les AA libres dans la plupart des tissus. Ces derniers, représentant le pool circulant, pourraient avoir un impact sur la synthèse de l'urée. L'intensité de l'effet isotopique semble dépendre des voies métaboliques hépatiques et de leur activité, c'est-à-dire le renouvellement protéique qu'il soit modulé par l'apport alimentaire ou par un état pathologique (86).

L'AIN en ^{15}N spécifique des AA pourrait être variable selon que l'AA peut subir une transamination et qu'il soit indispensable ou non (99). Ceci ferait considérer 3 groupes d'AA, 1) les AA transaminables d'AIN comparables et peu dépendant de l'alimentation, 2) les AA non transaminables non indispensables d'AIN intermédiaire selon la proportion de synthèse de novo et 3) les AA non transaminables indispensables d'AIN identiques à l'alimentation car l'azote n'est pas échangé. Les transferts d'azote des AA sont représentés dans la Figure 13.

Figure 13 : Pool d'AA et transfert d'azote chez les mammifères. Adapté de Braun et al. (99).



Légende : Les AA indispensables sont encadrés, la couleur orange correspond aux AA non transaminables indispensables, la couleur bleu aux AA non transaminables non indispensables. TA : transamination, D : dégradation, DH : déshydrogénase, S : synthèse.

Le fractionnement isotopique est donc dynamique, dépendant des organes et de la situation métabolique de synthèse et de catabolisme ainsi que des multiples étapes et voies métaboliques. Ceci a été bien mis en évidence par une nouvelle modélisation multi-compartimentale développée par l'équipe de H. Fouillet à partir de données issues de traceurs chez le rat (100). Ce modèle repose sur des compartiments de taille et de renouvellement différents et prend en compte les flux et le métabolisme des protéines et des AA. Le fractionnement pourrait varier alors en fonction des flux et de la synthèse ou de la dégradation protéique. Les variations de flux pourraient engendrer une modification du fractionnement d'un compartiment qui pourrait lui-même modifier les autres compartiments par les échanges ultérieurs. Lors de la stabilisation des flux, même si l'état stable est différent du précédent, le

fractionnement pourrait revenir au niveau antérieur, faisant de ce marqueur un témoin dynamique.

1.3.3.3 En recherche clinique

Notre groupe a étudié le lait maternel et les cheveux du nouveau-né à l'âge de 1 mois (101,102). Les valeurs de l'AIN en ^{15}N ainsi que les quantités d'AA des cheveux et du lait ont été déterminées. Les enfants étant allaités de manière exclusive, l'apport nutritionnel en ^{15}N était donc contrôlé. Les résultats montraient une différence importante de l'AIN en ^{15}N entre les cheveux du nouveau-né et les protéines du lait maternel, dépassant largement l'effet trophique. De plus, la différence entre les sommes pondérées de l'AIN en ^{15}N des AA du lait et des cheveux du nouveau-né, mesurée après hydrolyse, était identique à celle de la protéine entière. Celle-ci ne peut donc pas être attribué aux différences de composition en AA des protéines. On pouvait noter une corrélation étroite entre l'AIN en ^{15}N et le nombre de réactions pour l'obtention de l'azote aminé. Les AA obtenant leur azote aminé en une réaction avaient une AIN en ^{15}N plus élevée que ceux qui l'incorporaient à une étape ultérieure. Enfin, la thréonine et la lysine qui ne transaminent pas chez l'homme avaient conservé une AIN en ^{15}N peu élevée. Ainsi, la grande différence d'AIN en ^{15}N entre les cheveux et le lait pourrait être attribuable à un métabolisme protéique plus rapide du nouveau-né.

A notre connaissance, deux études (dont la nôtre) explorent la relation entre une dysfonction d'organe et une diminution de l'intensité du métabolisme chez l'homme, et quelques autres se sont intéressées à l'impact de l'état nutritionnel (Tableau 2).

Une diminution de l'AIN en ^{15}N a été observée dans la cirrhose hépatique (d'étiologie principalement alcoolique), avec des valeurs d'AIN en ^{15}N total des cheveux autour de 6,7%, plus bas de 3,2% par rapport aux contrôles de l'étude, ce qui pourrait traduire un effet

délétère sur le métabolisme hépatique par diminution de la synthèse protéique globale (103). L'étude de l'AIN en ^{15}N des acides aminés retrouvait une AIN plus faible hormis pour la phénylalanine qui semblait élevée et l'isoleucine, la thréonine et la proline qui semblaient conservées. Ces AA sont indispensables sauf la proline mais qui ne subit pas de transamination, ce qui pourrait expliquer en partie ces particularités. On pouvait noter que les patients ayant un dispositif de shunt intra-hépatique portosystémique avaient tendance à avoir une AIN en ^{15}N plus faible que les autres patients, évitant le premier passage hépatique donc diminuant les transaminations.

Tableau 2 : Etudes de mesure d'AIN en ^{15}N en temps que marqueur métabolique en pathologie humaine

Référence	Tissu	N	Pathologie	Conclusion
Fuller et al. (2005) (107)	Cheveux	8	Vomissements gravidiques	AIN plus élevée chez les malades
Petzke et al. (2006) (103)	Cheveux	21	Cirrhose hépatique	AIN plus faible chez les malades
Hatch et al. (2006) (104)	Cheveux	20	Anorexie mentale et boulimie	AIN plus faible chez les malades
Mekota et al. (2006) (105)	Cheveux	6	Anorexie mentale	AIN plus faible chez les malades, plus élevée si MPE sévère
Mekota et al. (2009) (106)	Cheveux	7	Anorexie mentale	AIN plus élevée si MPE sévère
De Luca et al. (2014)	Cheveux	64	Diabète avec ou sans néphropathie	AIN corrélée à l'atteinte rénale

Les autres études portent sur des pathologies entraînant une MPE. Les troubles des conduites alimentaires en général et l'anorexie mentale semblent aussi entraîner une diminution de l'AIN en ^{15}N (<8‰), ce qui suggère une diminution de synthèse protéique (104,105). La diminution d'AIN en ^{15}N paraît plus marquée dans l'anorexie mentale que dans la boulimie, ayant un impact probablement moindre sur l'état nutritionnel. Dans cette même étude, le suivi de ces patientes révélait que l'apparition d'une diminution de l'IMC avec apparition d'une MPE sévère semblait faire augmenter l'AIN en ^{15}N , ce qui suggère une augmentation du catabolisme donc un enrichissement des AA circulants par mobilisation des protéines endogènes musculaires. Une autre étude de la même équipe incluant 7 patientes a retrouvé des variations similaires mais une AIN en ^{15}N basale plus élevée (106). Un stress nutritionnel lié à des vomissements gravidiques, avec perte ou faible prise de poids, permet d'observer les mêmes résultats sans doute par le même mécanisme responsable d'un catabolisme (107).

L'importance du catabolisme pourrait ainsi influencer sur l'AIN en ^{15}N chez l'homme. Ces publications restent observationnelles, non mécanistiques et portent sur des petits effectifs, ce qui nécessite des études contrôlées sur un plus grand nombre de patients.

En physiologie, il a été observé une diminution progressive de l'AIN en ^{15}N au cours de la grossesse d'autant plus importante que la prise de poids maternelle et le poids de naissance du bébé étaient élevés, avec une réaugmentation en post-partum (108). Le mécanisme physiologique pourrait être une économie azotée par réduction de l'activité enzymatique du cycle de l'urée, s'accroissant au cours de la grossesse, associée à une augmentation des apports protéiques et de l'hydrolyse de l'urée (109,110). L'influence de la pousse du cheveu n'est pas exclue (cf. plus bas). Le niveau d'oxydation des AA était inversement corrélé au poids de naissance du nouveau-né, suggérant là encore une économie de l'azote (109). Ceci

suggère que le ^{15}N est préférentiellement incorporé par le métabolisme le plus intense, c'est-à-dire le fœtus.

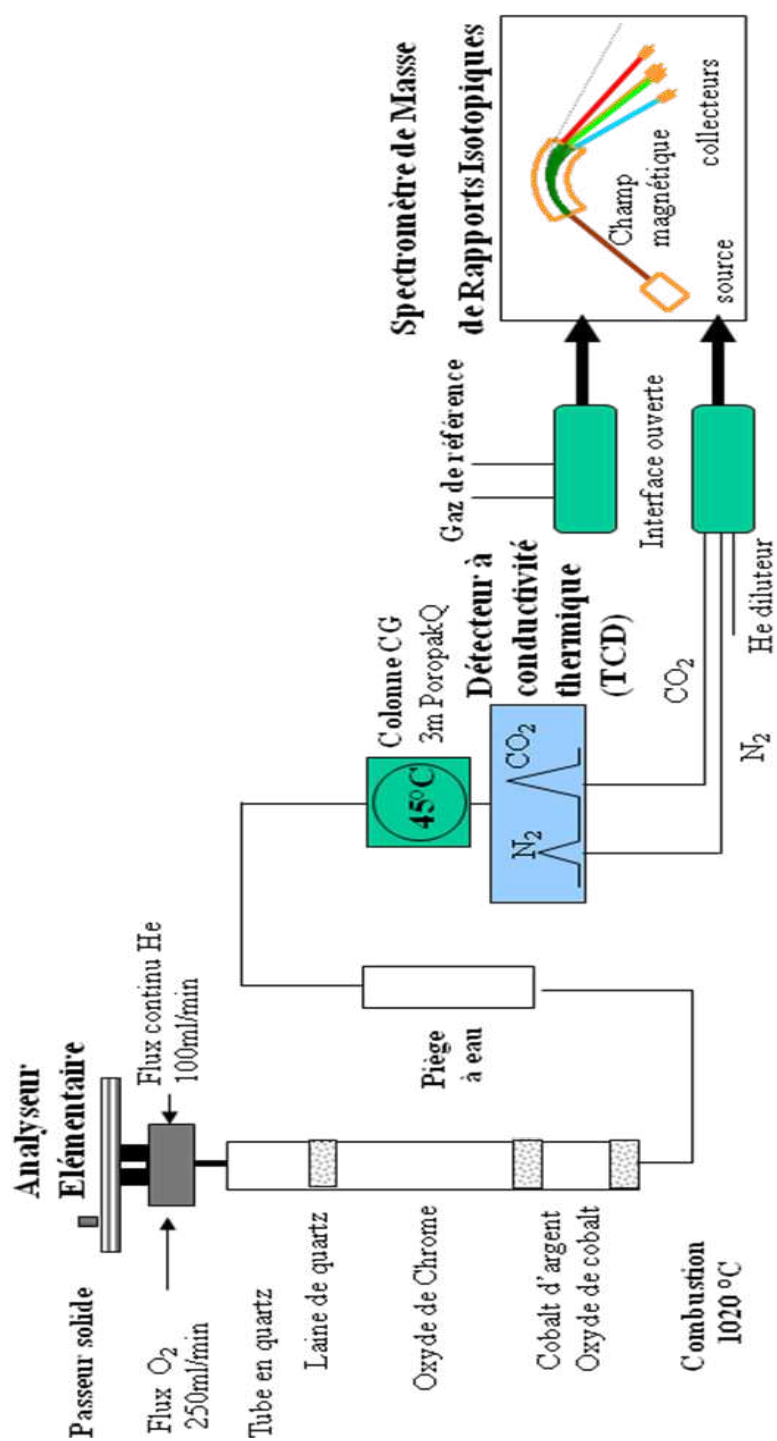
1.3.4 Spectrométrie de masse de rapports isotopiques

Les AIN en ^{15}N et ^{13}C sont déterminées en utilisant un Analyseur Élémentaire couplé à un irm-MS (Figure 14).

Les échantillons sont préparés (nettoyage pour les cheveux, lyophilisation pour les tissus solides, séparation de phases pour les tissus liquides) puis pesés sur une balance de précision et mis en capsules d'étain. Des tests préalables permettent de déterminer la masse cible de l'échantillon afin d'obtenir un pic permettant de rentrer dans le domaine de linéarité d'amplitudes de pic de l'appareil et d'avoir une homogénéité de mesure, soit environ $80\mu\text{g}$ d'azote. Les capsules sont préparées en duplicata ou triplicata et leur moyenne est prise en considération dans les résultats.

La capsule en étain est introduite grâce à un flux d'hélium et d'oxygène dans le four de combustion de l'analyseur élémentaire à 1020°C . A cette température, l'étain permet par sa sublimation, un transfert d'énergie à l'échantillon qui est oxydé très rapidement. La composition du four de combustion (oxyde de chrome, cuivre réduit, oxyde de cobalt et cobalt d'argent) et la quantité d'oxygène introduite permettent de transformer quantitativement l'échantillon en gaz N_2 , CO_2 et H_2O . Les gaz transportés par flux d'hélium passent au travers d'un piège à anhydride (perchlorate de magnésium $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) retenant l'eau. Les gaz N_2 et CO_2 sont ensuite séparés par une colonne de chromatographie gazeuse, puis sont introduits successivement dans l'irm-MS.

Figure 14 : Schématisation d'un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse de rapports isotopiques on line. D'après Tea (schéma personnel).



Le N₂ et le CO₂ produits au cours de la combustion de l'échantillon arrivent dans la source de l'irm-MS où ils sont ionisés par impact électronique à 120 eV (électron Volt), sous une pression de 10⁻⁶ mbar. Les ions moléculaires produits (N₂⁺ et CO₂⁺) sont accélérés par un potentiel de 3kV et sont projetés dans un champ magnétique uniforme. Ces ions sont ensuite déviés par ce champ magnétique de 0,75 Tesla et sont recueillis simultanément dans des collecteurs (cages de faraday). Les cages de faraday sont reliées à des amplificateurs et les courants produits sont proportionnels à la quantité respective de chaque espèce d'ions collectés.

Pour l'azote, il s'agit des isotopomères de masses atomiques 28, 29, 30 correspondant respectivement aux isotopes du diazote ¹⁴N-¹⁴N, ¹⁵N-¹⁴N, ¹⁵N-¹⁵N. De même pour le carbone, les isotopomères de masses atomiques 44, 45 et 46 sont détectés et correspondent respectivement aux isotopes du dioxyde de carbone ¹²C¹⁶O₂, ¹³C¹⁶O₂ ou ¹²C¹⁷O¹⁶O, ¹²C¹⁷O₂ ou ¹³C¹⁷O¹⁶O.

La teneur isotopique de l'échantillon est exprimée par le rapport isotopique R qui est la fraction de l'isotope le plus lourd sur l'isotope le plus léger soit ¹⁵N/¹⁴N et ¹³C/¹²C. Les résultats sont exprimés en valeur relative par rapport à une référence et exprimés en δ (‰) :

$$\delta (\text{‰}) = [(R_{\text{échantillon}} - R_{\text{référence}}) / R_{\text{référence}}] \times 1000$$

Les références internationales représentées dans la formule par R_{référence} sont l'azote atmosphérique pour le δ¹⁵N (R_{référence} = 0,0036765) et le carbonate Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) pour le δ¹³C (R_{référence} = 0,0112372).

Une valeur positive signifie une teneur plus élevée en isotope lourd que la référence, c'est-à-dire un enrichissement ; alors qu'une valeur négative exprime une teneur moins élevée en isotope lourd que la référence c'est-à-dire un appauvrissement.

La calibration pour $\delta^{15}\text{N}$ est effectuée avec le matériel de référence international IAEA (International Atomic Energy Agency) (http://nucleus.iaea.org/rpst/referenceproducts/referencematerials/Stable_Isotopes/index.htm) IAEA-N1 ($\delta^{15}\text{N} = 0,43 \pm 0,07 \text{ ‰}$) et IAEA-N2 ($\delta^{15}\text{N} = 20,41 \pm 0,12 \text{ ‰}$), et pour $\delta^{13}\text{C}$, NBS-22 ($\delta^{13}\text{C} = -30.03 \pm 0.05 \text{ ‰}$), Saccharose-C6 ($\delta^{13}\text{C} = -10.80 \pm 0.47 \text{ ‰}$), et IAEA-CH-7 ($\delta^{13}\text{C} = -32.15 \pm 0.05 \text{ ‰}$), via un standard du laboratoire d'acide glutamique dont les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ sont connus et stables, respectivement $-4,80 \pm 0,08\%$ et $-27,48 \pm 0,05\%$. La calibration avec cet acide aminé de référence est effectuée grâce à 2 échantillons au début de chaque série et tous les 10 échantillons afin de contrôler la qualité des mesures (éventuelle dérive de l'appareil au cours de la série) et pour donner des points de correction aux valeurs mesurées.

Le processus de recueil de données se fait grâce à un logiciel d'acquisition qui inclut la correction automatique pour la fraction ^{17}O de la masse 45 par la correction de Craig.

Les valeurs de pourcentages de carbone (%C) et d'azote (%N) sont calculées à partir du rapport d'aire sous la courbe du pic de l'échantillon sur le pic du standard de travail, l'acide glutamique. Le rapport C/N est le ratio %C/%N, calculé à partir des pourcentages de masse déterminés à partir de l'intensité intégrée des pics pour le CO_2 et le N_2 , et des masses des échantillons. Il permet de vérifier la bonne combustion et la bonne qualité de l'échantillon (contamination). Chez l'homme, ces valeurs doivent être comprises entre 2,9 et 3,8.

1.3.5 Possibilités de prélèvements

La mesure de l'AIN peut être effectuée sur de nombreux tissus d'intérêt. Nous avons d'abord travaillé sur les cheveux. Ce tissu est constitué de 95% de kératine, protéine riche en cystéine. La mélanine, autre protéine constituante du cheveu, est en quantité mineure. Le cycle du bulbe capillaire est composé de 3 phases : la phase anagène qui correspond à la pousse du

cheveu, la phase catagène ou phase de stagnation durant quelques semaines et la phase télogène qui comprend l'atrophie du bulbe du cheveu puis la chute de celui-ci en quelques jours. Ce cycle dure environ 2 à 5 ans, en grande partie lié à la durée de la phase anagène (111).

La vitesse moyenne de pousse du cheveu chez le sujet sain est de 0,8 à 1,3 centimètre par mois selon le sexe, l'ethnie et la région du scalp (112). Les phases des bulbes capillaires ne sont pas synchrones, un prélèvement va donc comporter des cheveux appartenant aux trois phases. Les cheveux en phase anagène représentent environ 88% de la chevelure mais certains facteurs peuvent faire varier ce taux (111). La principale cause de variation dépend de l'axe hypothalamo-hypophysaire, principalement des hormones sexuelles (testostérone et œstrogènes) (113,114). Ainsi il existe une augmentation saisonnière de la synchronisation des follicules capillaires en été. De plus, une augmentation de la sensibilité à la testostérone au niveau des papilles dermiques est responsable d'une atrophie du bulbe engendrant une calvitie chez l'homme (114). La grossesse, par le biais de l'augmentation des œstrogènes, entraîne une augmentation de la proportion de bulbes en phase anagène autour de 95% au cours des deuxième et troisième trimestres, et durant jusqu'à une semaine après l'accouchement. Par la suite, l'imprégnation hormonale diminue, les bulbes en phase anagène diminuant à 76% à 6 semaines et pendant les trois mois qui suivent l'accouchement se traduisant par une chute des cheveux (114). La prolactine pourrait également jouer un rôle en post-partum (115). L'IGF1 pourrait favoriser la phase anagène ainsi que la taille et le nombre de bulbes chez la souris et en culture cellulaire (116,117). Enfin les hormones thyroïdiennes ont également un rôle de régulation, augmentant la phase anagène en cas d'hyperthyroïdie et provoquant leur chute lors d'une hypothyroïdie (118).

Les cheveux sont un bon reflet des influences environnementales notamment nutritionnelles. Lors d'une MPE chronique, les cheveux perdent leur pigmentation, deviennent raides, épars, fins et cassants (119). Le diamètre du cheveu diminue ainsi que le pourcentage de cheveux en phase anagène alors que le pourcentage de cheveux en phase télogène augmente. Lors de la renutrition, les cheveux se recolorent. Lorsque ces phases se succèdent on obtient des cheveux « en drapeau » ou bandes claires et sombres alternent.

Le cheveu présente plusieurs avantages : 1) il s'agit d'un prélèvement non invasif, 2) c'est un marqueur intégré, pouvant retracer les événements antérieurs sur une période dépendant de la longueur du cheveu puisque les protéines servant à la synthèse de la kératine sont exclues du métabolisme, et 3) la composition du cheveu est stable dans le temps comme le suggèrent des mesures sur des momies et l'homme des glaces (74). Il n'existe pas de différence significative entre l'analyse des cheveux gris et les cheveux pigmentés (non gris). Le lavage des cheveux (shampooings) et la teinture n'influent pas sur la mesure (78). Seuls les colorants organiques (comme le henné) utilisés de manière intensive et l'eau oxygénée pourrait avoir un effet. Il ne semble pas y avoir d'effet de contamination environnementale de type pollution atmosphérique. Chez la souris, le poil apparaît être également un intégrateur du métabolisme protéique (120).

La kératine des ongles peut aussi être utilisée, avec les mêmes avantages que le cheveu (71). Le collagène osseux est un autre support d'étude isotopique mais pose des problèmes de stabilité à long terme et de possible altération isotopique à la phase précoce de conservation en milieu naturel (121). Ce prélèvement ne concerne que l'anthropologie car difficile d'accès chez le vivant.

Comme évoqué dans les études citées plus haut, les différents organes peuvent être analysés comme le foie, le muscle, la muqueuse intestinale. Enfin l'analyse du plasma permet d'avoir accès aux protéines et AA circulants et à l'urée pour la voie de dégradation (122).

2. TRAVAUX PUBLIES ET SOUMIS

2.1 Etudes de l'abondance isotopique naturelle en ^{15}N : bio-marqueur potentiel de l'état nutritionnel, et de la croissance chez l'enfant allaité

L'ensemble des analyses isotopiques a été effectué en collaboration avec les Drs R Robins et I Tea à l'UMR CNRS 6230 Université de Nantes (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation, Nantes).

2.1.1 Etude EDEN portant sur le nouveau-né, reflet de la période fœtale (Publiée)

Nous avons comparé l'AIN en ^{15}N des cheveux de nouveau-nés à ceux de leur mère dans la cohorte INSERM EDEN (Etude des Déterminants pré et post natals précoces du développement psychomoteur et de la santé de l'Enfant), INSERM UMRS 1018, Drs MA Charles, B Heude (<https://eden.vjf.inserm.fr/>). Ce projet a été financé par le PHRC Interrégional 2006.

Les valeurs de l'AIN en ^{15}N des cheveux des nouveau-nés étaient fortement corrélées à celles de leur mère. Ceci n'est pas surprenant puisque le fœtus dépend totalement de sa mère pour la disponibilité des nutriments, il paraît licite de penser que ces deux pools ont une interrelation constante. Cette corrélation correspond à la part de variation nutritionnelle de l'AIN en ^{15}N .

L'autre résultat majeur était que l'AIN en ^{15}N était systématiquement supérieure chez le nouveau-né par rapport à sa mère. Puisque le pool d'AA disponible pour le fœtus vient entièrement de sa mère, cette différence ne peut être expliquée que par une différence de renouvellement protéique qui permettrait de concentrer le ^{15}N lors de la synthèse protéique.

Ce travail a été publié dans *Pediatric Research*. La méthode a fait l'objet de publications de vulgarisation dans les cahiers de nutrition et de diététique afin de toucher et sensibiliser un public plus large et mettre l'accent sur les applications potentielles.

de Luca A, Boisseau N, Tea I, Louvet I, Robins RJ, Forhan A, Charles MA, Hankard R. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in hair from newborn infants and their mothers: a cohort study. *Pediatr Res* 2012; 71:598-604.

de Luca A, Tea I, Robins R, Charles MA, Hankard R. Des cheveux pour évaluer le métabolisme protéique chez l'homme. *Cah Nutr Diet* 2013;48:86-91.

$\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in hair from newborn infants and their mothers: a cohort study

Running title: $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in birth-hair

Arnaud de Luca, Nathalie Boisseau, Illa Tea, Isabelle Louvet, Richard J. Robins, Anne Forhan, Marie-Aline Charles, Régis Hankard*

Pédiatrie Multidisciplinaire-Nutrition de l'Enfant, [A.D.L.], Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Poitiers, 86021, France

Laboratoire des Adaptations Physiologiques aux Activités Physiques (LAPHAP) EA 3813, [N.B.], Faculté des Sciences du Sport, Poitiers, 86000, France

Elucidation of Biosynthesis by Isotopic Spectrometry Group, CNRS—University of Nantes Unit for Interdisciplinary Chemistry: Synthesis, Analysis, Modelling (CEISAM), UMR 6230, [I.T., I.L., R.J.R.] Nantes, 44322, France

Inserm, CESP Centre for Research in Epidemiology and Population Health, U1018, Team 'Epidemiology of obesity, diabetes and renal disease: lifelong approach', [A.F., M.A.C.], Villejuif, 94807, France

Inserm CIC 0802, [R.H.*], Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Poitiers, 86000, France

Corresponding author: Professor Régis Hankard, MD, PhD, Pédiatrie Multidisciplinaire-Nutrition de l'Enfant, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021

Poitiers Cedex, France, telephone: 33 5 49 44 49 18, fax: 33 5 49 44 40 16, e-mail:
r.hankard@chu-poitiers.fr

Financial support: The study was supported by a grant from the French Regional Hospital Program for Clinical Research (PHRC). A de Luca was supported by a grant from the Académie Nationale de Médecine and by two prizes from the French Foundation for Medical Research (Fondation pour la Recherche Médicale) and the French Pediatrics Society of West France (Société de Pédiatrie de l'Ouest-SPO and Société Française de Pédiatrie-SFP).

Author contributions: AD contributed to the collection and analysis of data and the writing of the manuscript. NB, IT, RR, AF, MAC contributed to the analysis of data and the writing of the manuscript. IL, IT contributed to the isotope analysis. RH contributed to the design of the experiment, collection and analysis of data, and the writing of the manuscript.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to report.

Category of study: clinical study

Word count of abstract: 191 words

Word count of manuscript: 4878 words

Keywords: hair, Isotope Ratio Mass Spectrometry, protein metabolism, nutrition, biomarker, fetal programming.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Protein intake in fetal life or infancy may play a key role in determining early growth rate, a determinant of later health and disease. Previous work has indicated that hair isotopic composition is influenced by diet and protein intake.

METHODS: This study analyses the isotopic composition of hair obtained from 239 mother/newborn pairs randomly selected within a larger cohort enrolled in a study of pre- and postnatal determinants of the child's development and health. The isotopic compositions in nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and in carbon ($\delta^{13}\text{C}$) were determined by isotope ratio mass spectrometry.

RESULTS: Mother and newborn hair $\delta^{15}\text{N}$ were tightly correlated (Pearson $r = 0.88$). The mean $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of hair from newborn infants were significantly higher than those for the mothers: 9.7 ± 0.7 versus $8.8 \pm 0.6\text{‰}$ ($P < 0.0001$) for $\delta^{15}\text{N}$ and -20.4 ± 0.4 versus $-20.0 \pm 0.4\text{‰}$ ($P < 0.0001$) for $\delta^{13}\text{C}$. Maternal hair $\delta^{15}\text{N}$ at parturition was slightly and positively correlated with estimates of protein intake ($r = 0.14$, $P = 0.04$).

DISCUSSION: Hair $\delta^{15}\text{N}$ of the fetus is both highly dependent on and systematically higher than that of the mother. Whether quantitative and qualitative protein intake, disease or hormonal status alter hair $\delta^{15}\text{N}$ at birth remains to be determined.

INTRODUCTION

Early life programming plays a major role in determining health and disease in later life (1). Unsatisfactory size at birth and/or weight gain velocity in childhood is linked to increased risk of onset of coronary events in adulthood (2). Birth-weight for gestational age (GA) is the main variable for fetal growth and adequacy of fetal nutrient intake (i.e. used to measure intrauterine growth retardation (IUGR) of placental origin, for instance). However, although several studies have reported an association between protein intake in infancy, growth velocity and fat mass development in children (3-5), there are currently no reliable simple indices for fetal protein intake. We know from animal studies that decreasing protein intake during gestation decreases birth-weight and shortens life span in mice (6) and also that increasing protein intake during gestation resulted in lower birth weight and higher fat mass at 3 months in rats (7). Furthermore, in IUGR caused by an experimentally low protein intake, amino acid transporter expression is affected before growth restriction, suggesting a causative effect of maternal nutrition (8). In humans, IUGR led to increased plasma amino acid concentrations in the mother coupled with decreased levels in the fetus (9), apparently due to impaired amino acid transfer from mother to fetus (10,11). Protein intake might modulate epigenetic modification of gene expression in the offspring (12-14).

What we seek therefore is a rapid and robust indirect method by which the protein transfer between mother and infant during gestation can be easily assessed. Isotopic values in hair may fulfill this need. It has been shown that the isotopic content of hair is quantitatively correlated with protein source (animal or vegetable) and intake (15,16) in animals and humans including pregnant women (17) and that the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of hair and fingernail tissue taken from newborn babies are related to those of their mothers (18). However, not only was there was a considerable degree of variability in the mother/infant pairs but the small population size makes it difficult to establish whether this tendency would be valid over a

wide population, as would be required were the relationship to be exploitable as a potential marker of nutritional status. Furthermore, the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of hair were only followed in one subject.

Considering that hair is the easier tissue to sample from newborn infants, we have, within the context of the EDEN mother-child cohort (prenatal and early postnatal determinants of child development and health), analyzed the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for hair samples randomly taken from 239 newborn babies and their mothers in order to assess correlations between isotopic values of mothers and children in a larger population than in previous publications and to study whether there is a relationship between maternal diet and the isotopic values.

MATERIALS AND METHODS

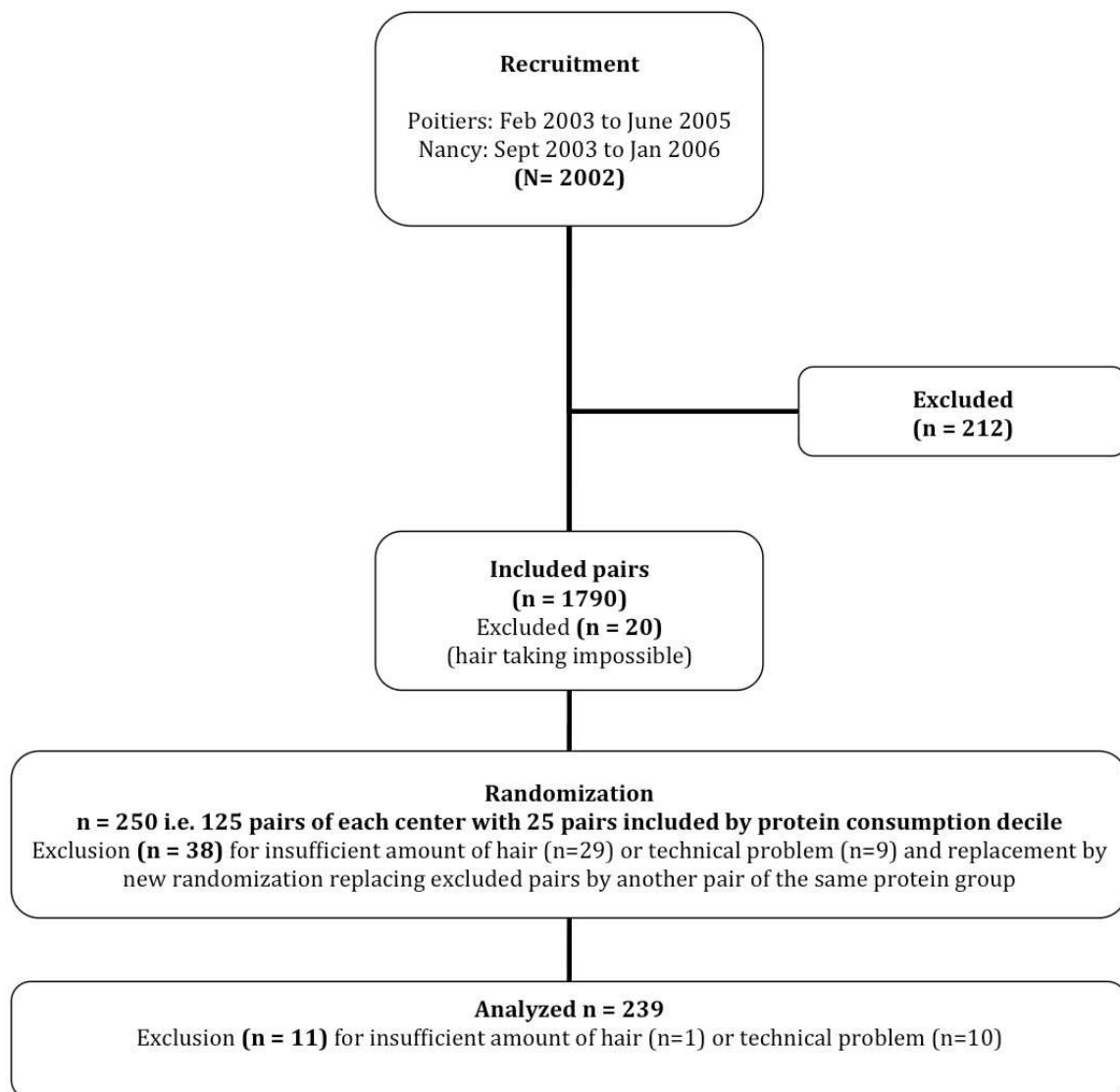
ETHICS STATEMENT

The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Study protocol was approved by the Ethics Committee of the Bicêtre hospital (Kremlin-Bicêtre, France) on 12 December 2002. Written consent was obtained from the mother for herself at inclusion and for her newborn child after delivery.

SUBJECTS

The EDEN mother-child cohort is a study of the prenatal and early post-natal determinants of child development and health from birth to five years (Fig. 1). Pregnant women seen for a prenatal visit between February 2003 and January 2006 at the Departments of Obstetrics and Gynecology of the University Hospitals of Nancy (France) and Poitiers (France) before 24 weeks of amenorrhea (WA) were invited to participate. Exclusion criteria were: twin pregnancies; known diabetes mellitus before pregnancy; French illiteracy, plan to move out of the district.

Figure 1. Inclusions flow chart



DIETARY DATA

A food frequency questionnaire was completed twice by each mother: one at recruitment, (on average 15 WA) and a second time during the first few days post-parturition. These allowed an estimation of food intake in the first and third trimester of pregnancy, respectively (19). Energy and nutrient intakes were computed from questionnaires with portion size determined using pictures (20) and the SU.VI.MAX nutrient composition database (21).

CLINICAL DATA

At a first visit performed between 24-28 WA by midwife research assistants, maternal height was measured with a wall stadiometer (Seca 206, Hamburg, Germany) to the nearest 0.2 cm and maternal weight was measured using electronic scales (Terraillon SL 351, Hanson Hemel Hempstead, UK) to the nearest 0.1 kg. Weight before pregnancy was obtained by interview. Pre-pregnancy body mass index (BMI) was computed by the standard formula. By reference to the International Obesity Task Force, overweight was defined as a BMI ≥ 25 kg/m² and obesity as a BMI ≥ 30 kg/m². Gestational age at delivery (determined from the date of the last menstrual period and early ultrasound assessment), newborn admission to a intensive care unit or neonatal unit, birth weight, length and head circumference were extracted from clinical records and mother's weight after delivery was obtained with the same protocol as above.

In the two obstetric departments, electronic Seca scales (Hamburg, Germany: Seca 737 in Nancy and Seca 335 in Poitiers) were used to measure newborn weight and a wooden somatometer (Testut, Béthune, France) to measure newborn length. Large-for-gestational-age (LGA) and small-for-gestational-age (SGA) neonates were defined as babies with a birth-weight respectively over the 90th percentile and below the 10th percentile of French gestational age and gender specific reference curves (22). Appropriate-for gestational age (AGA) neonates are defined as between the 90th and 10th percentile.

HAIR SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Hair samples were collected from 1770 pairs within the cohort. On the basis of the dietary data, the population was divided into ten equal groups according to protein intake. 250 pairs were randomly taken (125 from each center), with 25 pairs being included from each protein group. The choice of number of pairs ≈ 250 was calculated so as to show a correlation coefficient ≈ 0.2 with a power of 90% and an alpha risk of 5%. Eleven pairs were not included in the final data set due to technical problems with analysis.

Mother and baby hair samples were taken 3 days after birth. A tuft of hair was cut in the occipital area as close as possible to the scalp. We deliberately chose to analyze a ‘random’ sample of maternal hair so as not to bias the data towards a particular period of pregnancy. The longest hair present was selected and the hair root was not included. Samples were blind-coded with an identification number for the same pair, and labeled “M” or “E” to indicate mother or newborn baby, respectively. For infants, the complete hair sample, and for mothers a representative hair sample, were transferred to a small glass bottle and cut in small sections (1 mm or less). This sample was washed in cyclohexane (20 min) to remove sebum (lipids) and residue (e.g. shampoo). Residual traces of solvent were removed by evaporation at 45°C under a stream of pure nitrogen gas until completely dry. An aliquot of each sample (~0.6 mg, giving ~0.08 mg N) was weighed with 10^{-5} g precision (balance, Ohaus Discovery DV215CD, Pine Brook, New Jersey, USA) into two tin capsules (solids “light” 5x9 mm, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, <http://www.thermo.com>). Each hair sample was analyzed in duplicate (with a few exceptions where the infant sample mass was insufficient to prepare two capsules). When the total sample mass was <0.4 mg, the pair was excluded and replaced by new pair from the same protein group. 38 mother/child pairs required replacement, the substitute samples being selected by the same randomized procedure.

ISOTOPE ANALYSIS

The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios and the N and C % compositions were determined as described previously (14). Briefly, capsules containing hair samples were flash combusted in an oxygen atmosphere using an elemental analyzer (EA) Flash EA 1112 HT (Thermo Fisher Scientific) and the resultant gases (CO_2 and N_2) carried in a stream of He to a Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (IRMS) (Thermo Fisher Scientific) coupled on-line via a ConFlo III interface (Thermo Fisher Scientific). Following sample combustion, water was removed by a

Mg(ClO₄)₂ water trap and N₂ was completely separated from CO₂ using a Porapak Q gas chromatography column (Thermo Fisher Scientific). Ion currents were measured for *m/z* 28, 29, 30 and *m/z* 44, 45, 46, for N₂ and CO₂ respectively, from which the δ¹³C (‰) and δ¹⁵N (‰) values could be calculated. Stable isotope ratios were expressed as the δ¹³C (‰) and δ¹⁵N (‰) ratios relative to reference pulse peaks of laboratory CO₂ and N₂ respectively, calculated as follows:

$$\delta(\text{‰}) = \left(\frac{R}{R_{std}} - 1 \right) \times 1000$$

where *R* is the ¹³C/¹²C or ¹⁵N/¹⁴N isotope ratio of the sample and *R_{std}* is the ¹³C/¹²C isotope ratio of Vienna Pee Dee Belemnite reference standard (V-PDB) (*R_{std}* = 0.0112372) or of atmospheric N₂ (*R_{std}* = 0.0036765). Normalization was made using a working standard of glutamic acid defined as having an isotopic composition of δ¹⁵N = -4.80±0.08‰ and δ¹³C = -27.48±0.05‰ relative to these standards.

The C/N ratio was calculated in hair samples from the weight percentages determined from the integrated peak areas for CO₂ and N₂ from the mass spectrometer ion currents, and sample weights. The same working standard (glutamic acid) was used for the N and C weight % determinations.

STATISTICAL ANALYSIS

Data was initially processed using Microsoft Excel 2003. All statistical analyses were carried out using SAS 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC) on the AIX 5.1 platform (IBM, New York, NY). Pearson correlations and partial Pearson correlations taking into account center and gestational age were used to assess the strength of the association between mother or newborn δ¹⁵N and δ¹³C values, and anthropometry or diet, respectively. Confidence interval for correlation coefficients have been computed using the Fisher's *z* transformation. To study the

shape of the relationships, means of anthropometric variables were estimated by quartiles of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ (adjusted for potential confounders: i.e. gestational age and/or center) using multivariate general linear regression models

RESULTS

POPULATION

Mother and child characteristics did not differ between the Poitiers and Nancy populations (Table 1). Diet before pregnancy did not differ between these two centers. During the last 3 months of pregnancy: (i) carbohydrate intake expressed in g/day or % of daily energy intake (%DEI) was slightly higher in Poitiers than in Nancy; (ii) lipid intake (%DEI) was lower in Poitiers than in Nancy; (iii) vegetable protein intake (%DEI) decreased and lipid intake (%DEI) increased in both centers during the last 3 months of pregnancy. No significant difference was observed for any other parameter of the dietary record (Table 1).

Table 1. *Characteristics of the sample population*

Characteristic	Variable ^a	Population			<i>p</i> ^d
		Poitiers	Nancy	All	
	Sample size (n)	166 (69%)	73 (31%)	239	
Mother					
	Age (year)	29.6 (4.6)	29.3 (4.8)	29.5 (4.7)	NS
	BMI (kg/m ²)	23.3 (4.2)	23.1 (4.8)	23.2 (4.4)	NS
	Overweight (25-30) (%) ^b	19 (31)	19 (14)	19 (45)	NS
	Obese (≥ 30) (%) ^b	7 (12)	7 (5)	7 (17)	NS
	Weight gain (kg)	9.6 (5.6)	7.4 (4.0)	8.9 (5.3)	NS
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-20.2 (0.4)	-20.7 (0.3)	-20.4 (0.4)	**
	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	8.7 (0.7)	9.0 (0.5)	8.8 (0.6)	**
Newborn					
	Sex	64% (107)	52% (38)	61% (145)	NS

Gestational age (WA)	39.3 (1.7)	39.3 (1.2)	39.3 (1.6)	NS
Prematurity (<37 WA) ^b	4.8 (8)	1.4 (1)	3.8 (9)	NS
SGA ^b	7.8 (13)	9.6 (7)	8.4 (20)	NS
LGA ^b	9.6 (16)	12.3 (9)	10.5 (25)	NS
Weight (g)	3369 (513)	3281 (494)	3342 (508)	NS
Length (cm)	50.2 (2.3)	48.6 (2.1)	49.7 (2.3)	NS
Ponderal index (kg/m ³)	26.5 (2.4)	28.3 (3.0)	27.0 (2.7)	NS
Head circumference (cm)	34.7 (1.4)	34.5 (1.5)	34.6 (1.4)	NS
δ ¹³ C (‰)	-19.9 (0.4)	-20.2 (0.3)	-20.0 (0.4)	**
δ ¹⁵ N (‰)	9.5 (0.7)	10.0 (0.5)	9.7 (0.7)	**

**Last 3 months
of pregnancy**

				<i>p</i> ^e
Sample size (n)	146	69	215	
	2469.3	2345.4	2429.5	
Energy (kcal/day)	(787.7)	(658.3)	(749.3)	NS
		103.9	103.9	
Proteins - total (g/day)	103.8 (37.2)	(37.8)	(37.4)	NS
Proteins - vegetable (g/day)	26.3 (8.9)	25.0 (8.5)	25.9 (8.7)	NS
Proteins - animal (g/day)	77.5 (31.6)	79.0 (32.9)	78.0 (31.9)	NS
		240.1	264.5	
Carbohydrates (g/day)	276.1 (87.3)	(66.4)	(82.7)	NS
		106.7	105.4	
Lipids (g/day)	104.8 (40.4)	(37.9)	(39.6)	NS
Proteins - total (%DEI) ^c	16.9 (3.1)	17.6 (3.5)	17.1 (3.2)	NS
Proteins - vegetable (%DEI) ^c	4.3 (0.8)	4.3 (0.9)	4.3 (0.8)	**
Proteins - animal (%DEI) ^c	12.6 (3.2)	13.3 (3.6)	12.8 (3.4)	NS
Carbohydrates (%DEI) ^c	45.1 (5.9)	41.6 (6.8)	44.0 (6.4)	NS
Lipids (%DEI) ^c	37.8 (5.0)	40.4 (5.8)	38.6 (5.4)	*

^a Unless otherwise indicated, values are mean with SD in brackets

^b Values are % of population and n in brackets

^c Values are mean % of daily energy intake (DEI) with SD in brackets

^d Comparison between centers: NS $p \geq 0.05$ * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

^e Comparison of intakes before pregnancy and during the last 3 months of pregnancy: NS $p \geq 0.05$ * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

DEI: daily energy intake; LGA: Large for gestational age; NS: non significant; SGA: Small for gestational age; WA: weeks of amenorrhea.

VALIDATION OF THE PROTOCOL FOR THE MEASUREMENT OF $\delta^{15}\text{N}$ AND $\delta^{13}\text{C}$ IN HAIR BY EA-IRMS

The working sample mass range was determined using one maternal sample and varying the mass of pre-washed hair encapsulated (duplicate samples) from 0.1 to 0.8 mg in 0.1 mg increments. Loss of precision was seen below 0.4 mg (data not shown). Therefore, the sample cut-off was set at 0.4 mg and the mass target at 0.6 ± 0.08 mg.

Feasibility was tested with 3 mother/infant hair pairs, with and without pre-washing. Each pair was analyzed twice and the %C and %N determined. The overall means were $\%C = 45.6 \pm 0.3$, $\%N = 14.5 \pm 0.9$ and $C/N = 3.14 \pm 0.16$. No significant difference was seen for samples with or without prewashing (data not shown). However, for consistency, all samples were prewashed as described above.

Repeatability and precision were assessed with 10 samples of pre-washed hair from one mother. Values of $\delta^{13}\text{C} = -20.03 \pm 0.07\text{‰}$ (max 20.56‰; min 19.77‰) and $\delta^{15}\text{N} = 9.08 \pm 0.13\text{‰}$ (max 9.21‰; min 8.95‰) were obtained. The precision for the working standard was $\pm 0.08\text{‰}$ for both $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$. Therefore, an acceptable difference between 2 measurements of hair samples was set to 0.2‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 0.3‰ for $\delta^{15}\text{N}$ (95% confidence limit).

VALUES OF $\delta^{15}\text{N}$ AND $\delta^{13}\text{C}$ IN MOTHER/NEWBORN HAIR PAIRS BY EA-IRMS

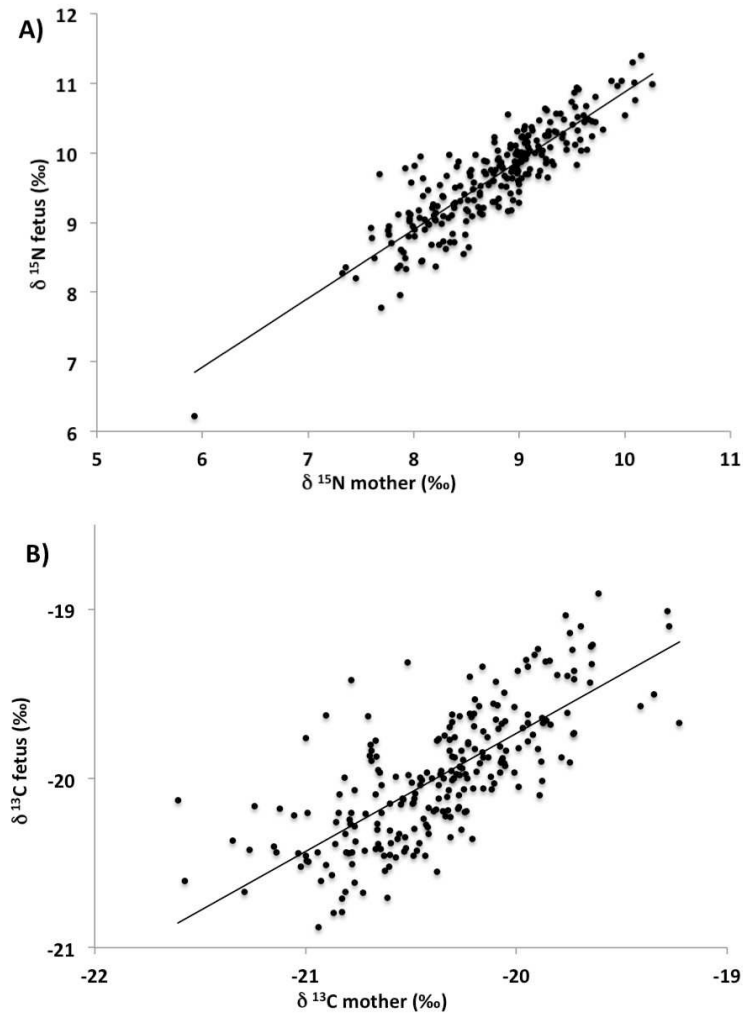
From the 250 pairs abstracted from the 1770 available samples in the EDEN cohort, 10 pairs with a technical problem and 1 with insufficient mass were not replaced, meaning that 239 pairs of hair samples were analyzed. These samples all gave measurements in the linear range of the spectrometer with homogeneous values. Samples falling outside the defined acceptable difference between 2 measurements were re-analyzed or replaced with another sample from the same protein-origin group.

Mean $\delta^{15}\text{N}$ for infant hair is systematically significantly higher than the mean $\delta^{15}\text{N}$ for the mother's hair ($p < 0.0001$): $\delta^{15}\text{N}_{\text{mother}} = 9.65 \pm 0.70\text{‰}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{infant}} = 8.76 \pm 0.62\text{‰}$. No case was recorded in which the $\delta^{15}\text{N}_{\text{infant}}$ was inferior to that of the $\delta^{15}\text{N}_{\text{mother}}$. Mean $\delta^{13}\text{C}$ for infant hair is systematically significantly higher than the mean $\delta^{13}\text{C}$ for the mother's hair ($p < 0.0001$): $\delta^{13}\text{C}_{\text{mother}} = -19.99 \pm 0.40\text{‰}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{infant}} = -20.36 \pm 0.42\text{‰}$. Only one $\Delta\delta^{13}\text{C}$ was recorded in which the $\delta^{13}\text{C}_{\text{infant}}$ was significantly lower than the $\delta^{13}\text{C}_{\text{mother}}$. As a way of verifying that the samples were not contaminated, the C/N ratios were evaluated. The mean values for mothers and infants are respectively 3.09 ± 0.16 and 2.95 ± 0.12 ($p < 0.0001$). In contrast to the isotope values, no significant correlation was seen for the C/N ratios of mother/infant pairs.

In both mother and newborn hair, mean $\delta^{15}\text{N}$ values were lower in the Poitiers population than in the Nancy population, whereas the opposite occurred for $\delta^{13}\text{C}$ (Table 1). We did not observe any effect of gender on the mean $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in hair from newborns in either the Poitiers or Nancy groups (data not shown).

Strong correlations were observed between mother/newborn pairs of data. The stronger correlation was for $\delta^{15}\text{N}$ (Fig. 2a: Pearson correlation coefficient $r = 0.88$ (0.84-0.90)) but a clear correlation was also observed for $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 2b: Pearson correlation coefficient $r = 0.74$ (0.68-0.79)). It was particularly noticeable that the one pair seen as an outlier in $\delta^{15}\text{N}$ still fits the mother/newborn correlation (Figs. 2a, b). The mean $\delta^{15}\text{N}$ for newborn hair was systematically higher than the mean $\delta^{15}\text{N}$ for mother's hair (Table 1). Similarly, the mean $\delta^{13}\text{C}$ for newborn hair was systematically higher than the mean $\delta^{13}\text{C}$ for the mother's hair (Table 1). In only one case was the $\delta^{13}\text{C}_{\text{newborn}}$ significantly lower than the $\delta^{13}\text{C}_{\text{mother}}$.

Figure 2. Correlation between (a) $\delta^{15}\text{N}$ (‰) values and (b) $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values for hair samples from mother/newborn pairs.



For $\delta^{15}\text{N}$ (‰), linear correlation is $y = 0.99x + 0.99$, $R^2 = 0.76969$, Pearson correlation coefficient $r=0.88$ (0.84-0.90). For $\delta^{13}\text{C}$ (‰), linear correlation is $y = 0.70x - 5.77$, $R^2 = 0.55018$, Pearson correlation coefficient $r=0.74$ (0.68-0.79). Confidence limits (95%) of the measurements are 0.2‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 0.3‰ for $\delta^{15}\text{N}$.

Isotope values were also compared for mother/infant pairs from SGA, AGA and LGA neonate populations. The birth weight of the SGA population ($n=20$) was significantly lower than for the AGA population ($n=219$): SGA birth weight 2582 ± 301 g versus AGA birth

weight 3412 ± 465 g ($p < 10^{-4}$) but this had no impact on the $\delta^{15}\text{N}$ value for hair (SGA $9.82 \pm 0.68\text{‰}$ versus AGA $9.63 \pm 0.71\text{‰}$, NS). Similarly, mothers of SGA children did not have a lower $\delta^{15}\text{N}$ than mothers of AGA children (8.90 ± 0.75 versus $8.78 \pm 0.61\text{‰}$, NS). Gestational age and age at birth of the mothers with SGA babies were not different to those of mothers of babies with an AGA weight. The BMI of mothers with an SGA child was lower than that of mothers of AGA children (20 ± 2 versus 24 ± 4 kg/m², $p < 0.001$) and their total energy intake during pregnancy was higher (2851 ± 1125 kcal/day versus 2396 ± 704 kcal/day, $p < 0.05$). No significant differences were observed between isotope values ($\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$) of hair in mother/infant pairs for LGA infants versus the AGA population.

In mothers but not in newborns, $\delta^{15}\text{N}$ was positively associated with estimates of intake of protein, specifically animal protein, and lipid during the last 3 months of the pregnancy (Table 2). The $\delta^{13}\text{C}$ in mothers and newborns was negatively associated with mean energy, carbohydrate and lipid intakes (Table 2). We did not observe any correlation between $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in mothers and newborns and estimates of energy, total and animal proteins, lipids and carbohydrates before pregnancy (data not shown). Head circumference was significantly smaller in newborns in the upper quartile of hair $\delta^{15}\text{N}$ values ($p = 0.004$ and $p = 0.06$ comparing the upper quartiles versus the three lower quartiles of, respectively, newborn and mother $\delta^{15}\text{N}$ values after adjustment for gestational age). Newborn hair $\delta^{15}\text{N}$ showed a negative correlation with gestational age (-0.14 ; Table 2) and children within the upper quartile were of lower gestational age at birth (38.9 ± 1.9 versus 39.5 ± 1.4 weeks, $p < 0.05$). No significant correlation was observed with any other parameter of fetal growth, although a negative trend was found with birth weight (Table 2).

Table 2. Partial correlations for hair $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and $\delta^{15}\text{N}$ (‰) in mothers and newborns

Characteristic		Correlation ^a			
		Mother		Newborn	
		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Mother					
	BMI (kg/m ²)	0.03 (0.61)	-0.03 (0.66)	0.06 (0.36)	0.01 (0.84)
	Weight gain (kg)	-0.12 (0.07)	-0.005 (0.94)	-0.04 (0.56)	-0.08 (0.21)
	Gestational age (WA)	-0.03 (0.60)	-0.14 (0.40)	0.06 (0.40)	-0.11 (0.09)
Newborn					
	Weight (g)	-0.03 (0.69)	-0.11 (0.10)	-0.07 (0.29)	-0.10 (0.16)
	Length (cm)	-0.01 (0.85)	-0.08 (0.22)	-0.02 (0.76)	-0.04 (0.51)
	Ponderal index (kg/m ³)	-0.02 (0.74)	-0.04 (0.56)	-0.08 (0.24)	-0.06 (0.33)
	Head circumference (cm)	0.036 (0.38)	-0.13 (0.05)	0.02 (0.80)	-0.13 (0.04)
Last 3 months of pregnancy					
	Energy (kcal/day)	-0.18 (0.01)	0.12 (0.08)	-0.15 (0.03)	0.09 (0.21)
	Proteins - total (g/day)	-0.02 (0.77)	0.14 (0.04)	-0.03 (0.61)	0.12 (0.08)
	Proteins - vegetable (g/day)	-0.06 (0.40)	0.08 (0.27)	-0.13 (0.05)	0.06 (0.36)
	Proteins - animal (g/day)	-0.007 (0.92)	0.14 (0.04)	-0.003 (0.96)	0.12 (0.07)
	Carbohydrates (g/day)	-0.20 (0.003)	0.05 (0.50)	-0.15 (0.03)	0.01 (0.92)
	Lipids (g/day)	-0.19 (0.01)	0.15 (0.03)	-0.16 (0.02)	0.12 (0.07)

^a Values are Pearson's correlation coefficient adjusted on centre and gestational age with *p* value in brackets. WA: weeks of amenorrhea.

DISCUSSION

The data obtained in this study yielded three main results. First, the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for individual mother/newborn pairs were strongly correlated. Secondly, the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for newborn hair were constantly higher than for the mother. Thirdly, a slight positive correlation between the $\delta^{15}\text{N}$ of mother's hair at parturition and the total protein intake in the last trimester of gestation was observed.

The $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of hair from newborns are strongly correlated with those of their mothers in the entire population tested. That the correlation is less strong for $\delta^{13}\text{C}$ is to be expected, since the carbon pool is influenced by glucose and lipid metabolism as well as protein, whereas the nitrogen pool is specific to protein metabolism. Because the fetus obtains its entire nutrient from the mother, this might at first sight not be surprising. However, the linear aspect of the correlation surprised us. The common belief is that fetal metabolism was the priority. If it were the case, we would expect a stronger relationship between maternal and fetal values for low values of $\delta^{15}\text{N}$ than for high values. A linear relationship suggests that fetal protein metabolism might be directly determined by the mother.

Whether mother's protein intake may affect fetal protein metabolism and growth remains to be tested. It must be emphasized that the present study aimed at establishing whether there exists a robust correlation between maternal protein intake and $\delta^{15}\text{N}$ from mothers and newborns hair within the normal population. The correlation was not found for newborn $\delta^{15}\text{N}$. Many factors (level of protein intake, protein % derived from vegetal or animal sources, energy intake, nutritional status, whole body protein turnover in each mother and child pair) were not controlled in this cross-sectional observational study and could have their own effect on fetal protein metabolism and ^{15}N transfer to hair protein. In addition, we were not able to detect an association between fetal growth restriction and $\delta^{15}\text{N}$. This warrants further studies

in pregnant animals in order to determine how maternal nutrition and IUGR determine ^{15}N transfer from mother to fetus.

Less obvious, however, is why the $\delta^{15}\text{N}$ values for hair were consistently higher in newborns than in their own mothers. Since the amino acid pool of the fetus comes entirely from that of the mother, it might be expected that these two pools would be at equilibrium. However, as pointed out by several authors (16), this observation is compatible with the well-described trophic effect: that the $\delta^{15}\text{N}$ value for protein increases through the food chain from plants to herbivores to omnivorous species like humans (15,16).

The factors leading to differential $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ retention in omnivorous species need to be further studied, but a number of mechanisms have been put forward. It has been suggested that hepatic transamination favors ^{15}N retention in body proteins (23). Studies using amino acids labeled with stable isotopes showed that leucine (24,25) or glutamine (26-28) turnover were higher in premature babies than in term babies as well as adults. It can be speculated that the high protein turnover of the fetus may augment transamination, thus favoring ^{15}N retention.

In mothers, an increase in nitrogen retention in the later stages of gestation, a decrease in urea excretion and synthesis (29,30) and a decrease of branched-chain amino acid transamination (31) will all act to lower the $\delta^{15}\text{N}$ in hair of mothers and increase the differential between a mother and her offspring. This is consistent with a study showing a decrease in $\delta^{15}\text{N}$ of maternal hair throughout pregnancy (17) and with studies of eating disorders (32) and digestive malfunction (33) both of which lead to depletion in ^{15}N .

Head circumference at birth was smaller in babies within the upper quartile of ^{15}N . This intriguing observation persists when data are adjusted to gestational age. The effect of maternal protein intake on brain development is poorly documented. A recent article showed that a 30% reduction in total energy intake resulted in structural abnormalities of the brain without any change in brain mass (34). On the other hand, a 10g/day increase in protein intake

led to an 18 g reduction in birth-weight without any observed change in head circumference (35). While clearly observational studies like ours cannot test the effect of protein intake on brain development, they do support a need for further investigations, initially through animal studies. Others nutrients, such as fatty acids, are associated with food proteins and their impact needs to be taken into account.

The slight correlation between stable isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) in mothers' hair and dietary protein intake during the last three months of pregnancy is, in contrast, readily explained. Such correlations exist because the $\delta^{15}\text{N}$ values of the food intake are influenced by the nature of the protein source consumed. Thus, vegans (people who do not eat any animal-derived food) have a low $\delta^{15}\text{N}$ relative to the average for the population, while vegetarians (people who do not eat any animal food) have values mid-way between vegans and omnivores (15). In accordance, we found a significant correlation mainly with proteins of animal origin. The value of the correlation coefficient (0.14) is not very high since food frequency questionnaires do not allow a precise measurement of nutrient intake and this finding needs further investigation. The present study is observational and establishes that the correlation previously indicated (15-17) is robust within a large population. Thus, thanks to the large cohort available, this study suggests that hair $\delta^{15}\text{N}$ values show promise as a nutritional biomarker in European *post partum* mothers and their newborn babies, for example, in potentially estimating the impact of maternal protein intake on fetal growth in normal and obese women (36). Controlled studies are now necessary to test the direct impact of protein intake on $\delta^{15}\text{N}$ of mothers' hair and newborns.

Acknowledgements

We thank all members of the EDEN mother-child study group for their invaluable input to this study. Special thanks to Pr Dominique Darmaun for his helpful and critical comments on this manuscript.

REFERENCES

1. Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
2. Barker DJP, Osmond C, Forsén TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med* 2005;353:1802-9.
3. Rolland Cachera MF, Deheeger M, Akrouit M, Bellisle F. Influence of macronutrients on adiposity development: a follow up study of nutrition and growth from 10 months to 8 years of age. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:573–8.
4. Günther AL, Buyken AE, Kroke A. The influence of habitual protein intake in early childhood on BMI and age at adiposity rebound: results from the DONALD Study. *IJO* 2006;30:1072-9.
5. Koletzko B, von Kries R, Closa R, et al. Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2 y: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1836-45.
6. Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 2004;427:411-2.
7. Daenzer M, Ortmann S, Klaus S, Metges CC. Prenatal high protein exposure decreases energy expenditure and increases adiposity in young rats. *J Nutr* 2002;132:142-4.
8. Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, et al. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol* 2006;576:935-46.
9. Cetin I, Ronzoni S, Marconi AM, et al. Maternal concentrations and fetal-maternal concentration differences of plasma amino acids in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1575-83.

10. Paolini CL, Marconi AM, Ronzoni S, et al. Placental transport of leucine, phenylalanine, glycine, and proline in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5427-32.
11. Marconi AM, Paolini CL, Stramare L, et al. Steady state maternal-fetal leucine enrichments in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pediatr Res* 1999;46:114-9.
12. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998;351:173-7.
13. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 2008;359:61-73.
14. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005;135:1382-6.
15. Petzke KJ, Boeing H, Klaus S, Metges CC. Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *J Nutr* 2005;135:1515-20.
16. Petzke KJ, Fuller BT, Metges CC. Advances in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:532-40.
17. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, Harris DA, O'Connell TC, Hedges RE. Nitrogen balance and delta ^{15}N : why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2889-96.
18. Fuller BT, Fuller JL, Harris DA, Hedges RE. Detection of breastfeeding and weaning in modern human infants with carbon and nitrogen stable isotope ratios. *Am J Phys Anthropol* 2006;129:279-93.

19. De Lauzon B, Romon M, Deschamps V, et al. The three-factor eating questionnaire-R18 is able to distinguish among different eating patterns in a general population. *J Nutr* 2004;134:2372-80.
20. Deschamps V, de Lauzon-Guillain B, Lafay L, Borys J, Charles M, Romon M. Reproducibility and relative validity of a food frequency questionnaire among French adults and adolescents. *Eur J Clin Nutr* 2009;63:282-91.
21. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, et al.. Background and rationale behind the SU.VI.MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. *Int J Vit Nutr Res* 1998;68:3–20.
22. Mamelle N, Munoz F, Grandjean H. Fetal growth from the AUDIPOG study. I. Establishment of reference curves. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1996;25:61–70.
23. Macko SA, Fogel Estep ML, Engel MH, Hare PE. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta* 1986;50:2143-6.
24. Denne SC, Karn CA, Liechty EA. Leucine kinetics after a brief fast and in response to feeding in premature infants. *Am J Clin Nutr.* 1992;56:899-904.
25. Beaufrere B, Putet G, Pachiaudi C, Salle B. Whole body protein turnover measured with ¹³C-leucine and energy expenditure in preterm infants. *Pediatr Res* 1990;28:147-52.
26. Hankard R, Goulet O, Ricour C, Rongier M, Colomb V, Darmaun D. Glutamine metabolism in children with short-bowel syndrome: a stable isotope study. *Pediatr Res* 1994;36:202-6.

27. Des Robert C, Le Bacquer O, Piloquet H, Rozé JC, Darmaun D. Acute effects of intravenous glutamine supplementation on protein metabolism in very low birth weight infants: a stable isotope study. *Pediatr Res* 2002;51:87-93.
28. Hankard RG, Haymond MW, Darmaun D. Effect of glutamine on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 1996;271:E748-54.
29. McClelland IS, Persaud C, Jackson AA. Urea kinetics in healthy women during normal pregnancy. *Br J Nutr* 1997;77:165-81.
30. Mojtahedi M, de Groot LC, Boekholt HA, van Raaij JM. Nitrogen balance of healthy Dutch women before and during pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1078-83.
31. Kalhan SC. Protein metabolism in pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1249S-55S.
32. Hatch KA, Crawford MA, Kunz AW, et al. An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in hair. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:3367-73.
33. Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, Metges CC. Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:2973-8.
34. Antonow-Schlorke I, Schwab M, Cox LA et al. Vulnerability of the fetal primate brain to moderate reduction in maternal global nutrient availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:3011-6.
35. Andreasyan K, Ponsonby AL, Dwyer T, et al. Higher maternal dietary protein intake in late pregnancy is associated with a lower infant ponderal index at birth. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:498-508.
36. Mok E, Multon C, Piguel L, et al. Decreased full breastfeeding, altered practices, perceptions, and infant weight change of prepregnant obese women: a need for extra support. *Pediatrics* 2008;121:e1319-24.

Des cheveux pour évaluer le métabolisme protéique chez l'homme

Hair to assess protein metabolism in human

Arnaud de Luca¹, Illa Tea², Richard Robins², Marie-Aline Charles³, Régis Hankard¹

¹Pédiatrie Multidisciplinaire-Nutrition de l'Enfant, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France ; Inserm CIC 0802, CHU Poitiers, BP 577, 86021 Poitiers, France

²Equipe « Elucidation de Biosynthèse et Spectrométries Isotopiques », CNRS — Unité de l'Université de Nantes pour Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM), UMR CNRS 6230, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, Nantes 44322, France

³Inserm, Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations (CESP), URMS 1018, Equipe « Epidémiologie du Diabète, de l'Obésité et des Maladies Rénales : Approche 'Vie Entière' », Villejuif, France

*Auteur correspondant : *Pr Régis Hankard*, Pédiatrie Multidisciplinaire – Nutrition de l'Enfant, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 2 rue Milétrie, 86021 Poitiers Cedex, France.

Téléphone: 05 49 44 49 18, fax: 05 49 44 40 16, e-mail: regis.hankard@inserm.fr

RESUME

L'estimation du métabolisme protéique par perfusion d'acides aminés marqués par des isotopes stables, non radioactifs, est une méthode employée en recherche clinique et difficile à mettre en œuvre au lit du patient pour adapter l'apport protéique. Il manque un marqueur simple, fiable et non invasif utilisable en clinique. Nous nous sommes tournés vers la mesure de l'enrichissement naturel en azote 15 du cheveu comme index de la synthèse de kératine, la protéine du cheveu. Le cheveu est coupé à sa base, préparé puis soumis à une combustion totale avant que les gaz produits soient analysés par spectrométrie de masse de rapports isotopiques (SMRI). Plus le métabolisme protéique est intense plus l'enrichissement naturel dans le cheveu est élevé à cause d'un « effet isotopique ». Nous avons récemment montré que l'enrichissement du cheveu du nouveau né était plus élevé que celui de sa mère traduisant l'intensité du métabolisme protéique fœtal. Nous travaillons actuellement sur les mécanismes qui modulent l'enrichissement en isotopes stables au sein de protéines d'intérêt. Les applications sont multiples en clinique humaine (épidémiologie nutritionnelle des populations, nutrition de l'homme malade).

Mots clés : Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques, nutrition, métabolisme protéique, biomarqueur, isotope stable

ABSTRACT

Perfusing stable (non radioactive) isotope labeled amino acids is used in clinical research to assess protein metabolism. However it is difficult to apply in clinical practice to adapt protein intake in diseases. A simple, reliable, non-invasive and suitable for clinical use biomarker is missing. We focused on hair ^{15}N hair content as an index of keratin synthesis (the hair protein). Hair is cut close to the scalp, prepared then totally combusted before isotope ratio mass spectrometry analysis. The more intense protein metabolism is, the higher ^{15}N hair content is, because of “isotopic effect”. We recently showed that ^{15}N hair content of the newborn was higher than that of his mother, suggesting a more intense fetal protein metabolism. We are currently working on mechanisms involved in stable isotope natural content of proteins of interest in nutrition. There are many human clinical applications like population’s nutritional epidemiology, nutrition in pathology.

Keywords: Isotope Ratio Mass Spectrometry, nutrition, biomarker, stable isotope, protein metabolism

1. INTRODUCTION

Il est difficile d'adapter l'apport azoté aux besoins des patients en l'absence de marqueur du catabolisme protéique fiable et non invasif. Cela concerne les patients en nutrition entérale ou parentérale et tout particulièrement en situation de stress métabolique (réanimation, maladies chroniques...). L'apport azoté relève le plus souvent d'un certain empirisme en extrapolant les besoins à partir de références qui concernent l'homme sain (1,2).

La principale voie d'élimination de l'azote des protéines est l'urée (les pertes fécales et cutanées sont hors du champ de ce travail). L'azote des acides aminés issus du catabolisme protéique est transformé au niveau hépatique en urée qui est ensuite éliminée dans les urines après filtration rénale. La dégradation protéique (catabolisme) est accrue dans de nombreuses maladies (stress de toute nature, infection, traumatisme, ...) et s'accompagne d'une production accrue d'urée.

La mesure de l'excrétion urinaire d'urée peut être utilisée en clinique dans le bilan azoté qui donne accès à un reflet global du métabolisme protéique à court terme, sans pouvoir attribuer une variation à la synthèse, la dégradation protéique ou les deux. Il nécessite un recueil urinaire scrupuleux difficile à mettre en place en dehors des soins intensifs et est sujette à de nombreuses sources d'erreur (3). La mesure du périmètre musculaire, permet de suivre la perte de masse musculaire mais elle est trop peu sensible pour une adaptation au jour le jour.

La production d'urée comme d'autres substrats azotés peut être mesurée à l'aide de substrats marqués par des molécules marquées notamment par des isotopes stables (4). Les principes en

seront rapidement exposés pour aborder l'intérêt de la mesure de l'enrichissement naturel en isotopes stables dans des molécules d'intérêt.

1.1 Principes chimiques

Un élément de la classification périodique, qui se caractérise par son nombre de charge « Z », peut se présenter sous différentes formes appelées « **isotopes** » qui ne diffèrent que par leur nombre de neutrons et donc leur masse atomique. Le ^{15}N est un isotope stable, non radioactif, de l'azote 14 qui est prépondérant dans la nature. Il est présent à l'état naturel en petites quantités (0,4%) dans notre alimentation et nos tissus.

Une même molécule, de même formule chimique, peut contenir des isotopes différents : il s'agit d'**isotopologues**. Par exemple la ^{15}N -urée est un isotopologue de l'urée ou ^{14}N -urée. Au sein d'une même molécule, un isotope peut se trouver à différents endroits. Par exemple un azote 15 peut se trouver en position 2 (fonction amine) ou 5 (fonction amide) au sein d'une molécule de glutamine ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$) et former deux **isotopomères** de la glutamine.

Pour une même molécule, la différence de masse moléculaire peut être mise en évidence par spectrométrie de masse qui détermine le rapport d'abondance entre l'isotope le plus lourd sur l'isotope le plus léger soit $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. L'utilisation d'une référence internationale permet de comparer le rapport isotopique de l'échantillon à celui de la référence et d'obtenir ainsi une grande précision des résultats qui sont exprimés dans l'échelle relative δ (‰). Une valeur positive signifie une teneur plus élevée en isotope lourd que la référence, c'est-à-dire un enrichissement ; alors qu'une valeur négative exprime une teneur moins élevée en isotope lourd que la référence c'est-à-dire un appauvrissement.

L'utilisation des « isotopes » permet de « tracer » les métabolismes c'est à dire de suivre de façon dynamique l'apparition ou la disparition d'une molécule dans l'organisme en administrant à un débit connu cette même molécule marquée avec un isotope stable. La mesure de l'enrichissement naturel, sans administration de molécule marquée, en tel ou tel isotope au sein d'une molécule donne aussi des informations précieuses en nutrition.

1.2 Utilisation des isotopes en anthropologie

La mesure de l'abondance naturelle en ^{15}N a permis d'estimer ce que mangeait l'homme des glaces il y a plus de 5000 ans (5) et de suivre l'évolution de la consommation de protéines au cours de l'évolution (6,7).

1.3 Utilisation des cheveux

Le cheveu est constitué par 95% de kératine qui est une protéine riche en cystéine. L'évolution naturelle du cheveu comporte trois phases principales : la phase anagène qui représente la pousse, la phase catagène qui est une phase de stagnation ou de plateau durant quelques semaines, et la phase télogène qui comprend l'atrophie du bulbe du cheveu puis la chute de celui-ci en quelques jours. Ce cycle dure environ 2 à 5 ans (8). La pousse normale du cheveu est d'environ 1 centimètre par mois et varie peu. Il existe une variation saisonnière et une influence des hormones sexuelles (estrogènes et testostérone) qui influencent seulement le pourcentage de cheveux en phase anagène (9).

Les cheveux sont un bon reflet des influences environnementales notamment nutritionnelles. Lors d'une dénutrition chronique, les cheveux perdent leur pigmentation, ils deviennent raides, épars, fins et cassants (10). Le diamètre du cheveu diminue ainsi que, le pourcentage de cheveux en phase anagène alors que le pourcentage de cheveux en phase télogène

augmente. Lors de la renutrition, les cheveux se recolorent. Lorsque ces phases se succèdent on obtient des cheveux « en drapeau » ou bandes claires et sombres alternent.

La kératine, une fois synthétisée dans le cheveu, est métaboliquement inerte et n'est plus en interaction avec le pool d'acides aminés. La section du cheveu à une distance précise de la racine permet donc d'obtenir un reflet du métabolisme d'une période précise, d'autant plus récente que le segment de cheveu est proche de la racine. Par exemple, des segments de cheveux sectionnés entre 0 et 1 cm de la racine reflètent le dernier mois alors qu'une section de segments entre 5 et 6 cm de la racine reflète la situation métabolique 5-6 mois avant le prélèvement. Cette méthode garde une mémoire du métabolisme protéique le long du cheveu tout comme les cernes du tronc permettent d'estimer l'âge d'un arbre.

Le prélèvement de cheveux n'est pas invasif et permet une analyse fiable des rapports isotopiques. Il permet d'intégrer l'influence du régime alimentaire sur une période qui dépend de la longueur de cheveu analysée. La composition du cheveu est stable dans le temps comme le suggèrent des mesures sur des momies et l'homme des glaces (11). L'origine ethnique, le grisonnement, le lavage des cheveux (shampooings) et la teinture n'influent pas sur la mesure (12). Seuls les colorants organiques (comme le henné) utilisés de manière intensive et l'eau oxygénée pourrait avoir un effet (12). Il ne semble pas y avoir d'effet de contamination environnementale de type pollution atmosphérique.

1.4 Facteurs de variation des teneurs en ^{15}N et autres isotopes

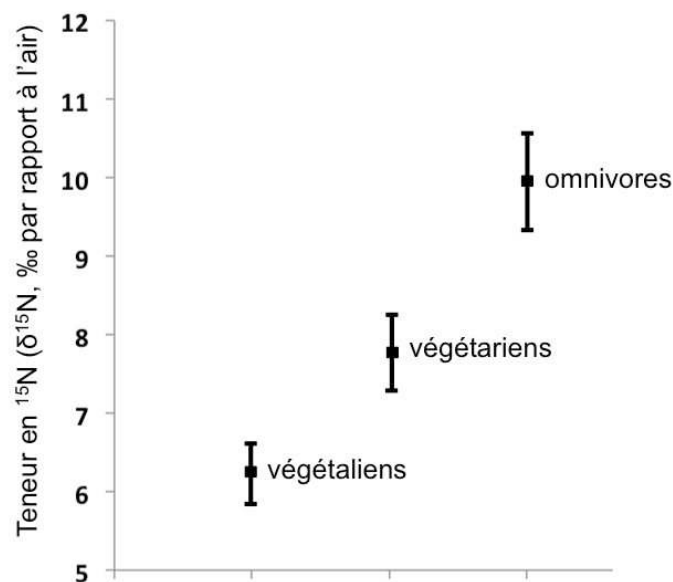
1.4.1 Impact général du régime alimentaire

Un enrichissement croissant en ^{15}N est observé en montant dans la chaîne alimentaire, c'est l'effet trophique ou « trophic level effect » des anglo-saxons (13). Les teneurs les plus élevées sont retrouvées chez l'homme car il est au sommet de la chaîne alimentaire.

1.4.2 Facteurs de variation de $\delta^{15}\text{N}$

L'enrichissement naturel en ^{15}N est plus élevé lorsque l'on consomme des protéines (12). Les végétaliens ont les teneurs les plus basses et les omnivores les teneurs les plus élevées (Figure 1). L'enrichissement naturel en ^{15}N est plus élevé lorsque les protéines proviennent de poissons plutôt que d'animaux terrestres (14).

Figure 1 : Teneurs en ^{15}N selon le type de régime alimentaire. Enrichissement progressif avec un régime de plus en plus carnivore. D'après Petzke et al. (12)



Un accroissement de l'enrichissement naturel en ^{15}N de l'ordre de 3‰ est retrouvé pour chaque pallier de niveau trophique de la chaîne alimentaire. L'effet trophique serait en partie lié à l'intensité des transaminations qui transfèrent l'azote aminé d'un acide aminé à un acide cétonique au niveau hépatique (15,16). L'utilisation préférentielle d'un isotopologue en fonction de l'intensité d'une réaction chimique constitue le fractionnement isotopique (17). On distingue un **effet isotopique cinétique** pour des réactions chimiques irréversibles non

totales et un **effet isotopique thermodynamique** en situation de réactions réversibles. Cette propriété permettrait d'estimer l'intensité du renouvellement protéique chez l'homme sain et malade.

1.4.3 Autres isotopes : le carbone 13

La teneur en ^{13}C augmente également en montant la chaîne alimentaire (12). L'enrichissement est d'environ 1‰ par niveau (14). L'intérêt de la mesure de l'enrichissement naturel en ^{13}C ne sera pas abordé ici sauf pour illustrer l'effet isotopique.

L'enrichissement naturel en ^{13}C plus élevé chez les plantes dites en C_4 (entre -15‰ et -11‰) par rapport aux plantes en C_3 (entre -32‰ et -23‰) alors que l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 ambiant est de l'ordre de -8‰ (14). L'effet isotopique qui favorise l'incorporation de ^{13}C par rapport au ^{12}C au cours de la photosynthèse des plantes en C_4 est en partie lié au couplage de la carboxylation (menant à des composés organiques) à un cycle dépendant de l'enzyme malique et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Les plantes en C_4 comprennent le maïs, le sorgho, le mil et le sucre de canne et les plantes en C_3 comprennent le blé, l'orge, le soja, les pommes de terre, les fruits et légumes. Les Européens consomment moins de plantes en C_4 (maïs principalement) que les Américains du Nord, aussi leur enrichissement naturel en ^{13}C est inférieur.

L'objet de cet article est de présenter au lecteur la mesure de l'enrichissement naturel en ^{15}N , comme index du métabolisme protéique chez l'homme.

2. METHODE D'ANALYSE

2.1 Collection et préparation des échantillons

Les cheveux sont coupés au plus près du cuir chevelu dans la région occipitale puis nettoyés (éthyl-acétate puis cyclohexane) afin d'éliminer le sébum (lipides) et les dépôts. Le solvant est éliminé par évaporation puis les cheveux sont coupés en petites sections de moins d'un millimètre. Les échantillons sont ensuite pesés et mis dans des capsules en étain.

Nous avons effectué des tests de validation de protocole sur la faisabilité et la répétabilité permettant de déterminer une masse cible de $0,6 \pm 0,08$ mg. Ces masses permettent de rentrer dans le domaine de linéarité d'amplitudes de pic de l'appareil et d'avoir une homogénéité de mesure.

2.2 Analyse isotopique

Les teneurs en ^{15}N et ^{13}C des échantillons de cheveux sont déterminées en utilisant un Analyseur Élémentaire couplé à un Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques (SMRI) (18).

La capsule en étain contenant les cheveux est introduite dans le four de combustion de l'analyseur élémentaire à 1020°C . A cette température, l'étain permet par sa sublimation, un transfert d'énergie à l'échantillon de cheveux qui est oxydé très rapidement. Ceci permet de transformer quantitativement l'échantillon de cheveux en gaz N_2 , CO_2 et H_2O . Après piégeage de l'eau, les gaz N_2 et CO_2 sont séparés, puis introduits successivement dans le SMRI.

Le N_2 et le CO_2 sont ionisés puis déviés par un champ magnétique et recueillis simultanément dans des collecteurs (cages de faraday). Les cages de faraday sont reliées à des amplificateurs et les courants ioniques produits sont proportionnels à la quantité respective de chaque espèce d'ions collectés.

La teneur isotopique de l'échantillon est exprimée par le rapport isotopique R qui est la fraction de l'isotope le plus lourd sur l'isotope le plus léger soit $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Les résultats sont exprimés en valeur relative par rapport à une référence et exprimés en δ (‰) :

$$\delta \text{ (‰)} = [(R_{\text{échantillon}} - R_{\text{référence}}) / R_{\text{référence}}] \times 1000$$

Les références internationales représentées dans la formule par $R_{\text{référence}}$ sont l'azote atmosphérique pour le $\delta^{15}\text{N}$ ($R_{\text{référence}} = 0,0036765$) et le carbonate Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) pour le $\delta^{13}\text{C}$ ($R_{\text{référence}} = 0,0112372$) (19).

3. APPLICATION EN NUTRITION HUMAINE

La mesure de l'enrichissement naturel en ^{15}N dans une protéine ou molécule azotée pourrait constituer un index de leur synthèse. Les applications potentielles de cette méthode sont multiples. Une revue de la littérature récente a été publiée sur la mesure de l'enrichissement naturel en isotopes stables dans l'évaluation du métabolisme protéique et de l'état nutritionnel (20). A ce jour, il existe peu d'articles publiés chez l'homme sain et malade.

L'enrichissement naturel en ^{15}N varie selon l'intensité du métabolisme protéique. Par exemple, un appauvrissement en ^{15}N est décrit chez des patients souffrant d'insuffisance hépatocellulaire par rapport à des sujets contrôles (21). A l'opposé nous avons observé sur 250 paires mère-enfant un enrichissement systématique de l'ordre de 1‰ des cheveux du nouveau-né à J3 par rapport à sa mère (Cohorte Inserm EDEN-Etude des Déterminants pré et post-natals du développement et de la croissance de l'ENfant) (22) alors que les acides aminés engagés dans la synthèse de kératine proviennent d'un même contenu, celui de la mère. De même nous observons une diminution de l'enrichissement naturel en ^{15}N entre la pointe et la racine du cheveu prélevé à un mois chez des enfants allaités exclusivement (M Frasquet et al., données non publiées). Dans cette dernière étude, la pointe représente le métabolisme

protéique fœtal et la racine le premier mois de vie. Ces deux observations suggèrent un métabolisme protéique d'autant plus intense que le sujet est jeune et une diminution avec l'âge ce qui corrobore des résultats obtenus par perfusion de substrats marqués par des isotopes stables (23).

L'enrichissement naturel en ^{15}N est en partie déterminé par la composition de l'alimentation. Ainsi dans la cohorte EDEN nous avons observé une corrélation entre la consommation en énergie, protéines, protéines animales et lipides au cours des 3 derniers mois de grossesse et l'enrichissement en ^{15}N des cheveux de la mère (Tableau 1) (22). Nous n'avons pas retrouvé de publications concernant des carences associées notamment de vitamines du groupe B, pouvant interférer dans la synthèse protéique.

Le choix de la protéine sur laquelle la mesure est réalisée permet une approche intégrée, au long cours, du métabolisme protéique comme avec le cheveu. La mesure de l'enrichissement en ^{15}N dans l'urée permet une évaluation à court terme de la dégradation protéique. L'enrichissement naturel varie d'un acide aminé à l'autre en fonction de l'intensité du métabolisme de chaque acide aminé. Ainsi la glutamine (et le glutamate), qui est un acide aminé ayant une activité métabolique importante notamment dans le transport d'azote, dans le métabolisme énergétique et dans la modulation du renouvellement protéique, a un enrichissement naturel en ^{15}N parmi les plus élevés (24). De même la proline est enrichie, au contraire des acides aminés branchés qui ont un enrichissement plus faible. Dans un travail soumis à publication nous avons hydrolysé les protéines du cheveu et du lait et analysé simultanément l'enrichissement naturel de chaque acide aminé et leur abondance.

Tableau 1. Corrélations partielles pour $\delta^{15}\text{N}$ (‰) et $\delta^{13}\text{C}$ (‰) des cheveux de mères et nouveau-nés

		Corrélation ^a			
		Mère		Nouveau-né	
		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Mère					
	IMC (kg/m ²)	0.03 (0.61)	-0.03 (0.66)	0.06 (0.36)	0.01 (0.84)
	Prise de poids (kg)	-0.12 (0.07)	-0.005 (0.94)	-0.04 (0.56)	-0.08 (0.21)
	Age gestationnel (SA)	-0.03 (0.60)	-0.14 (0.40)	0.06 (0.40)	-0.11 (0.09)
Nouveau-né					
	Poids (g)	-0.03 (0.69)	-0.11 (0.10)	-0.07 (0.29)	-0.10 (0.16)
	Longueur (cm)	-0.01 (0.85)	-0.08 (0.22)	-0.02 (0.76)	-0.04 (0.51)
	Index pondéral (kg/m ³)	-0.02 (0.74)	-0.04 (0.56)	-0.08 (0.24)	-0.06 (0.33)
	Périmètre crânien (cm)	0.036 (0.38)	-0.13 (0.05)	0.02 (0.80)	-0.13 (0.04)
3 derniers					
mois de grossesse	Energie (kcal/j)	-0.18 (0.01)	0.12 (0.08)	-0.15 (0.03)	0.09 (0.21)
	Protéines totales (g/j)	-0.02 (0.77)	0.14 (0.04)	-0.03 (0.61)	0.12 (0.08)
	Protéines végétales (g/j)	-0.06 (0.40)	0.08 (0.27)	-0.13 (0.05)	0.06 (0.36)
	Protéines animales (g/j)	-0.007 (0.92)	0.14 (0.04)	-0.003 (0.96)	0.12 (0.07)
	Glucides (g/j)	-0.20 (0.003)	0.05 (0.50)	-0.15 (0.03)	0.01 (0.92)
	Lipides (g/j)	-0.19 (0.01)	0.15 (0.03)	-0.16 (0.02)	0.12 (0.07)

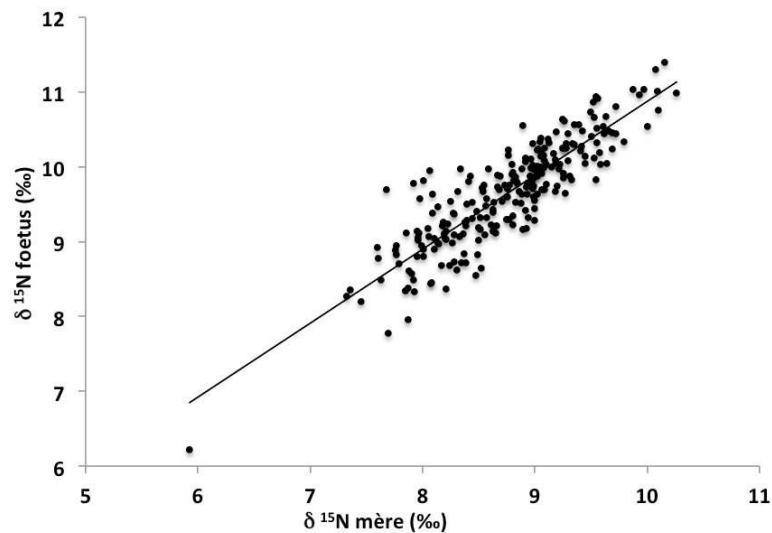
SA: semaines d'aménorrhées.

^a Coefficient de corrélation de Pearson ajusté par centre et pour l'âge gestationnel, valeur de *p* entre parenthèses.

L'estimation de l'intensité de la synthèse de kératine dans le cheveu fœtal prélevé à la naissance permet une approche du métabolisme fœtal et de son impact sur la « programmation fœtale » de l'état de santé à l'âge adulte. La nutrition fœtale est un déterminant majeur de l'état de santé à l'âge adulte comme l'ont montré les travaux sur la « programmation fœtale » (25,26) sans toutefois pouvoir dissocier chez l'homme le rôle de l'apport protéique et de l'apport énergétique. Chez l'animal gestant, la restriction d'apport protéique entraîne un retard de croissance fœtal, raccourcit la durée de vie (27) et module la méthylation de la région promotrice du gène de la leptine avec une augmentation de la réponse post-prandiale de leptine (28). Inversement un régime trop riche en protéines induit aussi un retard de croissance fœtal avec une majoration de la masse grasse à l'âge adulte (29). Chez l'homme, les données issues de l'étude de la cohorte Hollandaise, qui a subi une famine pendant la deuxième guerre mondiale, suggèrent qu'une restriction protéino-énergétique majeure le risque de complications cardio-vasculaires à l'âge adulte (30). Il a récemment été montré dans cette cohorte une déméthylation de la région modulatrice de l'IGF2 suggérant un mécanisme possible de la programmation fœtale (31). Pour des raisons éthiques évidentes, le métabolisme protéique fœtal ne peut être étudié directement chez l'homme. L'étude que nous avons réalisée sur la cohorte Inserm-EDEN retrouve une corrélation linéaire entre l'enrichissement naturel en ^{15}N du cheveu de l'enfant nouveau-né et de sa mère (32) (Figure 2). Cela suggère une relation directe entre l'état nutritionnel maternel et la synthèse de kératine fœtale, un index du métabolisme protéique. Le fœtus ne serait pas « protégé » en cas d'apport protéique maternel insuffisant ou excessif. On retiendra pour la pratique qu'une dénutrition protéino-énergétique ou qu'un régime hyperprotéiné pendant la grossesse par exemple pourraient directement affecter le métabolisme fœtal. A cette heure la plus grande prudence doit être observée devant toute modulation excessive de la nutrition de la femme

enceinte ce d'autant qu'il semble exister une régulation spontanée de la prise de poids en fonction de l'IMC de départ chez la femme enceinte (33).

Figure 2 : Corrélations mère / enfant pour les teneurs en azote 15



4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La facilité et la non invasivité des prélèvements de cheveux autorisent l'exploration d'enfants comme d'adultes sans grands moyens (envoi postal de prélèvements par ex). D'autres protéines que la kératine pourraient être explorées dans le sang, les urines ou d'autres tissus. Il existe de nombreuses applications potentielles à cette méthode en épidémiologie nutritionnelle des populations par exemple en Occident comme dans les pays en développement ou en situation de crise.

Dans la pratique clinique quotidienne, elle pourrait permettre de mieux adapter l'apport azoté aux besoins des patients. Cela concerne les patients en nutrition entérale ou parentérale et tout particulièrement en situation de stress métabolique (réanimation, maladies chroniques...). Elle permettrait en outre d'évaluer la réponse métabolique aux traitements (nutritionnels,

médicamenteux, hormonaux, ...). Une même approche sur les isotopes du carbone et qui n'est pas détaillée ici pourrait permettre d'aborder le métabolisme énergétique.

Il s'agit toutefois de perspectives et nous menons chez l'animal comme chez l'homme de nouveaux travaux pour mieux comprendre les facteurs qui modulent l'incorporation des isotopes dans les protéines, glucides et lipides.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Martin A. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris: Tec&Doc, 2001.
- 2 Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care. Clin Nutr 2009;28:387-400.
- 3 Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, et al. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. Am J Clin Nutr. 1983;37:478-94.
- 4 Yudkoff M, Ah Mew N, Daikhin Y, et al. Measuring in vivo ureagenesis with stable isotopes. Mol Genet Metab. 2010;100:S37-41.
- 5 Macko SA, Lubec G, Teschler-Nicola M, et al. The Ice Man's diet as reflected by the stable nitrogen and carbon isotopic composition of his hair. FASEB J. 1999;13:559-62.
- 6 Bocherens H, Billiou D, Mariotti A, et al. New isotopic evidence for dietary habits of Neandertals from Belgium. J Hum Evol. 2001;40:497-505.
- 7 Richards MP. A brief review of the archaeological evidence for Palaeolithic and Neolithic subsistence. Eur J Clin Nutr. 2002;56:1270-8.
- 8 Ebling FJ. The biology of hair. Dermatol Clin. 1987;5:467-81.
- 9 Randall VA. Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. Semin Cell Dev Biol, 2007;18:274-85.
- 10 Johnson AA, Latham MC, Roe DA. The use of changes in hair root morphology in the assessment of protein-calorie malnutrition. J Invest Dermatol. 1975;65:311-4
- 11 Petzke KJ, Boeing H, Klaus S, Metges CC. Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. J Nutr. 2005;135:1515-20
- 12 O'Connell TC, Hedges RE. Investigations into the effect of diet on modern human hair isotopic values. Am J Phys Anthropol. 1999;108:409-25.

- 13 Deniro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta*. 1981;45:341-51.
- 14 Petzke KJ, Boeing H, Metges CC. Choice of dietary protein of vegetarians and omnivores is reflected in their hair protein ^{13}C and ^{15}N abundance. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19:1392-400.
- 15 Macko SA, Fogel M, Engel MH, Hare PE. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta*. 1986;50:2143-6.
- 16 Sick H, Roos N, Saggau E, et al. Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. *Z Ernährungswiss*. 1997;36:340-6.
- 17 Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, et al. Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:2497-506.
- 18 Tcherkez G. Isotopie biologique. Introduction aux effets isotopiques et à leurs applications en biologie. Paris: Tec & Doc / Lavoisier; 2010.
- 19 Werner RA, Brand WA. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2001;15:501-19.
- 20 Petzke KJ, Fuller BT, Metges CC. Advances in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13:532-40.
- 21 Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, et al. Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20:2973-8.
- 22 de Luca A, Boisseau N, Tea I, Louvet I, Robins RJ, Forhan A, Charles MA, Hankard R. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in hair from newborn infants and their mothers: a cohort study. *Pediatr Res*. 2012; 71:598-604.
- 23 Beaufrère B. Protein turnover in low-birth-weight (LBW) infants. *Acta Paediatr Suppl*. 1994;405:86-92.

- 24 Petzke KJ, Lemke S. Hair protein and amino acid ^{13}C and ^{15}N abundances take more than 4 weeks to clearly prove influences of animal protein intake in young women with a habitual daily protein consumption of more than 1 g per kg body weight. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23:2411-20.
- 25 Barker DJP, Winter PD, Osmond C, et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
- 26 Barker DJP, Osmond C, Forsén TJ, et al. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med* 2005;353:1802-9.
- 27 Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 2004;427:411-2.
- 28 Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, et al. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J*. 2011;25:3271-8.
- 29 Daenzer M, Ortmann S, Klaus S, Metges CC. Prenatal high protein exposure decreases energy expenditure and increases adiposity in young rats. *J Nutr* 2002;132:142-4.
- 30 Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998;351:173-7.
- 31 Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *PNAS* 2008;105:17046-9.
- 32 Site Web de la cohorte EDEN (Etude des Déterminants pré et post-natals du développement et de la croissance de l'ENfant) [consulté le 26 juin 2012]. Disponible sur Internet : <http://www.den.vjf.inserm.fr>
- 33 Gaud MA, Frasquet-Darrieux M, Ingrand P, et al. Gestational weight gain: arguments for a transgenerational weight-control process. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:529.

2.1.2 Etude en pathologie chez le diabétique de type 2 adulte avec ou sans néphropathie (Acceptée)

L'insuffisance rénale (IR) terminale altère profondément le métabolisme protéique. « L'urémie » résulte de l'incapacité du rein à éliminer l'urée, produit terminal de l'oxydation irréversible des protéines. L'optimisation de l'apport protéique est un point clef de la prise en charge thérapeutique de l'IR. Un bio-marqueur du métabolisme protéique, la mesure de l'AIN dans les cheveux, pourrait s'avérer utile à la pratique quotidienne. Le diabète de type 2 est la première cause d'IR chez l'adulte. Nous avons eu l'opportunité de monter un projet sur la cohorte Diab2néphrogène dirigée par le Pr S Hadjadj dans le cadre de l'axe « Nutrition, facteurs fœtaux et post-nataux et maladies chroniques » de l'INSERM CIC1402 (CHU Poitiers). Des cheveux ont été prélevés lors d'un bilan prévu chez certains patients par ailleurs complètement phénotypés dans le cadre du suivi de cohorte.

Nous avons observé une corrélation positive entre l'AIN en ^{15}N et l'atteinte rénale, ce qui suggère que ce marqueur permettrait de détecter une modification du métabolisme protéique en lien avec l'insuffisance rénale.

de Luca A, Laugier S, Tea I, Robins RJ, Saulnier PJ, Torremocha F, Piguel X, Maréchaud R, Hankard R, Hadjadj S. Impact on ^{15}N natural isotopic abundance in hair of kidney function in type 2 diabetic nephropathy. 2014. e-SPEN Journal. Accepté. doi: 10.1016/j.clnme.2014.09.001

Impact on bulk ^{15}N natural isotopic abundance in hair of kidney function in type 2 diabetic nephropathy

Arnaud De Luca ^{1,2,3,4}, Stéphanie Laugier ⁵, Illa Tea ⁶, Richard J Robins ⁶, Pierre-Jean Saulnier ^{1,3,4}, Florence Torremocha ⁵, Xavier Piguel ⁵, Richard Maréchaud ^{3,5}, Régis Hankard ^{7,8*}, Samy Hadjadj ^{1,3,4,5,9}

¹ INSERM, CIC 1402, 2 rue Milétrie, Poitiers, F-86021, France

² Pédiatrie Multidisciplinaire, Nutrition de l'Enfant, CHU Poitiers, 2 rue Milétrie, F-86021, France

³ Université de Poitiers, CIC1402, 4 rue Milétrie, Poitiers, F-86000, France

⁴ CHU de Poitiers, Centre d'investigation clinique, 2 rue Milétrie, Poitiers, F-86021, France

⁵ Service de Médecine Interne, Endocrinologie, Maladies Métaboliques, CHU Poitiers, 2 rue Milétrie, F-86021, France

⁶ EBSI, CEISAM, University of Nantes–CNRS UMR6230, 2 rue de la Houssinière, F-44322 Nantes, France

⁷ INSERM, U 1069, 10 boulevard Tonnellé, Tours, F-37044, France

⁸ Université François Rabelais, 60 rue du Plat D'Etain, Tours, F-37044, France

⁹ INSERM, U1082, 2 rue Milétrie, Poitiers, F-86021, France

Authors e-mails:

arnaud.de.luca@univ-poitiers.fr; ste.laugier@gmail.com; illa.tea@univ-nantes.fr;
richard.robins@univ-nantes.fr; p.j.saulnier@chu-poitiers.fr; f.torremocha@chu-poitiers.fr;
x.piguel@chu-poitiers.fr; r.marechaud@chu-poitiers.fr; regis.hankard@inserm.fr;
s.hadjadj@chu-poitiers.fr

Abbreviated title: $\delta^{15}\text{N}$ in type 2 diabetic nephropathy

* Corresponding author: Régis HANKARD

E-mail: regis.hankard@inserm.fr

Mailing: Inserm U 1069, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 10 Boulevard Tonnelé, F-37000, Tours, France.

Telephone: +33 2 47 36 61 79, fax: +33 2 47 36 62 26

Contact information during production: Arnaud DE LUCA

arnaud.de.luca@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

Background and aims: Nephropathy is a serious long-term complication in type 2 diabetic patients. Few data are available about nitrogen metabolism in diabetic nephropathy. Bulk ^{15}N natural isotopic abundance (NIA) in hair has been shown modified in different pathologies with altered protein metabolism. We have compared bulk ^{15}N NIA in hair proteins in type 2 diabetic patients to look for differences between groups with or without nephropathy.

Methods: Case patients were type 2 diabetic patients with high urinary albumin concentrations (≥ 20 mg/L or 30 mg/24h on two of three urine collections) and/or an estimated glomerular filtration rate (eGFR) below $60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$, according to the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formula. Control subjects were type 2 diabetic patients of the same geographical origin with long-term diabetes, normo-albuminuria and eGFR above $60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$. The bulk ^{15}N NIA values for hair were measured by isotope ratio measurement mass spectrometry coupled with an elemental analyzer.

Results: Thirty-three patients in the nephropathy group and 31 in the control group were included. The mean age of the participants was 69 ± 8 years, and the mean duration of diabetes was 22 ± 8 years. Bulk hair ^{15}N NIA were 8.9 ± 0.7 ‰ in the nephropathy group and 9.0 ± 0.5 ‰ in the control group ($p=0.41$). Positive correlations were found between bulk hair ^{15}N NIA with eGFR ($p<0.01$) and with urinary urea concentration ($p<0.01$), and a negative correlation with the urinary albumin-to-creatinine ratio ($p<0.001$).

Conclusions: Bulk hair ^{15}N NIA might be an easily available, non-invasive biomarker of nitrogen metabolism in type 2 diabetic patients.

Keywords: human; diabetes mellitus; nephropathy; protein metabolism; isotopic ratio mass spectrometry

Abbreviations:

ARB: angiotensin 2 receptor blockers

CKD: chronic kidney disease

CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

$\delta^{13}\text{C}$ (‰): ^{13}C natural isotopic abundance

$\delta^{15}\text{N}$ (‰): ^{15}N natural isotopic abundance

eGFR: estimated glomerular filtration rate

irm-MS: isotope ratio measurement by mass spectrometry

NIA: natural isotopic abundance

RAS: Renin-angiotensin system

uACR: urinary albumin to creatinine ratio

INTRODUCTION

It is well established that protein metabolism is perturbed in conditions of nutritional imbalance and disease. The rate of protein synthesis is enhanced in obesity¹ and in type 1 and type 2 diabetes mellitus.^{2,3} Assessing modifications to protein turnover is not facile and is classically carried out using short-term isotopic-tracer techniques.⁴ Such an approach is restricted to short-term observations, however, and other methods are needed by which longer-term measurements can be obtained.

An attractive alternative approach might be to exploit the variation in bulk ¹⁵N natural isotopic abundance (NIA) of nitrogenous compounds. NIA of whole body proteins partly depends on protein source, being higher in animal- than vegetable-derived proteins.⁵ In addition, recent studies in rats exploiting both low-enriched ¹⁵N-amino acid perfusion⁴ and dietary-related studies⁶ suggest that protein metabolism is a major determinant of bulk ¹⁵N NIA values, as much as is protein intake. Amongst the factors contributing to the metabolic component determining bulk ¹⁵N NIA is the transamination rate⁷ and urea cycle flux rate.⁸ Furthermore, it has been shown that ¹⁵N/¹⁴N ratios in nitrogenous compounds are influenced by nutritional imbalance and disease.^{5,8,9}

Within the nutritionally-related diseases, diabetes mellitus and associated diabetic nephropathy affects a growing proportion of the global population. Diabetic nephropathy, a multifactorial serious long-term complication in diabetes, is associated with an increased independent risk for all-cause mortality in both type 1 and type 2 diabetes mellitus.¹⁰ Although the determinants of diabetic nephropathy remain poorly understood, high protein intake may be a key issue in nutritional care in chronic kidney disease (CKD), since it may be detrimental to renal function.¹¹ A randomized trial has shown the benefit of restriction of protein intake¹² in both diabetic and in non-diabetic populations.¹³ Furthermore, a reduction

of proteinuria was shown in type 2 diabetic proteinuric patients subjected to a low-protein diet.¹⁴

Clearly, then, nephropathy in diabetes mellitus is related to overall nitrogen metabolic status. To our knowledge, there is currently no simple and non-invasive method by which protein metabolism can be monitored in order to adjust protein intake in diabetic and non-diabetic populations. In view of the established relationship between protein metabolism and bulk ¹⁵N NIA, we have tested the hypothesis that modified renal function in nephropathy in type 2 diabetes mellitus may alter bulk ¹⁵N NIA values. To test this, we set up a case-control study involving 64 type 2 diabetic patients with (33 patients) or without (31 patients) diabetic CKD. To access bulk ¹⁵N NIA values, we have exploited the easily-accessible protein of hair keratin, previously shown as a non-invasive means by which to observe potential modifications in protein metabolism.^{5,15,16}

MATERIALS AND METHODS

Population

Outpatients attending the diabetes mellitus department at the Poitiers University Hospital, France, were invited to participate in the Poitiers metabolic collection (INSERM CIC1402).

An independent committee, assessing key endpoints, reviewed the record of all participants for type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy (according to ophthalmological reports including retinal examination, photographs and/or retinography), diabetic nephropathy and cardio-vascular events (including ECG data).

All patients were of European ethnicity. Patients were selected on the presence of type 2 diabetes mellitus, defined according to the ADA 2007 criteria. Exclusion criteria were definitive insulin requirement within less than 2 years after diagnosis, inability to understand

study requirement, CKD stage 5 or total baldness. Patient's diet was not assessed but the whole population consumed a normal French diet.

Case patients were type 2 diabetic patients with high urinary albumin concentrations (uAC) of ≥ 20 mg/L or 30 mg/24 h on at least two of three sterile urine collections and/or a low estimated glomerular filtration rate (eGFR) of $< 60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$, according to the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation. Control subjects were type 2 diabetic patients of the same geographic origin with urinary albumin concentrations < 20 mg/L or 30 mg/24 h on two of three urine collections and with an eGFR $> 60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$.

Laboratory assays

Urinary sample was a 24 h collection. Serum creatinine and uAC were measured by nephelometry on a Modular System P (Roche Diagnostics GmbH). Renal function was estimated by GFR using the CKD-EPI formula. Although renal function was not directly measured, calculation of eGFR is considered adequate for the assessment of renal function in patients with a stable condition.¹⁷ Urinary creatinine concentration (uCC) was measured on a Hitachi 911 automatic analyzer (Roche Diagnostics, Meylan, France), allowing the determination of urinary albumin to creatinine ratio (uACR). Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) was determined by using a high performance liquid chromatography method with an ADAMS A1C HA-8160 analyzer (normal values 4.0-6.0 %; Menarini, Florence, Italy).

Hair sample collection and preparation

A tuft of hair was cut close to the scalp, in the occipital area, the same day as laboratory assays, and stored at room temperature until processing. For isotopic analysis, the complete hair sample was transferred to a small glass bottle and washed in ethyl acetate (2 mL, 30 min)

to remove adhesive tape residue and then in cyclohexane (2x2 mL, 30 min) to remove sebum (lipids) and residues (e.g. shampoo). Residual traces of solvent were removed by evaporation at 45°C under a stream of pure nitrogen gas. The sample was cut into small sections (1 mm or less). An aliquot of each sample (~0.6 mg, giving ~0.08 mg N) was weighed with 10⁻⁶ g precision (ultra-microbalance XP6U, Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) into tin capsules (solids “light” 5x9 mm, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

Isotope analysis

The %N and %C and the bulk ¹⁵N/¹⁴N and ¹³C/¹²C ratios were determined by flash combustion in an elemental analyzer (EA) and isotope ratio mass spectrometry (irm-MS), respectively, as previously described.^{18,19} Briefly, capsules containing samples (approx. 80 µg N) were introduced into an Integra2 analyzer (Sercon, Crewe, Cheshire, UK), wherein they were flash combusted in an oxygen atmosphere in the EA and the resultant gases (CO₂ and N₂) were carried in a stream of helium to the irm-MS. Water was removed by a Mg(ClO₄)₂ water trap and N₂ was completely separated from CO₂ using an integrated gas chromatography column. Ion currents were measured for *m/z* 28, 29, 30 and *m/z* 44, 45, 46, for N₂ and CO₂, respectively, from which the bulk ¹⁵N NIA (‰) and bulk ¹³C NIA (‰) values could be calculated. Bulk NIA were expressed as the δ¹⁵N (‰) and δ¹³C (‰) ratios calculated as follows:

$$\delta(\text{‰}) = \left(\frac{R}{R_{std}} - 1 \right) \times 1000$$

where for δ¹⁵N the reference (*R_{std}*) is atmospheric N₂ and for δ¹³C it is Vienna-Pee Dee Belemnite (V-PDB). The calibrated IAEA international reference materials (http://nucleus.iaea.org/rpst/referenceproducts/referencematerials/Stable_Isotopes/2H13C15Nand18O/index.htm) that covered the analytical range IAEA-N1 (δ¹⁵N = 0.43 ± 0.07 ‰) and

IAEA-N2 ($\delta^{15}\text{N} = 20.41 \pm 0.12 \text{ ‰}$) were used for $\delta^{15}\text{N}$ calibrations, and NBS-22 ($\delta^{13}\text{C} = -30.03 \pm 0.05 \text{ ‰}$), SUCROSE-C6 ($\delta^{13}\text{C} = -10.80 \pm 0.47 \text{ ‰}$), and IAEA-CH-7 (formally PEF-1, $\delta^{13}\text{C} = -32.15 \pm 0.05 \text{ ‰}$) were used for $\delta^{13}\text{C}$ calibrations, both via a laboratory standard of glutamic acid. This working standard was defined as having isotopic compositions of $\delta^{15}\text{N} = -4.80 \pm 0.08 \text{ ‰}$ and $\delta^{13}\text{C} = -27.48 \pm 0.05 \text{ ‰}$ relative to these international standards and was included in each series every tenth sample to ensure quality control and to give base-points for correction of measured values.

The C/N ratio was calculated from the weight percentages determined from the integrated total ion current intensity for CO_2 and N_2 , and sample weights. The same working standard (glutamic acid) was used for the N and C weight % determinations. C/N ratios were evaluated to check for any hair contamination or incomplete combustion. The mean C/N ratio was 3.16 ± 0.13 [2.81;3.53], indicating a good reliability of analysis. Each sample was analyzed in duplicate, and the average of the two values was used for statistical analysis.

Ethics statement

The Poitiers University Hospital Ethics Committees (CPP Ouest III, Poitiers, France) approved the design of this collection (registration number: DC-2008-565). All participants gave their written informed consent.

Statistical analysis

Univariate statistical analyses were performed with Statview 5.0 (SAS Institute, Cary, NC). Patients' characteristics were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) or medians (interquartile range [IQR]) for skewed distributions. Groups were compared using the χ^2 test for categorical variables, or parametric (ANOVA) or nonparametric (if not normally

distributed, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney U tests) tests for continuous variables. *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Non-supervised principal component analysis (PCA) was performed using the Simca-P software.

RESULTS

Characteristics of the participants

Sixty-four patients with type 2 diabetes mellitus were included in the analysis. The mean age was 69 ± 8 years, and the mean duration of diabetes mellitus was 22 ± 8 years. The main demographic and clinical characteristics of the population are given in Table 1. Patients with nephropathy were older, more often male, and more often taking lipid-lowering drugs. Twenty-one of them had $\text{eGFR} > 60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$ and high urinary albumin concentrations. Serum bicarbonate ranged from 19 to 30 mmol/L. Total mean bulk ^{15}N NIA for men was 8.9 ± 0.6 ‰, and mean bulk ^{15}N NIA for women was 9.0 ± 0.6 ‰, indicating no significant difference between genders ($p=0.5$). No significant differences or correlation were found between hair bulk ^{13}C NIA and diabetes and renal covariates.

The patients were divided into 2 groups based on whether they exhibited at least one of the criteria of nephropathy ($\text{uAC} \geq 20 \text{ mg/L}$ or $\text{eGFR} < 60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$). This gave 33 patients in the nephropathy group (case group) and 31 patients in the control group. The population was scrutinized by non-supervised multivariate principal component analysis (PCA) to test the strength of the groupings. This confirmed eGFR and uCC as strongly negatively correlated parameters that contributed significantly to the groupings. Hierarchical clustering supported this grouping, showing 2 primary level groups with 50% of the case patients grouping together with only 2 controls while at the tertiary level 73% of the controls

were grouped together. Thus, non-supervised analysis supported significantly the allocation to case or control groups.

Table 1 – Characteristics of the study population

	Case	Control	p
<i>n</i>	33	31	
Male – n (%)	22 (67)	13 (42)	0.047
Age (years)	70.8 ± 9.3	66.3 ± 5.1	0.02
Duration of diabetes mellitus (years)	22.4 ± 9.7	21.8 ± 5.6	0.77
Body mass index (kg /m ²)	30.7 ± 5.2	32.9 ± 5.6	0.12
Systolic blood pressure (mmHg)	127 ± 18	122 ± 15	0.17
Diastolic blood pressure (mmHg)	66 ± 11	66 ± 10	0.84
Treatment:			
• Oral glucose-lowering drugs: n (%)	23 (70)	28 (90)	0.11
• Insulin therapy: n (%)	24 (73)	24 (77)	0.67
• Statins or other lipid-modifying drugs: n (%)	27 (82)	18 (58)	0.04
• ACE-I and/or ARB: n (%)	28 (85)	23 (74)	0.29
HbA _{1c} % (mmol mol ⁻¹)	7.1 ± 1.2	7.4 ± 0.9	0.32
Serum albumin (g L ⁻¹)	39.5 ± 3.5	40.5 ± 4.6	0.36
Serum bicarbonate (mmol L ⁻¹)	25 ± 3	26 ± 2	0.06
Estimated GFR (mL min ⁻¹ 1.73m ⁻²)	68.4 ± 27.6	84.5 ± 10.6	0.003
Serum LDL cholesterol (mmol L ⁻¹)	2.10 ± 0.7	2.38 ± 0.73	0.12
Serum HDL cholesterol (mmol L ⁻¹)	1.27 ± 0.39	1.30 ± 0.34	0.69

Serum triacylglycerols ^a (mmol L ⁻¹)	1.50 (1.1)	1.23 (0.68)	0.43
Urinary albumin-to-creatinine ratio ^a (mg mmol ⁻¹)	9.85 (40.2)	1.63 (1.55)	< 0.0001
Urinary urea concentration (24h collection) (mmol L ⁻¹)	213 ± 91	253 ± 89	0.09
Daily urea excretion (mmol day ⁻¹)	378 ± 161	362 ± 120	0.54
Urea fractional excretion (%)	40.3 ± 11.8	38.0 ± 9.8	0.54
Bulk hair ¹⁵ N NIA (‰)	8.9 ± 0.7	9.0 ± 0.5	0.41
Bulk hair ¹³ C NIA (‰)	-21.2 ± 3	-20.7 ± 1.9	0.92

Data are expressed as mean ± SD, or specified ^a: mean (IQR). ACE-I, angiotensin converting enzyme inhibitors; ARB, angiotensin 2 receptor blockers; NIA, natural isotopic abundance; RAS, Renin-angiotensin system.

Relation between hair ¹⁵N NIA and diabetes mellitus covariates

Considering the whole population, bulk hair ¹⁵N NIA values were not correlated with HbA_{1c} (R²= 0.03; p= 0.77). Bulk hair ¹⁵N NIA values were not different in the group of patients with insulin treatment (48 patients: 9.0±0.5 ‰) versus those without insulin treatment (16 patients: 9.0±0.6 ‰).

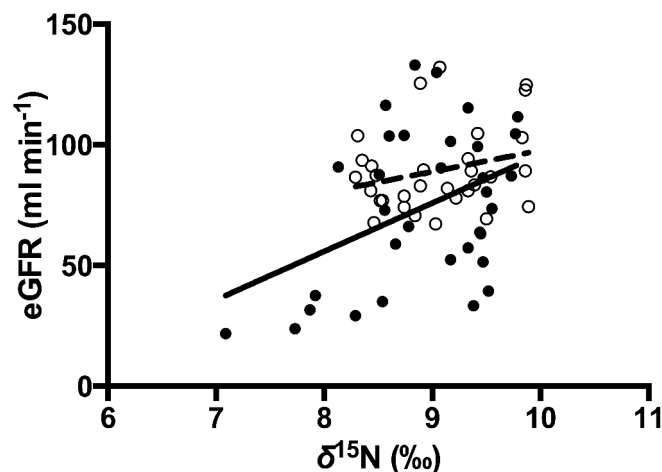
Relation between bulk hair ¹⁵N NIA and study-group parameters

Values of bulk hair ¹⁵N NIA were 8.9±0.7 ‰ in the case group and 9.0±0.5 ‰ in the control group with no significant difference between groups (p=0.41). In the case group, the mean bulk ¹⁵N_{men} NIA was 8.8±0.7 ‰ and the mean bulk ¹⁵N_{women} NIA was 9.1±0.6 ‰, p=0.3. In the control group, the mean bulk ¹⁵N_{men} NIA was 9.1±0.4 ‰, and the mean bulk ¹⁵N_{women} NIA was 9.0±0.6 ‰, p=0.5. Again, no significant influence of gender was observed.

Relation between bulk hair ^{15}N NIA and key renal covariates

A positive correlation was found in the case group between bulk hair ^{15}N NIA and eGFR ($R^2=0.2$; $p<0.01$), while no significant correlation was found in the control group ($R^2=0.04$; $p=0.27$) (Figure 1). Similarly, a negative correlation was found between bulk ^{15}N NIA and logarithmic transformed uACR in the case group ($R^2=0.2$; $p=0.02$) (Figure 2) with no significant correlation observed in the control group ($R^2=0.01$; $p=0.66$). Taking all the data together, both correlations were strengthened (Table 2). In contrast, while a positive correlation was also found in the case group between bulk ^{15}N NIA and urinary urea concentration ($R^2=0.18$; $p<0.02$), the control group also showed a positive correlation, albeit slightly weaker ($R^2=0.15$; $p<0.05$). For the group as a whole, these parameters were strongly correlated ($R^2=0.17$; $p<0.001$) (Figure 3). Other correlation results are shown in Table 2.

Figure 1 – Correlation between bulk hair ^{15}N natural isotope abundance and estimated glomerular filtration rate (eGFR) with CKD-EPI equation.



Cases (filled circles) are type 2 diabetic nephropathic patients (urinary albumin excretion ≥ 20 mg/L or 30 mg/24 h and/or $\text{eGFR} < 60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$) and controls (open circles) are non-nephropathic type 2 diabetic patients. Full line represents mean regression for case group and dotted line for control group. A positive correlation between bulk hair ^{15}N NIA and eGFR can

be observed in the case group ($R^2=0.2$; $p<0.01$), while no significant correlation was found in the control group ($R^2=0.04$; $p=0.27$). The overall correlation is $R^2 = 0.15$, $p < 0.01$.

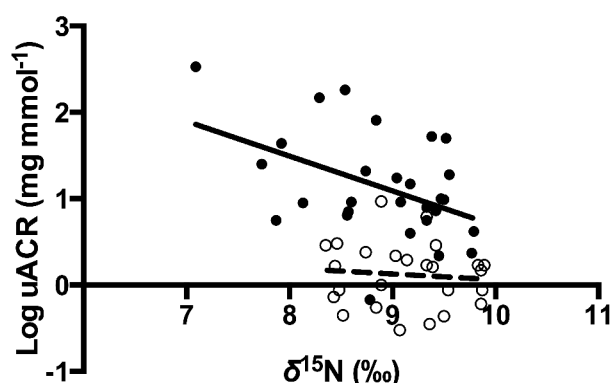
$\delta^{15}\text{N}$: bulk hair ^{15}N natural isotope abundance, eGFR: estimated glomerular filtration rate.

Table 2 – Pearson correlations between key renal covariates

	eGFR (mL min ⁻¹ 1.73m ⁻²)	uACR (mg mmol ⁻¹)	U. urea (mmol L ⁻¹)	U. urea (mmol day ⁻¹)	BMI (kg m ⁻²)
Bulk hair ^{15}N NIA (‰)	0.151 ^b	0.148 ^b	0.173 ^c	0.061	0.0003
eGFR (mL min⁻¹ 1.73m⁻²)		0.317 ^c	0.097 ^a	0.051	0.053
uACR (mg mmol⁻¹)			0.114 ^a	0.111 ^a	0.002
U. urea (mmol L⁻¹)				0.416 ^c	0.008
U. urea (mmol day⁻¹)					0.05

Data are expressed as R^2 coefficient. uACR: urinary albumin-to-creatinine ratio; eGFR: estimated glomerular filtration rate; U. urea: urinary urea. ^a $p<0.05$; ^b $p<0.01$; ^c $p < 0.001$.

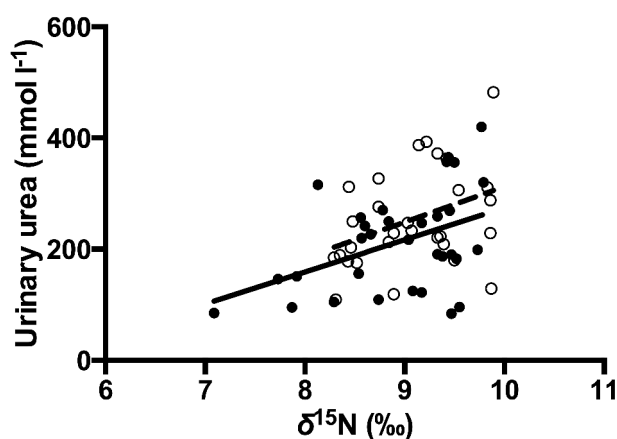
Figure 2 – Correlation between bulk hair ^{15}N natural isotope abundance and urinary albumin-to-creatinine ratio (log transformed data).



Cases (filled circles) are type 2 diabetic nephropathic patients (urinary albumin excretion ≥ 20 mg/L or 30 mg/24 h and/or eGFR $< 60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$) and controls (open circles) are non-nephropathic type 2 diabetic patients. Full line represents mean regression for case group and dotted line for control group. A negative correlation between bulk ^{15}N NIA and logarithmic transformed uACR can be observed in the case group ($R^2=0.2$; $p=0.02$), while no significant correlation was found in the control group ($R^2=0.01$; $p=0.66$). The overall correlation is $R^2=0.15$, $p < 0.01$.

$\delta^{15}\text{N}$: bulk hair ^{15}N natural isotope abundance, uACR: urinary albumin-to-creatinine ratio.

Figure 3 – Correlation between bulk hair ^{15}N natural isotope abundance and urinary urea concentration.



Cases (filled circles) are type 2 diabetic nephropathic patients (urinary albumin excretion ≥ 20 mg/L or 30 mg/24 h and/or eGFR $< 60 \text{ mL min}^{-1} 1.73\text{m}^{-2}$) and controls (open circles) are non-nephropathic type 2 diabetic patients. Full line represents mean regression for case group and dotted line for control group. A positive correlation between bulk ^{15}N NIA and urinary urea concentration can be observed in the case group ($R^2=0.18$; $p<0.02$), the control group also showed a positive correlation but weaker ($R^2=0.15$; $p<0.05$). The overall correlation is $R^2 = 0.17$, $p < 0.001$.

$\delta^{15}\text{N}$: bulk hair ^{15}N natural isotope abundance.

DISCUSSION

We did not observe any difference in bulk hair ^{15}N NIA between type 2 diabetes mellitus patients with or without diabetic nephropathy. Subjects were not matched for age or gender, but no influence of gender was observed. However, bulk hair ^{15}N NIA was positively correlated to eGFR, a surrogate for kidney function in type 2 diabetic patients.

Relationship of bulk hair ^{15}N NIA with parameters of type 2 diabetes mellitus

Within the study population, it was found that neither gender nor the diabetes mellitus covariates (HbA_{1c}, insulin therapy) correlated with the bulk hair ^{15}N NIA values. However, the mean bulk hair ^{15}N NIA value obtained ($8.9\pm 0.6 \text{ ‰}$) for this population of French diabetic patients was slightly lower than the values obtained for healthy breast-feeding French mothers ($9.7\pm 0.7 \text{ ‰}$)¹⁹ or healthy German adult men ($9.8\pm 0.7 \text{ ‰}$) and women ($9.5\pm 0.4 \text{ ‰}$).¹⁶ Furthermore, it was closer in value to that obtained for French women at parturition ($\delta^{15}\text{N}=8.8\pm 0.6 \text{ ‰}$).¹⁸ In general, the extent of decrease of bulk hair ^{15}N NIA has been found to be larger in chronic conditions affecting protein metabolism, such as cirrhosis ($\delta^{15}\text{N}=6.7 \text{ ‰}$),⁹ and a bulk $\Delta\delta^{15}\text{N}\geq 1 \text{ ‰}$ can reasonably be interpreted as indicating a disease- or metabolic-

related change in nitrogen metabolism. Thus, although in the current study no difference between bulk ^{15}N NIA values is found whether type 2 diabetes mellitus patients do or do not in addition suffer diabetic nephropathy, the data do indicate that the population as a whole had a modified protein metabolism, typical of pathology-related metabolic impact, which can be suggested as due to their diabetic state.

^{13}C NIA was not correlated to renal or diabetes covariates. Carbon is in the crossway of the 3 metabolisms suggesting a multifactorial modulation of ^{13}C NIA. To date, relation between ^{13}C NIA and ^{15}N NIA remains unclear, limiting the interpretation of the data.

Relationship of bulk hair ^{15}N NIA with parameters of kidney function

This conclusion is strengthened by the key finding of the present study: correlations between bulk hair ^{15}N NIA values and the parameters of kidney function, eGFR (Figure 1) and logarithmic transformed uACR (Figure 2). For both these renal covariates, the diabetic nephropathy group shows a significant correlation, which is absent in the control diabetic patients, suggesting that the severity of nephropathy specifically influences protein metabolism. The difference observed is small, but this is likely to be due to the mild kidney function impairment in the case group patients. Moreover, diabetic nephropathy is defined as either low EGFR or high uACR or both. Thus some patients with high uACR may have eGFR within sub-normal range of values. Nevertheless, these correlations, positive for eGFR and negative for uACR are in direct agreement with the finding of non-supervised PCA in showing eGFR and uCC to be negatively correlated. Further study with more advanced CKD is therefore warranted to better study the impact of kidney function on bulk ^{15}N NIA in hair.

The direct implication of this finding is that ^{15}N incorporation into hair protein decreases as renal impairment progresses, and the indirect implication is that renal malfunction has led to modified protein metabolism.

That CKD impacts on protein metabolism is well established, although how appears to depend on many factors, and inconsistencies have been reported. For example, muscle protein synthetic rates have been reported both to increase²⁰ and to be reduced²¹ in response to CKD, but the whole body protein turnover-rate to be unaffected.²² Glucose-lowering drugs (metformin and glipizide) modify the availability of amino acids, which could have an impact on protein turnover,²³ and low protein intake, malnutrition, uremia, reduced bioavailability of IGF-I, and hyperinsulinemia are all putative causes of reduced whole body protein synthesis.²⁴ Our patients were all in a stable condition, with normal-to-high BMI (Table 1), indicating no apparent modified eating behavior. None of them had uremia or acidosis. However, those patients with low eGFR also had low urea concentrations and a high uCC. Acidosis may also increase whole-body protein degradation²⁵ but we were not able to show any difference in plasma bicarbonate concentration, a marker of metabolic acidosis, between the study groups. Further studies are therefore needed to better understand the relationship between protein/amino acid metabolism and kidney function in diabetes mellitus taking into account drug therapy. A simple non-invasive index of protein metabolism such as bulk hair ¹⁵N NIA might be of interest in this specific objective.

Bulk hair ¹⁵N NIA as an indicator of protein metabolism

Assessing whole body protein metabolism using stable, non-radioactive, intravenous tracer infusion is cumbersome, expensive and rather invasive in humans.²⁶ Since bulk ¹⁵N NIA can be directly related to protein metabolism, excreted proteins – notably the keratin of hair and nails – provide an alternative easily-accessible index of whole body protein metabolism.^{5,15,16} As hair keratin is continuously accumulated, thus excluded from the pool of amino acids, its ¹⁵N NIA values therefore reflect the nitrogen metabolic status at the time of ¹⁵N incorporation into newly synthesized proteins. Hence, the value at any given time-point in hair growth will

retain a measure of fluctuations in both the protein fractional synthesis rate and in the intracellular free amino acid precursor pool.^{4,27} We previously used this method to examine nutrition in newborns¹⁸ and in fully breastfed infants.^{19,28} We showed in the latter study that by examining compound specific amino acid ¹⁵N NIA values in the nutrient source (mother's milk) and infant protein (hair at one month), the bulk ¹⁵N NIA of the infant appears to be dominated by infant amino acid metabolism, not by maternally-derived nutrients. This conclusion is coherent with that of Poupin et al.^{4,27} for a range of tissues in rat, indicating that such data might be exploited in the same way to examine modified protein turnover in relation to pathological state in humans. Metabolic processes such as transamination,⁷ ribosomal protein synthesis,²⁹ and ureagenesis³⁰ have all been shown to induce isotopic fractionation (i.e. changed NIA). Clearly, an analysis of compound specific amino acid ¹⁵N NIA values would be of value in aiding pinpoint which dietary and metabolic factors are determining the ¹⁵N NIA profiles and how these are impacted by the severity of pathogenicity of the patient.

Relationship of bulk hair ¹⁵N NIA with urinary urea concentration

A positive correlation was found between bulk hair ¹⁵N NIA and urinary urea concentration within the whole patient population (Figure 3). Increased urea excretion such as bulk hair ¹⁵N NIA may be an indicator of 1) higher protein intake, which was not assessed in this study but all patients consumed a normal French diet, 2) protein catabolism or 3) less altered renal function, i.e. kidney able to excrete urea. This is consistent with the previous observations of modified bulk ¹⁵N NIA in cases of pathology.^{9,15} A high protein intake may have a toxic effect on renal function and diabetic nephropathy,¹² making a low protein intake recommended in more advanced disease. Whether bulk ¹⁵N NIA in hair can help with fine-tuning protein intake in CKD needs further investigation.

CONCLUSION

The present pioneer study suggests bulk hair ^{15}N NIA might be exploitable as an indicator of protein metabolism in type 2 diabetes mellitus. Crucially, positive correlations between bulk ^{15}N NIA and indices of renal function are identified as a potentially easily-accessible means to identify onset of CKD. However, the data presented here is obtained from only a small population of patients, none of whom were in advanced kidney function impairment. Nevertheless, the trends found indicate that further research aiming at determining the specific contribution of nitrogen intake, protein turnover, renal function, acidosis and insulin levels on bulk hair ^{15}N NIA is warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the individuals who participated in these studies, and to the staff at the CHU Poitiers. We thank Ingrid Antheaume and Julie Lalande (CEISAM, Nantes) for help with the irm-MS and for carrying out the PCA analysis, respectively.

The CHU Poitiers biobanking facility (CRB Poitiers), part of the French network BioBanques (www.biobanques.eu) is acknowledged for handling biological samples used in the present work.

STATEMENT OF AUTHORSHIP

Conceived and designed the experiments: RH & SH.

Recruited the patients, acquisition of data: SL, PJS, FT, XP, RM, SH.

Performed the experiments: ADL, IT, RJR.

Analyzed and interpreted the data: SL, ADL, RH, SH.

Contributed reagents/materials/analysis tools: IT, RJR.

Wrote the paper: ADL, SL, RH, SH, RJR.

Edited and approved the manuscript: all.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that no competing interests exist.

FUNDING SOURCES

This work was funded by the “Groupement pour l'Etude des Maladies Métaboliques et Systémiques” (Metabolic and Systemic Diseases Study Group; GEMMS) Association, Poitiers. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Balagopal P, Bayne E, Sager B, Russell L, Patton N, George D. Effect of lifestyle changes on whole-body protein turnover in obese adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 1250-1257. doi: 10.1038/sj.ijo.0802388.
2. Darmaun D, Smith S D, Sweeten S, Sager B K, Welch S, Mauras N. Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 190-196. doi: 10.2337/diabetes.54.1.190.
3. Gougeon R, Morais J A, Chevalier S, Pereira S, Lamarche M, Marliss E B. Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31: 128-133. doi: 10.2337/dc07-1268.
4. Poupin N, Huneau J F, Mariotti F, Tomé D, Bos C, Fouillet H. Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 304: R218-R231. doi: 10.1152/ajpregu.00310.2012.
5. Petzke K J, Fuller B T, Metges C C. Advances in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 532–540. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833c3c84.
6. Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J F, Tomé D, Fouillet H. The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet ¹⁵N discrimination factors in laboratory rats. *PLoS One* 2011; 6: e28046. doi: 10.1371/journal.pone.0028046.
7. Macko S A, Fogel Estep M L, Engel M H, Hare P E. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta* 1986; 50: 2143–2146. doi: 10.1016/0016-7037(86)90068-2.

8. Yudkoff M, Ah Mew N, Daikhin Y, Horyn O, Nissim I, Nissim I, Payan I, Tuchman M. Measuring in vivo ureagenesis with stable isotopes. *Mol Genet Metab* 2010; 100: S37-S41. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.02.017.
9. Petzke K J, Feist T, Fleig W E, Metges C C. Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 2973–2978. doi: 10.1002/rcm.2695.
10. Afkarian M, Sachs M C, Kestenbaum B, Hirsch I B, Tuttle K R, Himmelfarb J, de Boer I H. Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 302-308. doi: 10.1681/ASN.2012070718.
11. Brenner B M, Meyer T W, Hostetter T H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 1982; 307: 652-659. doi: 10.1056/NEJM198209093071104.
12. Koya D, Haneda M, Inomata S, Suzuki Y, Suzuki D, Makino H, Shikata K, Murakami Y, Tomino Y, Yamada K, Araki S I, Kashiwagi A, Kikkawa R; Low-Protein Diet Study Group. Long-term effect of modification of dietary protein intake on the progression of diabetic nephropathy: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 2009; 52: 2037-2045. doi: 10.1007/s00125-009-1467-8.
13. Levey A S, Greene T, Sarnak M J, Wang X, Beck G J, Kusek J W, Collins A J, Kopple J D. Effect of dietary protein restriction on the progression of kidney disease: long-term follow-up of the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study. *Am J Kidney Dis* 2006; 48: 879-888. doi: 10.1053/j.ajkd.2006.08.023.
14. Giordano M, Lucidi P, Ciarambino T, Gesuè L, Castellino P, Cioffi M, Gresele P, Paolisso G, De Feo P. Effects of dietary protein restriction on albumin and fibrinogen

synthesis in macroalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2008; 51: 21-28. doi: 10.1007/s00125-007-0874-y.

15. Fuller B T, Fuller J L, Sage N E, Harris D A, O'Connell T C, Hedges R E. Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19: 2497-2506. doi: 10.1002/rcm.2090.

16. Petzke K J, Boeing H, Klaus S, Metges C C. Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *J Nutr* 2005; 135: 1515-1520.

17. Levey A S, Stevens L A, Schmid C H, Zhang Y L, Castro A F 3rd, Feldman H I, Kusek J W, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-612. doi: 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.

18. de Luca A, Boisseau N, Tea I, Louvet I, Robins R J, Forhan A, Charles M A, Hankard R. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in hair from newborn infants and their mothers: a cohort study. *Pediatr Res* 2012; 71: 598-604. doi: 10.1038/pr.2012.3.

19. Romek K M, Julien M, Frasquet-Darrieux M, Tea I, Antheaume I, Hankard R, Robins R J. Human baby hair amino acid natural-abundance ^{15}N -isotope values are not related to the ^{15}N -isotope values of amino acids in mother's breast-milk protein. *Amino Acids* 2013; 45: 1365–1372. doi: 10.1007/s00726-013-1597-7.

20. Adey D, Kumar R, McCarthy J T, Nair K S. Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E219-E225.

21. Garibotto G, Russo R, Sofia A, Sala M R, Robaudo C, Moscatelli P, Deferrari G, Tizianello A. Skeletal muscle protein synthesis and degradation in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1994; 45: 1432-1439. doi:10.1038/ki.1994.187.

22. Goodship T H, Mitch W E, Hoerr R A, Wagner D A, Steinman T I, Young V R. Adaptation to low-protein diets in renal failure: leucine turnover and nitrogen balance. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 66-75.
23. Walford G A, Davis J, Warner A S, Ackerman R J, Billings L K, Chamarthi B, Fanelli R R, Hernandez A M, Huang C, Khan S Q, Littleton K R, Lo J, McCarthy R M, Rhee E P, Deik A, Stolerma E, Taylor A, Hudson M S, Wang T J, Altshuler D, Grant R W, Clish C B, Gerszten R E, Florez J C. Branched chain and aromatic amino acids change acutely following two medical therapies for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2013; 62: 1772-1778. doi: 10.1016/j.metabol.2013.07.003.
24. Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, Bonanni A, Mannucci I, Verzola D. Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. *Clin Nutr* 2010; 29: 424-433. doi: 10.1016/j.clnu.2010.02.005.
25. Boirie Y, Broyer M, Gagnadoux M F, Niaudet P, Bresson J L. Alterations of protein metabolism by metabolic acidosis in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 236-241. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00158.x
26. Schwenk W F, Beaufriere B, Haymond M W. Use of reciprocal pool specific activities to model leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* 1985; 249: E646-650.
27. Poupin N, Mariotti F, Huneau J F, Dominique Hermier D, Fouillet H. Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: a compartmental model analysis. *PLOS Comp Biol* (in press)
28. Tea I, Le Guennec A, Frasquet-Darrieux M, Julien M, Romek K, Antheaume I, Hankard R, Robins R J. Simultaneous determination of natural-abundance $\delta^{15}\text{N}$ values and quantity of individual amino acids in proteins from milk of lactating women and from infant hair using gas chromatography–isotope ratio measurement by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013; 27: 1345-1353. doi: 10.1002/rcm.6582.

29. Seila A C, Okuda K, Nunez S, Seila A F, Strobel S A. Kinetic isotope effect analysis of the ribosomal peptidyl transferase reaction. *Biochemistry* 2005; 44: 4018-4027. doi: 10.1021/bi047742f.
30. Gannes L Z, del Rio C M, Koch P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol* 1998; 119: 725-737. doi: 10.1016/S1095-6433(98)01016-2.

2.1.3 Etude REGULACT portant sur le nouveau-né et la composition du lait maternel (Soumise)

Notre équipe étudie l'effet de l'obésité maternelle sur l'allaitement maternel exclusif, la croissance pré et post natale de l'enfant et la prise de poids maternelle (123). Pour poursuivre l'exploration des déterminants de la croissance chez le nouveau-né après la comparaison entre le nouveau-né et sa mère, nous avons voulu comparer la composition du lait maternel, en particulier la concentration en leptine et la composition en macronutriments, d'enfants en allaitement maternel issus de mère obèses (n=50) et non obèses appariées (n=50). L'alimentation étant totalement contrôlée, l'allaitement exclusif constitue un modèle d'étude pour l'exploration de l'AIN en ^{15}N . Il est ainsi possible de calculer l'effet trophique et d'isoler le rôle de la croissance. Ce projet a été financé par le PHRC interrégional 2009 et a été réalisé dans l'unité INSERM CIC1402 (CHU Poitiers).

Les résultats qui concernent l'objectif principal de cette étude sont en cours de soumission (3^{ème} auteur). Cette étude montre que le gain de poids lors de la gestation est plus faible chez les femmes obèses en raison d'une moindre prise de poids non fœto-placentaire. Bien que la concentration en leptine dans le lait des femmes obèses était supérieure, nous n'avons pas observé d'association avec la prise de poids de l'enfant à 1 mois en allaitement exclusif. Ceci suggère un effet mineur de la leptine en post-natal. Il n'existait pas de différence dans la concentration des macronutriments selon que la mère était obèse ou non. Le débit de lait mesuré sur le sein controlatéral à la tétée était corrélé avec la prise de poids de l'enfant.

Nous avons comparé l'AIN en ^{15}N des cheveux de ces mêmes enfants à l'âge de 1 mois. Nous n'avons pas observé de différence entre l'AIN en ^{15}N des cheveux de nouveau-nés nés de mère obèse ou non (respectivement 9,9‰ [9,7-10,1] vs. 9,5‰ [9,3-9,8], $p=0,09$), alors que l'AIN en ^{15}N du lait des mères obèses était plus élevé (6,4‰ [6,1-6,7] vs. 5,9‰ [5,6-6,2],

p=0,006). Les ingesta maternels n'ont pas été analysés pour savoir s'il existait une différence d'AIN en ^{15}N entre les mères obèses et non obèses mais cette variation pourrait refléter un métabolisme protéique plus intense chez les mères obèses, comme déjà montré dans la littérature chez l'enfant et l'adulte (124,125). La croissance (poids et longueur) dans les groupes n'était pas différente, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence de fractionnement isotopique. Cela suggère que le métabolisme a un effet plus important que l'alimentation dans la détermination de l'AIN en ^{15}N . Cette étude contrôlait partiellement l'apport du nouveau-né et a donc permis de mesurer l'effet propre du métabolisme.

Une analyse complémentaire de l'AIN en ^{15}N des protéines et de l'urée (riche en ^{14}N) du lait maternel est en cours car l'urée pourrait participer à cet effet trophique important.

Ce travail est en cours de rédaction (1^{er} auteur).

Frasquet-Darrieux M, Gaud MA, De Luca A, Christin P, Boquien CY, Millet C, Herviou M, Darmaun D, Ingrand P, Hankard R. Milk composition, gestational weight gain and body composition in obese mothers. Article soumis - Obesity
--

Milk composition, gestational weight gain and body composition in obese mothers.

Marine Frasset-Darrieux^{1,2}, MD, Marie-Agnès Gaud^{1,2,3}, MD, Arnaud DeLuca^{1,2}, MD, Patricia Christin^{3,4}, MD, Clair-Yves Boquien^{5,6}, PhD, Christine Millet⁷, MD, Manon Herviou^{1,2}, MS, Dominique Darmaun^{5,6}, MD, PhD, Pierre Ingrand^{1,2}, MD, PhD, Régis Hankard^{7,8}, MD, PhD.

Affiliations:

1. INSERM, CIC 0802, Poitiers, F-86000, France
2. Université de Poitiers, Poitiers, F-86000, France
3. Pédiatrie Multidisciplinaire-Nutrition de l'Enfant, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, F-86000, France
4. Maternité, Centre Hospitalier Chatellerault, Chatellerault, F-86100, France
5. INRA, UMR 1280, IMAD, CRNH Ouest, F-44000, France
6. Nuclear Medicine laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, F-86000, France
7. Inserm U 1069, F-37000 Tours; CHU Tours, F-37000 Tours, France
8. Université F Rabelais, F-37000 Tours, France

Address correspondence to: Professor Régis Hankard, MD, PhD, Inserm U 1069, F-37000 Tours; CHU Tours, F-37000 Tours ; Université F Rabelais, F-37000 Tours telephone: 33 2 47 47 98 17, fax: 33 2 47 47 60 15, e-mail: regis.hankard@inserm.fr

Short title: Breast milk composition in obese mothers

Abbreviations:

BMI-body mass index

OBE-obese group

NOBE-non obese group

Key-Words : [Breastfeeding-Obesity-Leptin-Gestational weight gain-Pregnancy](#)

Funding source:

The research was funded by the regional hospital program for clinical research of Western France (PHRC interregional grand-ouest; B91049-20).

Financial disclosure statement:

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Potential conflicts of interest:

The authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose.

Clinical trial registry

This clinical trial was registered at the EudraCTClinical Trials Registry (eudract.ema.europa.eu) as 2009-A00912-55.

What is already known about this subject?

Mothers with pre-gestational obesity gain less weight during pregnancy, full-breastfeed less and for a shorter period of time

What does this study add?

Mothers with pre gestational obesity had lower non-foeto-placental weight gain

One month after birth, milk leptin concentration was higher in mothers with pre-gestational obesity but lactose, lipids and protein content did not differ

We did not observe any difference in infant growth at one month

ABSTRACT (200 words)

Objective

Mothers with pre-gestational obesity (PGO) gain less weight during pregnancy, full-breastfeed less and for a shorter period of time than pre-gestational lean (PGL) mothers. Whether breast milk composition differs remains unknown.

Methods

This prospective controlled study compared leptin and macronutrient milk composition at 1 month in exclusively breastfed infants born from PGO and PGL mothers. Fifty PGO mothers were matched for age, parity, ethnic origin, and educational level with 50 PGL mothers. Gestational weight gain (GWG) was studied on a subset of the screening population.

Results

GWG was studied in 1452 women; a third of them were obese or over-weight. PGO women had lower GWG due to a lower non-foeto-placental weight gain. The controlled study showed that PGO women did not report more difficulties breastfeeding and recovered pre-gestational BMI at one-month post-partum. Their milk leptin concentration was higher but we did not observe any difference in lactose, lipids and protein content and infant weight gain when compared to PGL women. Calculated milk flow on one nursing and breast was correlated to weight gain at one month.

Conclusions

Maternal obesity may regulate gestational weight gain. In spite of higher milk leptin concentration infant weight gain was not affected.

Obesity in women of reproductive age is increasing, affects the outcome of pregnancy on both maternal and fetal side and contributes to the health-status of the offspring at the adult age (1, 2). Breastfeeding may lower the risk of being obese later on. Many factors We have previously observed in an observational study that infants born to women with pre-gestational obesity (PGO) and exclusively breast-fed grew slowly during the first month of postnatal life (3). The effect was small and transient as suggested by the Inserm EDEN cohort study (4). Moreover, PGO women gained less weight during pregnancy, some of them even losing weight (3). We hypothesized that maternal pre-gestational obesity might regulate weight gain during pregnancy and after birth. Recent articles reported a positive correlation between breast milk leptin concentration (MLC) and body mass index (BMI) in non-obese women, with putative consequences on the infant's metabolism (5). Milk leptin was positively correlated with fat mass, did not vary between fore and hindmilk and was not correlated to infant weight gain at one month (6). In addition, obese mothers have reported more difficulties breastfeeding, with a potential impact on milk output and infants' weight gain. We designed a case-control pilot study aiming at comparing breast-milk composition (lactose, lipid, protein, and leptin) in exclusively breastfeeding PGO and pre-gestational lean (PGL) mothers. Gestational weight gain (GWG) was studied on a larger population extracted from the screening population of the controlled study.

SUBJECTS AND METHODS

Participants

Women and child dyads were recruited in the university maternity hospital of Poitiers and the maternity hospital of Chatellerault, both in Western France. PGO mothers ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$) were matched with PGL mothers ($18.5 \text{ kg.m}^{-2} \leq \text{BMI} < 25 \text{ kg.m}^{-2}$) for age (± 5 years), pregnancy status (first child vs. second or more), ethnic origin, and maternal educational level.

Mother/infant dyads with preexisting chronic or gestational diseases, smokers during pregnancy, twin pregnancies, children born prematurely (*i.e.* with a gestational age (GA) <37 weeks of amenorrhea), with low a birth weight (birth weight < 3rd centile for GA according to French references AUDIPOG (7), or hospitalized in the neonatal period were excluded. Only infants who remained exclusively breastfed at 1-month post-partum and their mothers participated in the study.

The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The CPP Ouest III ethics committee approved the protocol on Sept. 7th 2009. After explaining the study protocol to the mother, written consent was obtained from all participating mothers.

Study design

Participating mothers and their infants were investigated at the clinical investigation unit (Inserm CIC 0802) of the university hospital of Poitiers at one-month post-partum. Visits were always scheduled between 9 and 11 in the morning. Breast-milk was collected from the breast opposite to the breast suckled by the baby using a breast pump (Symphony, Medela™, Switzerland). Breast-milk collection lasted as long as the baby suckled. Milk flow (mL.min⁻¹) was calculated as the volume collected (mL) divided by the duration (min) of the milk collection. Breast milk was aliquoted and frozen at -80°C until analysis. Samples were blind-coded with a same identification number for each pair. A physical examination was performed for both mother and infant. Maternal height was measured with a stadiometer (Model HR 001, Tanita™, Leicester, England) and maternal weight was measured using electronic scales (Model 803, Seca™, Hamburg, Germany). Weight and height before pregnancy, at delivery as well as placental weight were obtained from medical file. Body mass index (BMI) was computed by the standard formula. Infant weight was measured using

electronic Seca scales (Model 335, Seca™, Hamburg, Germany) and length using a steel somatometer (Model 207, Seca™, Hamburg, Germany).

GWG was calculated as mother weight at birth (MWb in kg) - weight before pregnancy (MWp in kg). Percent GWG was calculated as (MWb-MWp)/MWp. Non foeto-placental gestational weight gain (NFPGWG) was calculated as MWb-MWp-BW-500 with BW=birth-weight and 500 is the mean amniotic fluid mass i.e. 500 cm³ (8).

Body composition was measured in standardized conditions using a bioelectrical impedance analyser (Quadsan 4000, Bodystat Ltd., Isle of Man). Percent fat mass was calculated using built-in equations for adults from 50kHz values (9). Mothers were requested to answer questions about breastfeeding and stool frequency of their child.

Leptin analysis

Leptin was analyzed using Human leptin radio immune assay kit (Linco research Inc., USA). Whole milk samples were vigorously vortexed to ensure sample uniformity and were diluted 1:1 with the assay buffer, as recommended in the assay. Analysis was performed in duplicate. All tubes were counted in a gamma counter and leptin concentrations were calculated using automated data reduction procedures.

MIRIS analysis

Human milk was analyzed using a MIRIS® apparatus (Uppsala, Sweden). Two samples each of 2 mL were thawed, warmed at 40°C and homogenized for 90 sec using a Bioruptor® sonicator (Diagenode, Liège, Belgium). Analysis was performed in duplicate. Protein, lipid, lactose, and total dry matter contents are true measurements, whereas milk energy content (kcal.100mL⁻¹) was calculated, assuming energy content of 9.25, 3.95, and 4.4 kcal.g⁻¹ of fat, lactose, and protein respectively. The absence of drift in the MIRIS measurement over time

was checked using aliquots of frozen milk samples specifically prepared and stored for this purpose.

Statistical analysis: A power calculation set the number of mother-infant dyads to be included at 100 (50 obese and 50 non-obese mothers). This allowed the detection of a difference of $0.15 \pm 0.2 \text{ ng.mL}^{-1}$ for leptin concentration in milk, the focal point of the study (95% power, 5% significance level). Data are expressed as means $\pm$ SD. Comparisons between groups and within pairs were performed using a paired t-test. Correlation analyses were performed on the whole dataset using Pearson's coefficient.

RESULTS

The screening population totalized the 9445 mothers who gave birth between Feb. 22nd 2010 and Sep. 10th 2012 in the maternity wards of the University hospital of Poitiers and general hospital of Chatellerault, France (Figure 1).

Gestational weight gain was studied in 3188 women who gave birth in both maternity wards, from Feb. 22nd 2010 and Aug. 18th 2011. We removed from statistical analysis 286 premature birth < 37 weeks of amenorrhea, 85 multiple pregnancies and 1365 files with missing data to get 1452 files with full data. Pre-gestational BMI < 18.5 kg.m⁻² (thinness), between 18.5 and 25 kg.m⁻² (normal weight), between 25 and 30 kg.m⁻² (overweight) and over 30 kg.m⁻² (obesity) were present in respectively 10, 57, 20 and 13% of cases. There was no difference in age between obese and non-obese mothers (Table 1). Pre-gestational diseases were present in 192 women and more frequently in PGO women (25 vs. 12%, $p=0.0002$). Most frequent diagnoses were endocrine diseases ($n=31$) including diabetes (4 in 31), hypertension ($n=16$) and drug addiction ($n=8$). One hundred and forty two women gave birth through cesarean section, more frequently in obese women (16 vs. 9%, $p=0.003$). Gestational and post-gestational complications for mother and child were more frequent in obese mothers

(27 vs. 13%, $p < 10^{-4}$). Most frequent diagnoses were gestational diabetes ($n=71$), hypertension ($n=19$), fetal growth impairment ($n=30$). One woman in 3 was smoker with no difference whether she was obese or not.

Figure 1: Study flow chart (adapted from Consort recommendations)

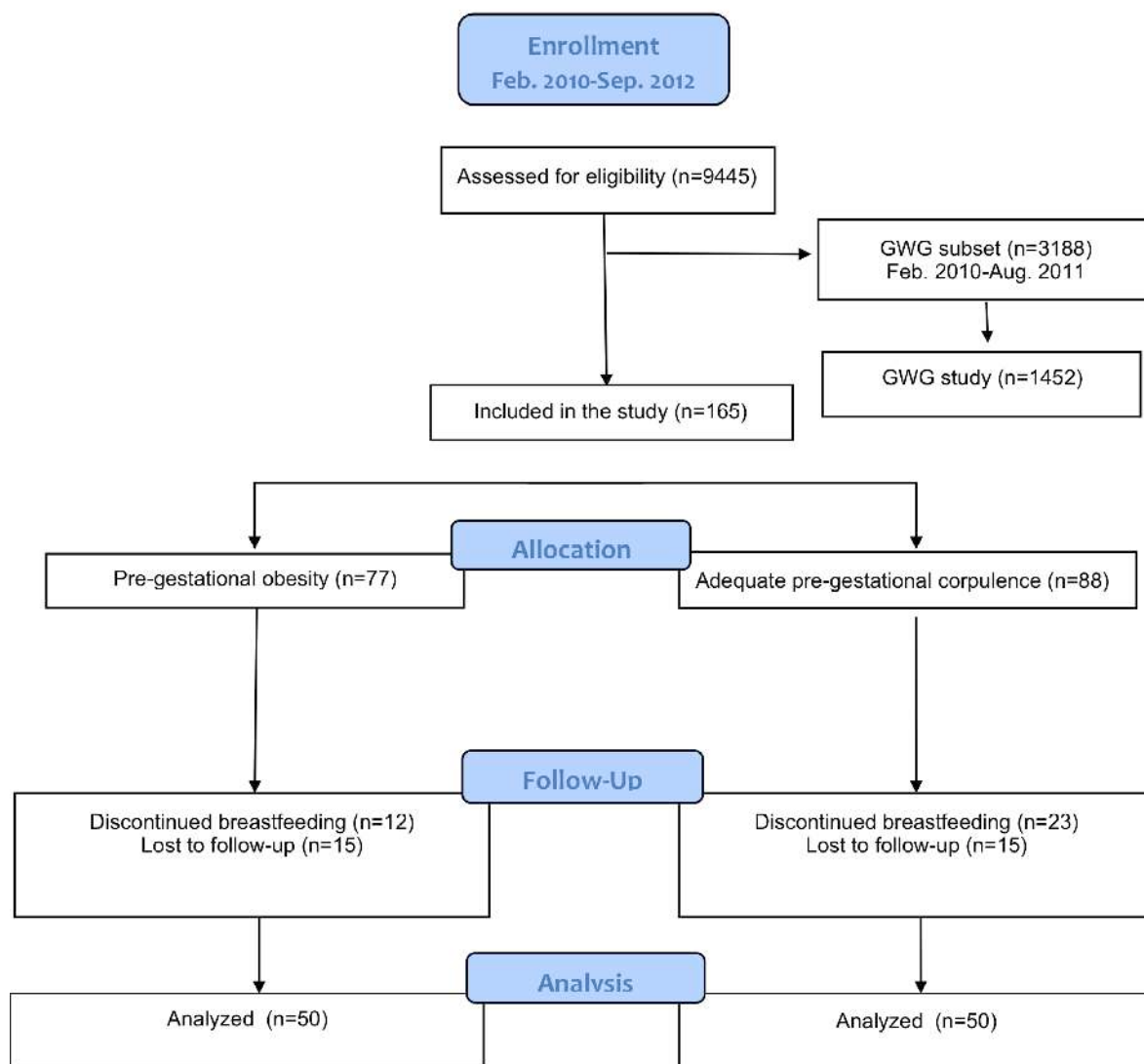


Table 1: Population characteristics

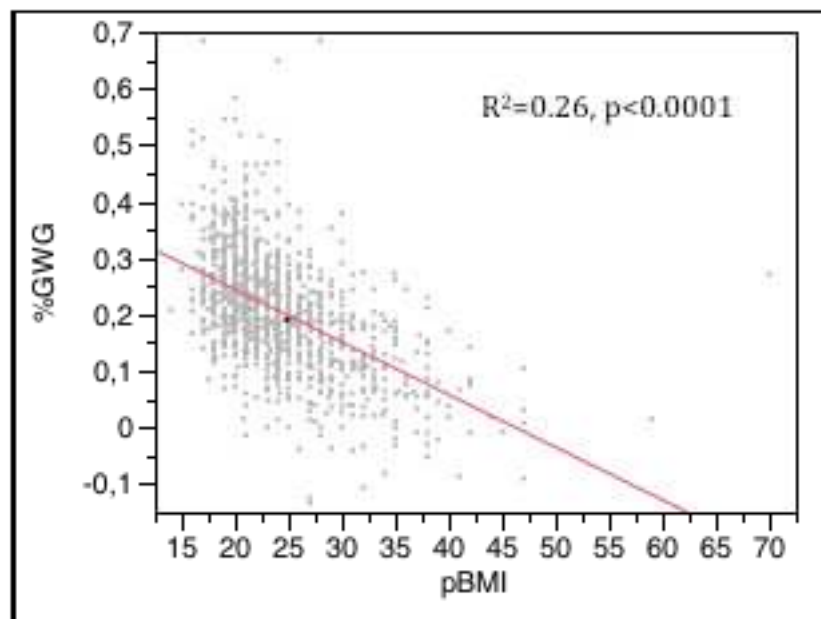
	All	18.5<BMI<25 kg.m ²	BMI≥30 kg.m ²	p
N	1452	821	192	
Age (y)	29.5 [29.2-29.7]	29.4 [29.0-29.7]	29.8 [29.0-30.6]	0.37
BMI (kg.m⁻²)	23.9 [23.6-24.2]	21.4 [21.3-21.6]	34.7 [34.0-35.4]	<10 ⁻⁴
GWG (kg)	12.6 [12.3-12.9]	13.6 [13.2-13.9]	9.6 [8.6-10.6]	<10 ⁻⁴
BW (g)	3329 [3304-3353]	3329 [3298-3360]	3414 [3342-3487]	0.007
PW (g)	585 [578-592]	577 [569-586]	624 [601-647]	<10 ⁻⁴
NFPWG (kg)	8.1 [7.8-8.4]	9.1 [8.8-9.5]	4.7 [3.6-5.8]	<10 ⁻⁴

Legend: Results are means and IC 95 between brackets; BMI is pre-gestational BMI; p is paired t-test between matched pairs of obese/non-obese mothers

Birth weight was 98 g higher in newborns born to PGO mothers while GWG and non-foeto-placental weights gain were respectively 3.9 kg and 3.5 kg less in the same group (Table 1). GWG was above IOM standards in 85% of PGL mothers while only in 59% of PGO women. Conversely 21% of PGO mothers had a gestational weight gain below IOM standard but only 3% of PGL mothers (overall khi2 test, $p<10^{-4}$). Birth-weight was positively correlated to GWG ($r^2=0.03$, $p<10^{-4}$). Children whose mothers gestational weight gain was above IOM standards had a higher birth-weight ($p<10^{-4}$). Pre-gestational BMI was negatively correlated to GWG whether expressed in kg ($r^2=0.05$, $P<10^{-4}$) or in % change from pre-gestational weight (Figure 2).

Exclusive breast-feeding, baby bottle-feeding or both were respectively observed in 57%, 41% and 2%. Obese mothers exclusively breastfed less their child than non-obese mothers (50 vs. 58%, $p=0.02$, Fisher's exact test).

Figure 2: Correlation between pre-gestational BMI and % change from pre-gestational weight



The controlled study included two groups of 50 mother/infant pairs within the 165 women who gave consent terminated the whole study and visited us at the Inserm clinical investigation center 0802 at 1 month (35 of 165 discontinued full breast feeding and switched to non exclusive breastfeeding or formula feeding and 30 left the study for other reasons)(Figure 1). In each group, mothers were primiparous (n=20) and multiparous (n=30) with no mismatch; of European origin (n=42) or African origin (n=4) and 4 mismatches (European vs. African origin); college graduate (n=5) or higher (n=30) and 15 mismatches (College vs. higher education level).

PGO mothers were heavier, 2.5 cm shorter, had a higher BMI but did not differ in age and gestational age (Table 2). Measured height at 1m was 1cm lower than pre-gestational height reported on medical file (163.1 ± 6.3 vs. 164.4 ± 6.0 cm, $p < 0.001$, $n = 100$). The difference between measured and reported height was not different between groups, respectively for PGO and PGL mothers -1.6 ± 1.5 cm vs. -1.0 ± 1.3 cm, $p = 0.07$. Infants' characteristics are shown in table 3.

Table 2: Characteristics of the Mothers

	All	18.5<BMI<25 kg.m ⁻²	BMI≥30 kg.m ⁻²	p
N	100	50	50	
Age (y)	30.7 [29.8-31.6]	30.6 [29.4-31.8]	30.8 [29.5-32.2]	0.5
BMIp (kg.m⁻²)	27.8 [26.5-29.2]	21.6 [21.2-22.0]	34.1 [33.0-35.2]	<10 ⁻⁵
Wp (kg)	75.1 [71.5-78.6]	59.3 [57.9-60.7]	90.8 [87.7-94.0]	<10 ⁻⁵
Hp (cm)	164.4 [163.3-165.6]	165.7 [164.0-167.4]	163.2 [161.6-164.7]	<0.05
Wb (kg)	85.6 [82.4-88.8](98)	72.8 [70.6-74.9](49)	98.4 [95.1-101.7](49)	<10 ⁻⁶
W1 (kg)	78.7 [75.5-82.0]	65.4 [63.4-67.4]	92.1 [89.0-95.2]	<10 ⁻⁶
GWG (kg)	10.5 [9.3-11.6]	13.3 [12.1-14.5]	7.7 [6.1-9.3]	<10 ⁻⁶
BW (g)	3441 [3349-3533]	3420 [3309-3531]	3462 [3316-3609]	ns
PW (g)	589 [564-614](98)	567 [541-594] (49)	610 [569-552] (49)	0.08
NFPWG (kg)	6.0 [4.8-7.2](96)	8.8 [7.6-10.1] (48)	3.1 [1.5-4.8](48)	<10 ⁻⁶
BMIb (kg.m⁻²)	32.3 [31.0-33.6](98)	26.9 [26.2-27.5](49)	37.7 [36.6-38.9](49)	<10 ⁻⁶
BMI1 (kg.m⁻²)	29.7 [28.4-31.0]	24.1 [23.4-24.7]	35.3 [34.2-36.4]	<10 ⁻⁶
Est. %FMp	33.1 [31.4-34.8]	25.3 [24.8-25.9]	40.9 [39.5-42.2]	<10 ⁻⁶
Est %FMb	38.6 [37.0-40.2]	31.8 [31.1-32.6]	45.4 [44.0-46.8]	<10 ⁻⁶
%FM1	33.2 [29.8-36.7] (21)	27.4 [25.7-29.2](12)	41.0 [37.5-44.5] (9)	<10 ⁻⁶

Legend: Results are means and IC 95 between square brackets; number of patients included in the means are on the second line unless they appear between brackets; Wp: pre-gestational mother weight; Wb: mother weight at birth; W1: mother weight at 1 month; GWG: gestational weight gain (kg); BW: birth-weight; PW: placental weight; NFPWG: non-foeto-placental weight gain; BMIp; maternal pre-gestational BMI; BMIb: maternal BMI at birth; BMI1: maternal BMI at 1month; %FM: percent fat mass measured by mono-frequency (50 kHz) bio-electrical impedance analysis at 1 month; Est. %FMb: estimated %fat mass at birth; Est. %FMp: estimated pre-gestational %fat mass

Table 3: Characteristics of the Infants

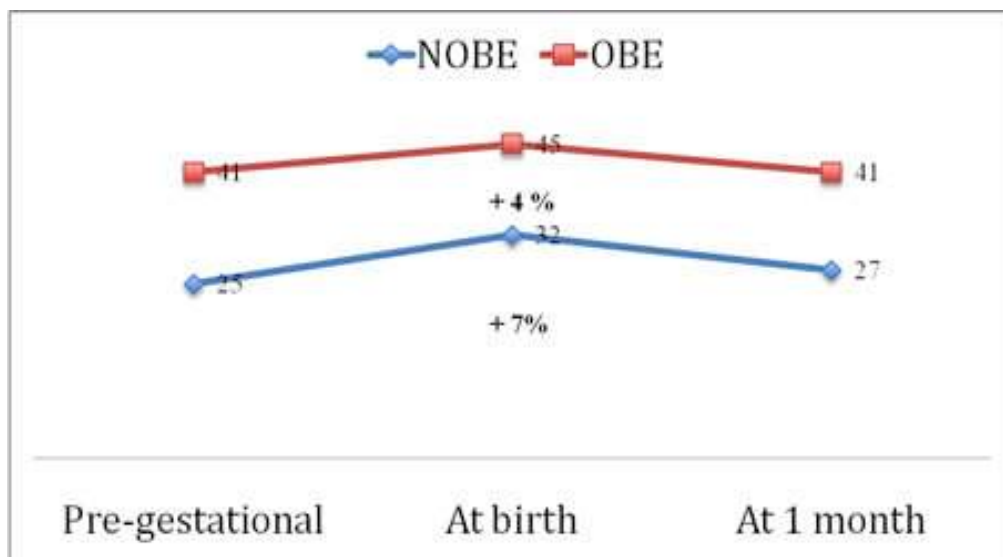
	All	18.5<BMI<25 kg.m ⁻²	BMI≥30 kg.m ⁻²	p
N	100	50	50	
At birth				
GA (w)	40.0 [39.8-40.3]	40.1 [39.8-40.4]	40.0 [39.7-40.5]	0.9
Weight (kg)	3441 [3349-3533]	3420 [3309-3531]	3462 [3316-3609]	0.7
Height (cm)	49.9 [49.5-50.3]	50.0 [49.5-50.6]	49.8 [49.2-50.4]	0.6
Head C. (cm)	34.7 [34.4-35.0]	34.8 [34.4-35.3]	34.5 [34.1-34.9]	0.3
Boys/girls	54/46	24/26	30/20	ns
At 1 month				
Age (d)	31.0 [30.2-31.8]	31.2 [30.2-31.8]	30.8 [29.6-32.0]	0.6
Weight (kg)	4235 [4112-4358]	4258 [4102-4414]	4212 [4021-4403]	0.7
Height (cm)*	53.4 [53.1-54.0]	53.6 [52.9-54.2]	53.5 [52.9-54.1]	0.9
Head C. (cm)**	36.8 [36.6-37.1]	37.0 [36.6-37.4]	36.7 [36.3-37.1]	0.3
Δ Weight (g)	794 [712-875]	838 [741-935]	750 [619-881]	0.3
WGV (g.d⁻¹)	25.4 [23.0-27.7]	26.7 [24.0-29.5]	24.0 [20.3-27.8]	0.3

Legend: Results are means and CI95 between brackets; ; p is paired t-test between matched pairs of obese/non-obese mothers; GA: gestational age; Head C.: head circumference; Δ Weight: weight gain; WGV: weight gain velocity; p is paired t-test between matched pairs of obese/non-obese mothers;; *: calculations on 49 pairs; **: calculations on 47 pairs

Gestational weight gain was 5.6 kg lower in PGO mothers due to a 5.7 kg lower non-foeto-placental weight gain (Table 2) with no difference in birth weight and placental weight. During pregnancy, BMI of PGL mothers gained 5.2 kg.m⁻² while PGL mothers gained 3.6 kg.m⁻². At 1 month, BMI of PGO mothers exclusively breastfeeding their child went back to

pre-gestational value while it was still 2.5 kg.m^{-2} above in PGL mothers. Percent fat-mass at 1 month was positively correlated to BMI ($\% \text{fat-mass} = 1.25 \cdot \text{BMI} - 1.62$, $r^2=0.86$ on 21 measures). Measured $\% \text{fat-mass}$ was higher in PGO mothers at 1 month but had returned to estimated pre-gestational values. At 1 month PGL mothers had still 2.1% fat-mass more when compared to estimated pre-gestational values. Percent fat-mass change during pregnancy and 1 month after birth is summarized in figure 3.

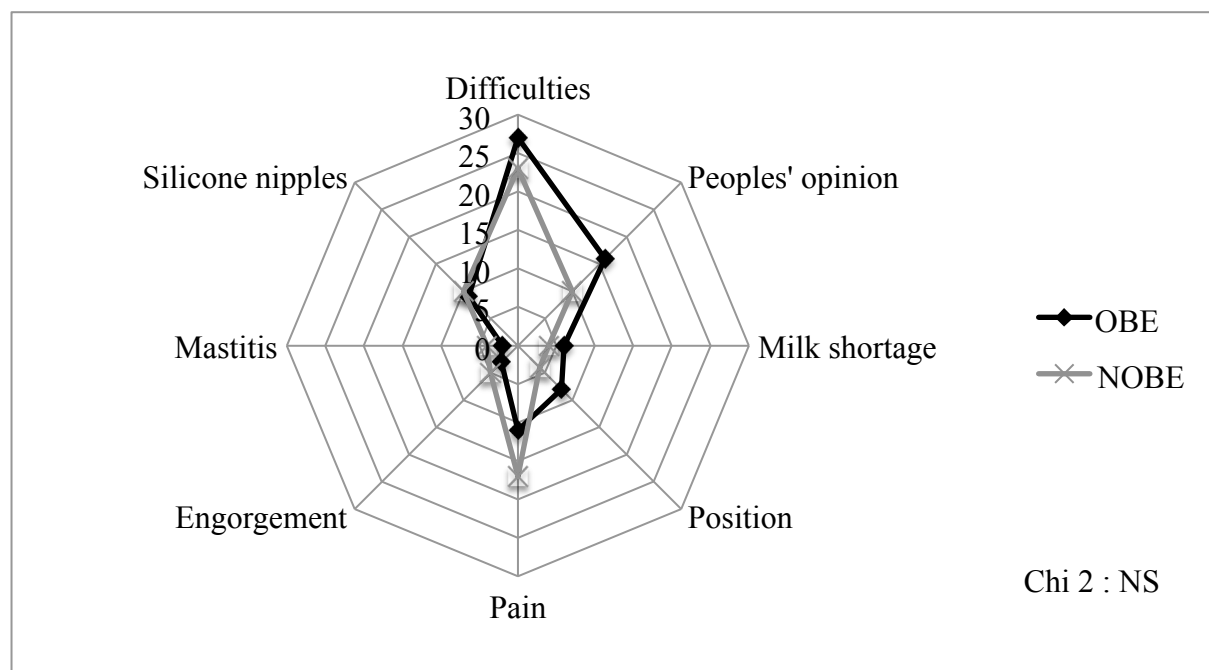
Figure 3: Mother's percent fat-mass change in pre-gestational, at birth and 1 month after birth



PGO mothers did not report more difficulties breastfeeding at 1 month (breastfeeding difficulties as a whole or finding the right position to breastfeed, the use of silicone nipple protectors, feeling uncomfortable breastfeeding in the presence of others, anxiousness, perceiving milk shortage, suffering from fatigue, milk engorgement, painful breastfeeding, mastitis, or any medication intake) (Figure 4). We did not observe any difference in the number of times the infants needed to nurse (7.7 ± 1.7 vs. 7.5 ± 1.5 times a day for PGL and

PGO groups, respectively) or in infant stool frequency (5.3 ± 2.5 vs. 4.8 ± 2.6 stools per day for PGO and PGL groups, respectively).

Figure 4: Perceived difficulties breastfeeding. NS: non significant



Twenty-six children were female in the PGL group, and 20 in the PGO group (NS). Children's characteristics are listed in table 3. We did not observe any difference between groups at birth and at 1 month regarding weight, height, head circumference, weight gain, weight gain velocity and age.

Both MLC and total dry matter were significantly higher in the PGO group (Table 4). Neither milk concentrations of lactose, lipid or protein (Table 4) nor the calculated milk energy content differed between groups. At the clinical investigation unit, milk volume tended to be lower and even though milk collection duration time was longer, calculated milk flow was significantly lower in PGO mothers (Table 4). Change in baby weight before and after nursing did not differ between groups. However the volumes of collected milk and change in

baby weight before and after nursing were positively correlated ($r=0.33$, $p=0.001$). Median difference between baby weight change before and after nursing and collected milk volume on the opposite breast was 10.0 [IC 95, 2.1-12.1] grams. Univariate analysis of weight gain at 1 month showed a significant correlation with milk flow ($r=0.26$, $p=0.02$), a borderline correlation with protein and lipid ($p=0.05$), but no correlation with either milk leptin ($p=0.28$) or lactose ($p=0.17$) concentrations. MLC was correlated to pBMI ($r^2=0.4$, $p<0.0001$) and GWG ($r^2=0.03$, $p<0.0001$).

Table 4: Milk composition and flow

	All	18.5<BMI<25 kg.m ⁻²	BMI≥30 kg.m ⁻²	p
Leptin	3.7 [3.2-4.2]	2.5 [2.1-3.0]	4.8 [4.1-5.6]	<10 ⁻⁵
(ng.mL⁻¹)	(100)	(50)	(50)	
Lactose	6.8 [6.7-6.9]	6.8 [6.7-6.9]	6.8 [6.7-6.9]	0.97
(g.100 mL⁻¹)	(94)	(47)	(47)	
Lipid	3.5 [3.2-3.8]	3.3 [2.9-3.7]	3.7 [3.2-4.2]	0.16
(g.100 mL⁻¹)	(94)	(47)	(47)	
Protein	1.0 [0.9-1.0]	1.0 [0.9-1.0]	1.0 [0.9-1.0]	1.00
(g.100 mL⁻¹)	(94)	(47)	(47)	
Energy	63.6 [60.9-66.3]	61.5 [58.2-64.8]	65.7 [61.4-70.0]	0.12
(kcal.100 mL⁻¹)	(94)	(47)	(47)	
Total dry matter	12.1 [11.8-12.4]	11.7 [11.4-12.1]	12.4 [11.9-12.8]	<0.05
(g DW.100 mL⁻¹)	(94)	(47)	(47)	
Volume of milk	50 [47-54]	53 [48-58]	47 [43-51]	0.07
(mL)	(100)	(50)	(50)	
Nursing	11 [10-12]	10 [8-11]	12 [10-13]	0.08

duration (min)	(100)	(50)	(50)	
Milk Flow	5.9 [5.2-6.6]	6.7 [5.7-7.8]	5.1 [4.1-6.0]	0.03
(mL.min⁻¹)	(100)	(50)	(50)	
Δ Weight (g)	47±36 [40-55]	54±36 [43-65]	40±34 [30-51]	0.09
after nursing	(84)	(42)	(42)	

Legend: Results are means and CI95 between brackets; n tested between parentheses; p is paired t-test between matched pairs of obese/non-obese mothers

DISCUSSION

A third of women giving birth in the two maternity wards of this clinical trial were obese or over-weight. Weight gain was negatively correlated to pre-gestational BMI. Women with pre-gestational obesity had lower gestational weight gain due to a lower non-foeto-placental weight gain. Fully lactating women with pre-gestational obesity did not report more difficulties breastfeeding and recovered pre-gestational BMI and %fat at 1-month post-partum. Their milk leptin concentration was higher but we did not observe any difference in lactose, lipids and protein content when compared to non-obese women. Calculated milk flow on one nursing and breast was correlated to weight gain at one month.

Frequency of obesity and over-weight both increased, respectively from 10 to 13% and from 16 to 20% when compared to our 2008 study performed in the same hospital (3). This is consistent with the French triennial large-scale study (OBEPI), which reported increasing prevalence of obesity in French women up to 15.7% (10). In the later study, the Poitou-Charentes region stands 1.2% below overall prevalence of obesity in France i.e. 15% and this may account for the slight difference between present results and those of OBEPI 2012. Therefore obesity is a public health matter in women in age to give birth. Impact of PGO on

maternal, fetal and newborn outcomes is well known(11). We were able to show a small (~100g) but significant increase in birth-weight in newborns of PGO mothers because of the large number of women included in the screening population of this study. Pre-gestational BMI is positively linked to the offspring corpulence and cardio-metabolic parameters at 32 y independently of gestational weight-gain (2).

In this study, PGO women gained less weight during pregnancy in accordance with previous results (3, 8). Gestational weight-gain is positively correlated to offspring adiposity at 32 y independently of pre-gestational BMI (2). Whether regulation of gestational weight gain occurs on purpose or not remains to be determined. One might hypothesize that an adequate fat mass is necessary for optimal foeto-placental development and already attained in obese women. To date, mechanisms involved in such regulation are to be determined.

Among PGO women, 26% (n=49) gained less than 5 kg during pregnancy while only 5% of non-obese women (n=60). Fifteen of them even lost weight during pregnancy up to 11 kg. Present study did not allow us to determine whether this was due to a regimen or to other causes. Pre-pregnancy diseases were not more represented in this group of women. We had already made same observation in our previous study (3). Even though dietary and lifestyle intervention may be efficient in reducing GWG (1), more studies are needed to better define potential benefits and harms of such programs (12, 13). Recent data show a positive linear correlation between mother and fetus indices of protein accretion suggesting that nutritional status of the mother directly determines that of the fetus even within a normal range of BMI (14). To date, weight-losing programs during pregnancy should be avoided in the absence of evidence of innocuousness.

Present data as well as older observations (8) suggest that pre-gestational corpulence may regulate gestational weight gain. Even though we cannot exclude that some women paid more attention to weight control none was on a weight control program and followed by a dietician. Function and mediators of such a spontaneous regulation are unknown. We observed a positive correlation between MLC and BMI. Other adipocytokines such as leptin, adiponectin, resistin, TNF- α , IL-6 or appetite regulating peptides GLP-1, PYY, ghrelin were not included in the present study that did not include any blood sampling.

MLC was nearly two-fold higher in the OBE group than in the NOBE group. This confirms the working hypothesis of our study protocol that MLC is increased in obese mothers. This is consistent with other studies performed in lean, overweight and slightly obese women showing positive correlation between MLC and pre-gestational BMI (5, 6). However, we were not able to show any difference in weight gain at 1 month in infants born to PGO mothers and exclusively breastfed. Same conclusion was drawn in a smaller group of women with a lower BMI (6). In a rat model, orally administered leptin has been shown to be absorbed by the immature stomach and may have a regulatory effect on weight gain of the offspring (15, 16). As maturation of the gastrointestinal tract proceeds, leptin absorption diminishes as stomach leptin secretion rises (15, 16). In humans plasma leptin concentration falls from birth to 4 weeks and comes up afterwards with increasing weight (17). Our results suggest no effect of milk leptin on infant gain at one month. Other appetite hormone such as GLP-1 may be of interest but were not tested in the present study. Of notice, we were not able to show a lower weight gain contrary to our previous findings (3). The reason for the discrepancy between the 2 studies is unclear. The 2008 study was strictly observational and data at 1 month were collected by telephone interview. Involvement of participating mothers might have been stronger in the present study, with a possible impact on breastfeeding

practices, particularly in obese women who were identified as a population at risk to discontinue breastfeeding. Testing differential weight gain in infants born to PGO and PGL mothers would require a large study population to reach significance.

Estimated milk flow was lower in obese mothers and correlated with infant weight gain during the first month. It was measured under standardized conditions at the clinical investigation center on the breast contralateral to the breast on which the child was suckling. However, these conditions were obviously not those prevailing in “real life” and any extrapolation to daily breast milk intake from nursing frequency and volume collected on 1 nursing must be taken cautiously. Ingested milk volume may be estimated using tracer dilution methods after administration of deuterium-labeled water to the nursing mother. However, such methodology is cumbersome, invasive, and requires multiple milk and urine collections (18, 19). Moreover milk production and frequency is determined by infant’s demand and interaction. Whatever method is used, the diagnosis of insufficient milk production requires a careful analysis of the infant’s growth chart (20). Ultrasound may provide information on the oxytocin dependent milk-ejection reflex (21), a potential cause for insufficient milk production. From a practical standpoint, measuring milk flow might be a useful, ethically usable estimate of milk production, on a day-to-day basis.

There was a trend toward a higher fatty-acid concentration in breast milk from obese mothers at one month. This is consistent with the study by Mäkelä et al who measured breast milk fatty-acid composition at 3 months in mothers with a pre-pregnancy BMI either under or above 25 kg.m⁻² (22). In that study, saturated fatty acids were higher and n-3 series fatty acids lower (total and 20:5n-3 *i.e.* eicosapentaenoic acid, and 22:6n-3 *i.e.* docosahexaenoic acid) in milk from obese mothers. A higher fat content might induce premature satiety. It is

noteworthy that we observed a weak correlation between milk lipid concentration and weight gain at one month. Milk fat content is known to change over the course of the breastfeeding period as well as during a single nursing (23). Another study recently reported a positive correlation between fore-and hindmilk fat content and weight gain at 1 month (6). Other components of breast milk were consistent with what is already known using the same methodology (24) and were not different between groups.

In summary, obesity and overweight may concern up to one third of women attending maternity ward in France. Present study suggests that pre-gestational BMI may affect gestational weight gain and may have physiological significance. However any intervention aiming at losing weight during this period must be performed very cautiously. We also show that human milk from obese mothers has a higher MLC. However, relevancy of this observation on weight gains regulation in the offspring remains to be established in humans. Milk flow measured on one breast and one nursing might help in clinical practice estimate milk supply to infants.

Acknowledgments

Authors do not disclose any financial or personal conflict of interest. All authors fulfill the criteria for authorship therefore provided substantial contribution to the study, participated in the writing, approved the final version and are accountable for all aspects of the work. Drs Gaud and Frasquet contributed equally in this study in conducting research, acquiring and analyzing the data within a Master 2 degree in nutritional sciences (www.numesi.com, University of Paris V&VII). Dr Christin conducted research, acquired and analyzed the data (MIRIS analysis) within a post-graduate degree in clinical nutrition. Dr Boquien acquired and analyzed the data (MIRIS analysis). Dr Millet acquired and analyzed the data (leptin analysis using RIA). Mrs Herviou conducted research, acquired and analyzed the data for milk flow measurements within a Master 1 degree. Dr DeLuca and Pr Darmaun contributed to the data analysis and critically reviewed the manuscript. Pr Ingrand contributed to the design, statistical analysis, and writing. Pr Hankard designed, conducted, analyzed and wrote the article.

Special thanks to Mrs. Sonia Leroux, Elodie Rogeon, Dr. Pierre Jean Saulnier from the Inserm CIC 0802, to Hélène Billard from INRA, to Pr Fabrice Pierre and Emmanuelle Descombes from the maternity ward of Poitiers University Hospital, Dr Alain Godard and Dr Florence Compain from the maternity ward of Chatellerault General Hospital, and to participating families.

References

1. Thangaratinam S, Rogozinska E, Jolly K, *et al.* Effects of interventions in pregnancy on maternal weight and obstetric outcomes: meta-analysis of randomised evidence. *BMJ* 2012;344:e2088.
2. Hochner H, Friedlander Y, Calderon-Margalit R, *et al.* Associations of maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain with adult offspring cardiometabolic risk factors: the Jerusalem Perinatal Family Follow-up Study. *Circulation* 2012;125:1381–1389.
3. Mok E, Multon C, Piguel L, *et al.* Decreased full breastfeeding, altered practices, perceptions, and infant weight change of prepregnant obese women: a need for extra support. *Pediatrics* 2008;121:e1319–1324.
4. Regnault N, Botton J, Forhan A, *et al.* Determinants of early ponderal and statural growth in full-term infants in the EDEN mother-child cohort study. *Am J Clin Nutr* 2010;92:594–602.
5. Miralles O, Sánchez J, Palou A, Picó C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obes Silver Spring Md* 2006;14:1371–1377.
6. Schueler J, Alexander B, Hart AM, Austin K, Larson-Meyer DE. Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum. *Obes Silver Spring Md* 2013;21:1451–1458.
7. Mamelle N, Munoz F, Martin JL, Laumon B, Grandjean H. [Fetal growth from the AUDIPOG study. II. Application for the diagnosis of intrauterine growth retardation]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 1996;25:71–77.
8. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines. *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. (Rasmussen KM, Yaktine AL (eds.)). Washington (DC):

National Academies Press (US); 2009.

9. A. Hamrani HB. Fat-free mass prediction equation for Moroccan women in the 1st trimester of pregnancy using bioelectrical impedance analysis and deuterium oxide dilution. *Int J Body Compos Res* 2012 Vol 10 No 1 15–20 2012;10:15–20.
10. Charles M-A, Eschwège E, Basdevant A. Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obes Silver Spring Md* 2008;16:2182–2186.
11. Ramachenderan J, Bradford J, McLean M. Maternal obesity and pregnancy complications: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2008;48:228–235.
12. Furber CM, McGowan L, Bower P, Kontopantelis E, Quenby S, Lavender T. Antenatal interventions for reducing weight in obese women for improving pregnancy outcome. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;CD009334.
13. Campbell F, Johnson M, Messina J, Guillaume L, Goyder E. Behavioural interventions for weight management in pregnancy: a systematic review of quantitative and qualitative data. *BMC Public Health* 2011;11.
14. De Luca A, Boisseau N, Tea I, *et al.* $\delta(15)\text{N}$ and $\delta(13)\text{C}$ in hair from newborn infants and their mothers: a cohort study. *Pediatr Res* 2012;71:598–604.
15. Picó C, Oliver P, Sánchez J, *et al.* The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes* 2005 2007;31:1199–1209.
16. Sánchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Picó C, Palou A. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* 2005;146:2575–2582.
17. Helland IB, Reseland JE, Saugstad OD, Drevon CA. Leptin levels in pregnant women and newborn infants: gender differences and reduction during the neonatal period. *Pediatrics* 1998;101.
18. Butte NF, Wong WW, Patterson BW, Garza C, Klein PD. Human-milk intake

measured by administration of deuterium oxide to the mother: a comparison with the test-weighing technique. *Am J Clin Nutr* 1988;47:815–821.

19. Moore SE, Prentice AM, Coward WA, *et al.* Use of stable-isotope techniques to validate infant feeding practices reported by Bangladeshi women receiving breastfeeding counseling. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1075–1082.

20. Jelliffe DB, Jelliffe EF. The volume and composition of human milk in poorly nourished communities. A review. *Am J Clin Nutr* 1978;31:492–515.

21. Ramsay DT, Kent JC, Owens RA, Hartmann PE. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics* 2004;113:361–367.

22. Mäkelä J, Linderborg K, Niinikoski H, Yang B, Lagström H. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. *Eur J Nutr* 2013;52:727–735.

23. Guesnet P, Antoine JM, Rochette de Lempdes JB, Galent A, Durand G. Polyunsaturated fatty acid composition of human milk in France: changes during the course of lactation and regional differences. *Eur J Clin Nutr* 1993;47:700–710.

24. Casadio YS, Williams TM, Lai CT, Olsson SE, Hepworth AR, Hartmann PE. Evaluation of a mid-infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk. *J Hum Lact Off J Int Lact Consult Assoc* 2010;26:376–383.

2.1.4 Résultats préliminaires chez la souris

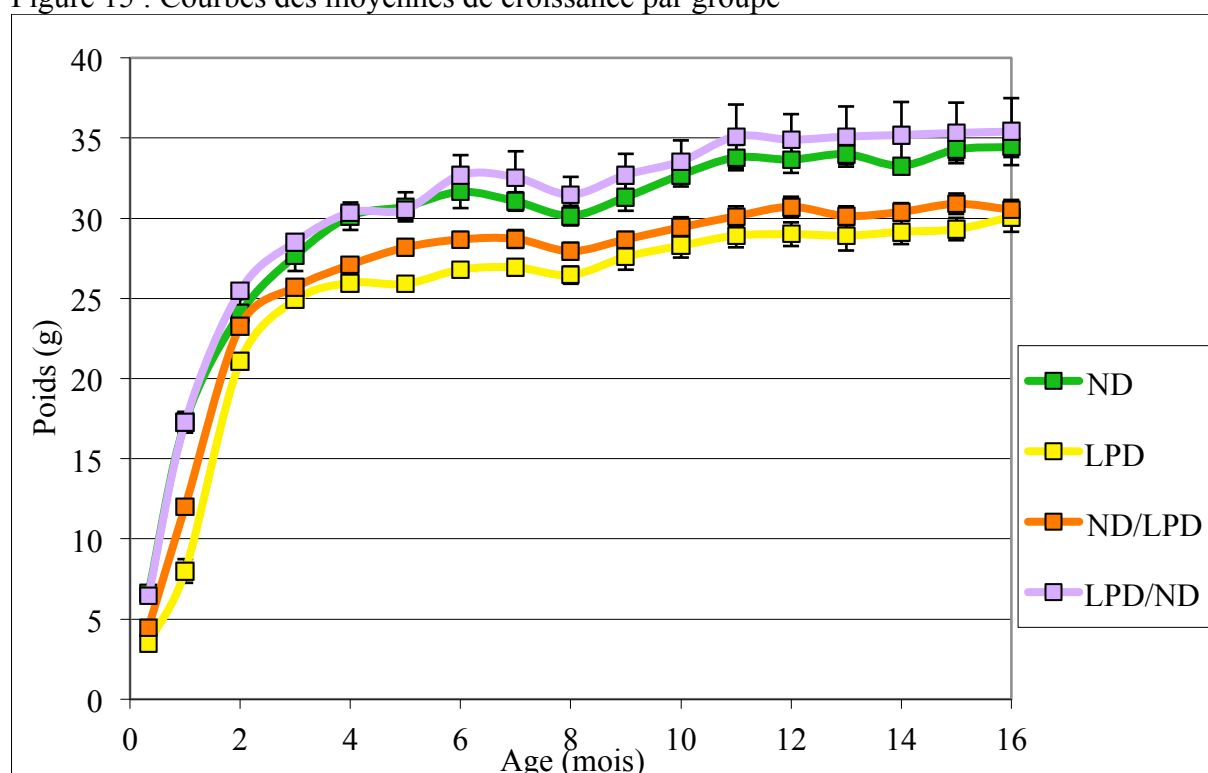
L'étroite corrélation entre l'AIN en ^{15}N des cheveux de la mère et de l'enfant que nous avons observée dans la cohorte EDEN nous a poussé à étudier l'effet d'une restriction d'apport protéique chez l'animal. La linéarité de la relation suggérait qu'une restriction d'apport chez la mère pouvait directement conditionner le métabolisme fœtal. Nous avons eu l'opportunité de collaborer avec l'équipe des Drs Pierre Fafournoux et Céline Jousse à l'INRA UMR 1019 de Theix qui travaillent avec ce type de modèle dans un autre domaine. Nos discussions ont permis de réaliser le projet commun ci-dessous, première pierre d'une collaboration durable.

Nous avons étudié le modèle de souris Balb/c développé à l'INRA UMR 1019 de Theix. Dans ce modèle de restriction protéique, il a été montré qu'une restriction au cours de la gestation et de la lactation aboutissait à un phénotype différent dans la descendance avec un poids plus faible avec une diminution de la masse grasse, une prise alimentaire augmentée, un taux de leptine plus bas mais une plus grande réactivité à la leptine, associée à une déméthylation du promoteur de la leptine (126). Ces souris étaient donc métaboliquement plus actives.

Nous avons mesuré l'AIN en ^{15}N de souris issues de mère ayant un régime contrôlé en protéines durant la gestation et/ou la lactation, soit normal (22% de protéines - ND) soit restreint (10% de protéines - LPD). Le métabolisme protéique n'a pas été directement mesuré. Quatre groupes ont été individualisés : ND (contrôles, n=4) pendant la gestation/lactation, ND/LPD (équivalent de restriction de croissance ex utero, n=8), LPD/ND (équivalent de restriction de croissance in utero, n=8), LPD (restriction globale de croissance, n=6). Après le sevrage à 4 semaines de vie, les souris ont été nourries avec une alimentation standard et sacrifiées à l'âge de 16 mois. L'AIN en ^{15}N a été mesurée par irm-MS dans les poils, le foie et le muscle.

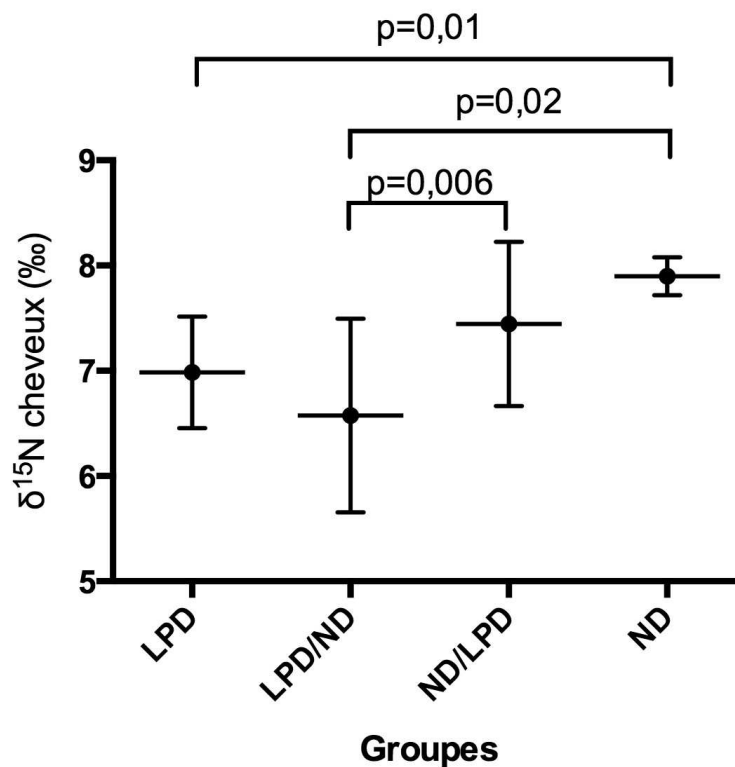
Il existait une différence de poids à 16 mois, respectivement pour les groupes LPD, LPD/ND, ND/LPD et ND : $30,1 \pm 2,3$ g, $35,4 \pm 5,9$ g, $30,5 \pm 1,8$ g et $34,4 \pm 1,3$ g ; $p=0,03$ (ANOVA) (Figure 15). Il existait de même une différence en $\delta^{15}\text{N}$ des poils dans les mêmes groupes, respectivement : $7,0 \pm 0,5\text{‰}$, $6,6 \pm 0,9\text{‰}$, $7,4 \pm 0,8\text{‰}$ et $7,9 \pm 0,2\text{‰}$, $p=0,03$ (ANOVA) (Figure 16).

Figure 15 : Courbes des moyennes de croissance par groupe



Légende : ND : groupe contrôle de régime normal, LPD : groupe avec restriction protéique pendant la gestation et la lactation, ND/LPD : groupe avec restriction pendant la lactation seule, LPD/ND : groupe avec restriction pendant la gestation seule. ANOVA : $p=0,03$.

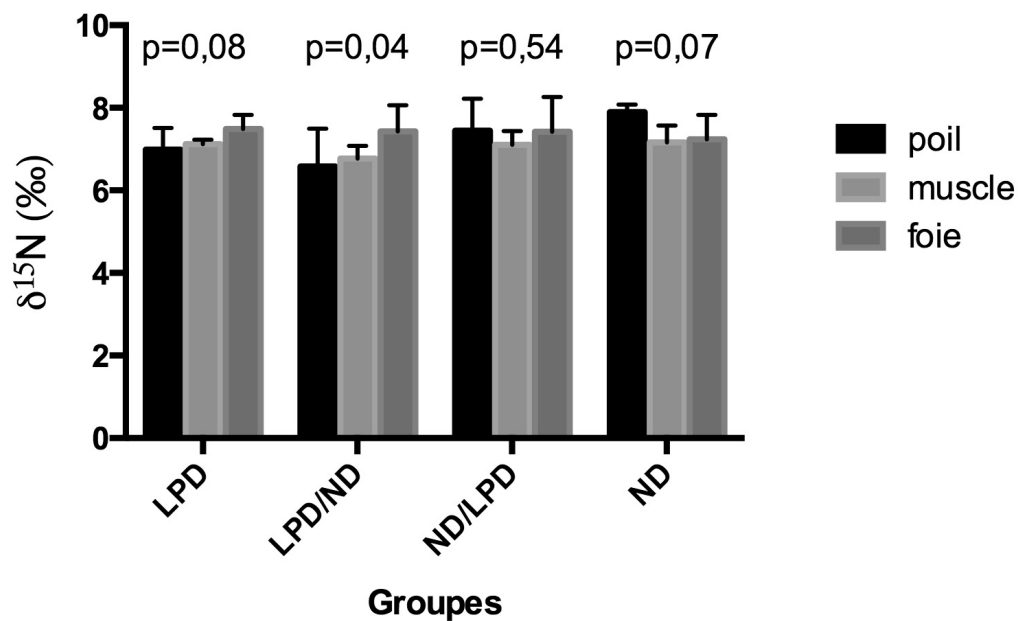
Figure 16 : Comparaison des AIN en ^{15}N à 16 mois selon le groupe d'alimentation



Légende : ND : groupe contrôle de régime normal, LPD : groupe avec restriction protéique pendant la gestation et la lactation, ND/LPD : groupe avec restriction pendant la lactation seule, LPD/ND : groupe avec restriction pendant la gestation seule. ANOVA : $p=0,03$.

L'analyse de la croissance montrait une plus faible AIN en ^{15}N chez les animaux ayant une croissance plus faible, suggérant une accréation protéique réduite. Les souris nées de mère ayant une alimentation restreinte en protéines durant la gestation et/ou la lactation avaient des valeurs d'AIN en ^{15}N différentes, même si elles étaient nourries de manière identique depuis leur sevrage. De plus, la comparaison des AIN en ^{15}N dans différents organes montrait une tendance à une AIN en ^{15}N plus élevée dans les organes de renouvellement plus rapide (foie > muscle) (Figure 17). Ceci pourrait être expliqué par la différence de l'intensité du métabolisme dans ces tissus (96,127). Nos résultats suggèrent une empreinte de la croissance précoce sur l'AIN en ^{15}N des poils observable plusieurs mois après la fin de la restriction.

Figure 17 : Comparaison des AIN en ^{15}N selon le tissu prélevé et le groupe d'alimentation



Légende : ND : groupe contrôle de régime normal, LPD : groupe avec restriction protéique pendant la gestation et la lactation, ND/LPD : groupe avec restriction pendant la lactation seule, LPD/ND : groupe avec restriction pendant la gestation seule.

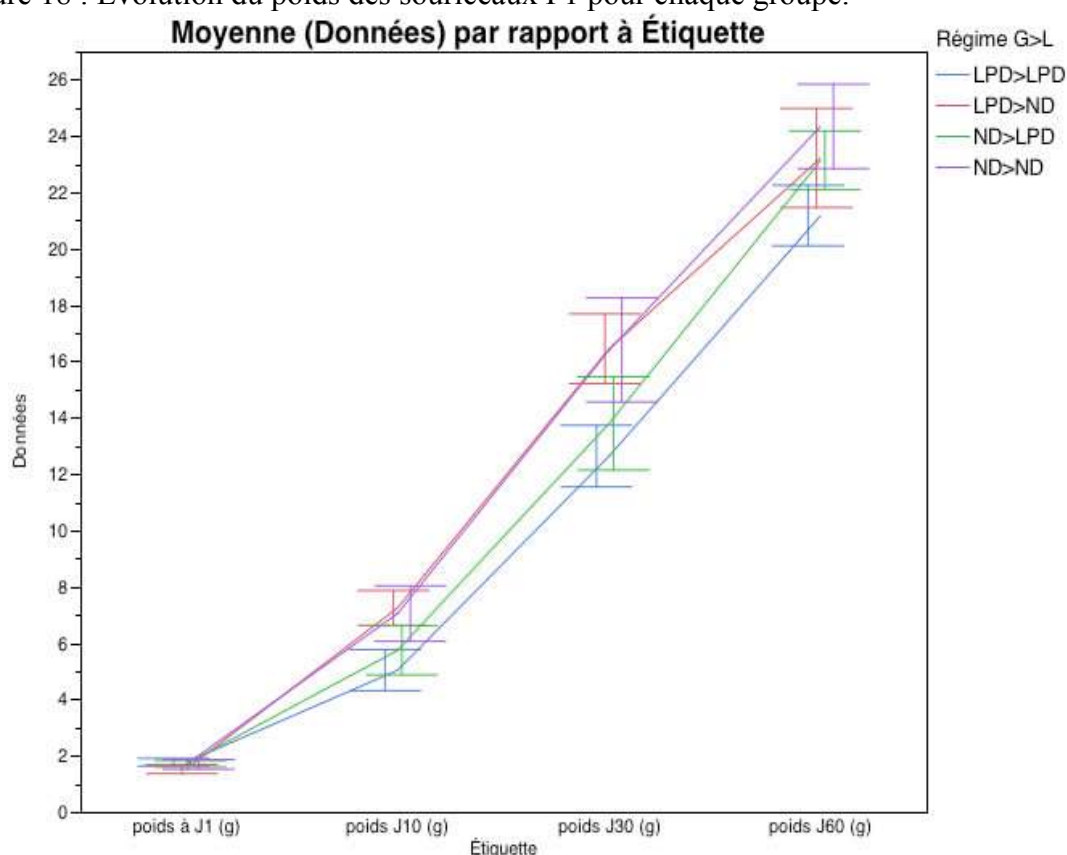
Le travail de Master 2 Recherche de Karine Bernardo que j'ai codirigé avec le Dr Céline Jousse et le Pr Régis Hankard se propose d'étudier ces mêmes groupes à différents moments de la vie afin de mieux apprécier la variation de l'AIN en ^{15}N (analyses en cours). Quatre périodes de prélèvements chez les souriceaux (F1) et leur mère (F0) ont été programmées. A J1, juste après la naissance, étaient prélevés des poils, du sang, le foie et le muscle gastrocnémien chez F0 et le foie et les pattes arrière chez F1 (absence de poils à la naissance et masse musculaire faible). A J11 (à la fin du pic de vitesse de croissance), J30 (sevrage), J60 (à distance de l'introduction de l'alimentation diversifiée) étaient prélevés chez F0 et F1 des poils, du sang, le foie et le muscle gastrocnémien. Les AIN en ^{15}N des croquettes ND, LPD et A03 ont été mesurées, permettant de calculer l'effet trophique (différence entre l'AIN d'un tissu et l'alimentation). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type. Les

comparaisons de moyennes de plus de deux groupes ont été réalisées par ANOVA. Les tests entre paires ont été réalisés par test de Tukey-Kramer.

Seuls les résultats d'AIN à J1 sont disponibles pour l'instant.

A J1, les souris F1 du groupe LPD/ND avaient un poids inférieur aux autres groupes, suivi d'une croissance de rattrapage à J10 leur permettant d'avoir le même poids que le groupe ND (Figure 18). A J10, les souris F1 des groupes LPD et ND/LPD (groupes sous régime LPD pendant la lactation) avaient un poids inférieur aux autres groupes persistant à J30 (sevrage). A J60, sous régime normo-protéique ad libitum depuis le sevrage, les souris F1 du groupe LPD avaient conservé un poids inférieur aux souris ND et ND/LPD. Le poids moyen du groupe LPD/ND ne montrait pas de différence par rapport aux autres groupes.

Figure 18 : Evolution du poids des souriceaux F1 pour chaque groupe.



Légende : Les résultats sont donnés en moyenne $\pm$ écart-type. ND>ND : groupe contrôle de régime normal, LPD>LPD : groupe avec restriction protéique pendant la gestation et la lactation, ND>LPD : groupe avec restriction pendant la lactation seule, LPD>ND : groupe avec restriction pendant la gestation seule.

Les croquettes ND ($3,78 \pm 0,17$ ‰) avaient une AIN en ^{15}N différente des croquettes LPD ($2,58 \pm 0,10$ ‰) et A03 ($2,65 \pm 0,49$ ‰), $p < 10^{-3}$ en lien avec l'ajout de caséine d'AIN différent dans les croquettes ND.

L'AIN en ^{15}N des foies et des pattes à J1 était plus élevée chez les souris F1 dont les mères ont reçu un régime ND pendant la gestation (Tableau 3). L'effet trophique dans le foie était plus important dans le groupe dont les mères avaient reçu un régime LPD pendant la gestation.

Tableau 3 : Mesure de l'AIN en ^{15}N des foies et pattes des souris F1 à J1 et moyennes de l'effet trophique pour le foie.

Groupe	$\delta^{15}\text{N}$ foie (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ patte (‰)	Effet trophique foie (‰)
ND>ND	$7,33 \pm 0,36$ (A)	$7,73 \pm 0,29$ (A)	$3,53 \pm 0,4$ (B)
ND>LPD	$7,24 \pm 0,21$ (A)	$7,77 \pm 0,37$ (A)	$3,44 \pm 0,2$ (B)
LPD>LPD	$6,47 \pm 0,43$ (B)	$6,97 \pm 0,30$ (B)	$3,87 \pm 0,4$ (A)
LPD>ND	$6,35 \pm 0,28$ (B)	$7,01 \pm 0,27$ (B)	$3,75 \pm 0,3$ (AB)

Légende : Les résultats sont donnés en moyenne $\pm$ écart-type ; les groupes non connectés par la même lettre (entre parenthèse) sont significativement différents (ANOVA et Test Tukey-Kramer).

L'AIN en ^{15}N dans les poils n'était pas différente entre les groupes (Tableau 4), reflétant le métabolisme protéique pré-gestationnel où toutes les souris consommaient le même régime normo-protidique A03. Par contre, les AIN en ^{15}N dans le muscle et le foie étaient plus basses chez les souris ayant reçu un régime LPD pendant la gestation par rapport aux souris ND. Les effets trophiques dans le muscle et les poils des souris F0 soumises au régime LPD pendant la gestation étaient plus importants que pour le groupe ND.

Tableau 4 : Mesure de l'AIN en ^{15}N des poils, foies et muscles gastrocnémiens des souris F0 à J1 et moyennes de l'effet trophique.

Groupe	$\delta^{15}\text{N}_{\text{poils}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{foie}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ (‰)	ET poils (‰)	ET foie (‰)	ET muscle (‰)
ND>ND	6,72±0,40 (A)	8,43±0,24 (A)	6,96±0,14 (A)	2,92±0,4 (B)	4,63±0,24 (A)	3,16±0,1 (B)
ND>LPD	6,83±0,48 (A)	8,27±0,19 (A)	6,98±0,11 (A)	3,03±0,5 (B)	4,47±0,19 (A)	3,18±0,1 (B)
LPD>LPD	6,66±0,11 (A)	7,29±0,19 (B)	6,57±0,07 (B)	4,06±0,1 (A)	4,69±0,19 (A)	3,97±0,1 (A)
LPD>ND	6,43±0,39 (A)	7,25±0,14 (B)	6,67±0,09 (B)	3,83±0,4 (A)	4,65±0,14 (A)	4,07±0,1 (A)

Légende : Les résultats sont donnés en moyenne ± écart-type ; les groupes non connectés par la même lettre (entre parenthèse) sont significativement différents (ANOVA et Test Tukey-Kramer). ET : effet trophique

Les premiers résultats de cette étude montrent que les AIN en ^{15}N du foie et de la patte à J1 étaient plus basses chez les souris F1 dont les mères ont été restreintes en protéines pendant la

gestation, avec un effet trophique plus important que dans le groupe ND. Ces différences d'effet trophique pourraient traduire un effet isotopique lié à la vitesse de synthèse protéique. Les AIN en ^{15}N du foie et du muscle à J1 chez les souris F0 restreintes en protéines pendant la gestation étaient également plus faibles et leurs effets trophiques calculés au niveau du muscle et du poil étaient supérieurs à ceux des mères sous régime ND. Ceci pourrait traduire un catabolisme protéique accru compensant la carence d'apport protéique et assurer les besoins de croissance liés à la gestation.

Ce travail suggère que la mesure de l'AIN en ^{15}N permet de détecter l'impact sur le métabolisme protéique d'un régime restreint en protéines et que les anomalies sont présentes dès la naissance traduisant une empreinte métabolique spécifique. Cette détection de la variation du métabolisme présente un intérêt en pathologie. La mesure de l'AIN en ^{15}N fournirait un index de renouvellement protéique par le fractionnement isotopique induit par la modification du métabolisme.

2.2 Phénotype clinique de la malnutrition protéino-énergétique

L'état nutritionnel chez l'enfant hospitalisé est rarement évalué de manière systématique à l'entrée, entraînant un sous-diagnostic donc un défaut de prise en charge (3). Plusieurs scores existent chez l'enfant et chez l'adulte, permettant d'estimer le risque de MPE au cours d'une hospitalisation notamment en fonction de la pathologie, du terrain du patient et de l'évaluation des ingesta (128). Malgré la mise à disposition d'outils facilitant le calcul d'indices d'insuffisance pondérale (disque d'IMC et disque Dédé de calcul de l'indice de Waterlow) (129), d'un score de risque nutritionnel pédiatrique (130) et de recommandations nationales (1), aucun index n'est systématiquement calculé. Les freins sont multiples :

- 1) Encore trop souvent c'est une approche subjective qui fait considérer tel ou tel enfant dénutri et indique la thérapeutique,
- 2) Le poids et la taille ne sont que trop rarement mesurés simultanément à l'entrée d'où une impossibilité de calculer un index quel qu'il soit (131),
- 3) 50% des enfants dénutris ont moins de 1 an (132). L'interprétation des courbes d'IMC à cet âge est imprécise et nécessite de posséder les valeurs seuils, données fournies dans les recommandations,
- 4) Les personnels médicaux et paramédicaux restent insuffisamment formés même si le travail des comités de liaison alimentation nutrition (CLAN) a stimulé leur motivation. A ce jour la formation à la nutrition reste insuffisante dans les études médicales,
- 5) La recherche de la MPE chez l'enfant n'est pas un critère IPAQSS (Indicateurs pour l'Amélioration de la Qualité et de la Sécurité des Soins), au contraire de la médecine adulte.

Dans les pays industrialisés, la PEM est principalement secondaire à une pathologie. Un nombre croissant d'études s'intéresse à la prévalence de la MPE en hospitalisation. En Europe, elle varie entre 7 et 19% selon les études (130,131,133-135). La MPE est associée à

une augmentation de la morbidité et de la mortalité (134). La conséquence est un allongement de la durée et du coût d'hospitalisation. Un rapport récent a estimé que le coût financier en médecine adulte en Irlande représentait environ 1,4 milliards €, montrant le rôle central de la MPE dans la gestion des coûts de santé (136). De plus, sans prise en charge, la MPE s'aggrave au cours de l'hospitalisation. L'impact des pathologies chroniques sur l'état nutritionnel est important. Les mécanismes impliqués sont des besoins accrus (croissance rapide, catabolisme, stress, agression...) et une fréquente insuffisance d'apport (anorexie, environnement social, diminution de l'absorption...). Le risque de MPE chez les enfants hospitalisés est donc important.

La MPE a un impact à long terme dans l'enfance et à l'âge adulte, entraînant un retard de croissance et une diminution des capacités intellectuelles, du niveau d'études, du niveau socio-économique et de l'insertion dans la société (137-139). L'amélioration de l'état nutritionnel après un épisode de MPE permet d'améliorer le devenir des capacités intellectuelles (140).

Il est donc nécessaire de promouvoir le dépistage de l'état nutritionnel chez tout enfant hospitalisé et d'améliorer le phénotypage de cette population.

2.2.1 Procédure diagnostique

La démarche diagnostique de la MPE a été précisée dans les recommandations du Comité de Nutrition de la Société Française de Pédiatrie (1) (Figure 19). La première étape est le calcul d'un IMC inférieur au 3^{ème} percentile par rapport aux courbes de référence (2), définissant l'insuffisance pondérale. Il s'agit d'un index simple et validé pour le diagnostic de MPE (141,142). L'insuffisance pondérale est à différencier de la minceur qui correspond à un habitus constitutionnel sans pathologie sous-jacente, sans retentissement physique ou

psychologique. Un IMC bas peut donc être liée à une MPE mais aussi à une minceur constitutionnelle. La suite de la démarche diagnostique nécessite l'identification d'une cause, la recherche de signes associés et surtout la documentation des données dynamiques de la croissance de l'enfant.

Figure 19 : Prise en charge de la MPE chez l'enfant, du diagnostic au traitement.



Nos objectifs sont de développer et d'organiser un réseau d'évaluation de l'état nutritionnel chez l'enfant et de standardiser la démarche diagnostique de la MPE en la rendant plus objective. Ceci permettra d'améliorer le dépistage de la MPE chez l'enfant hospitalisé, ce qui est un objectif du PNNS3.

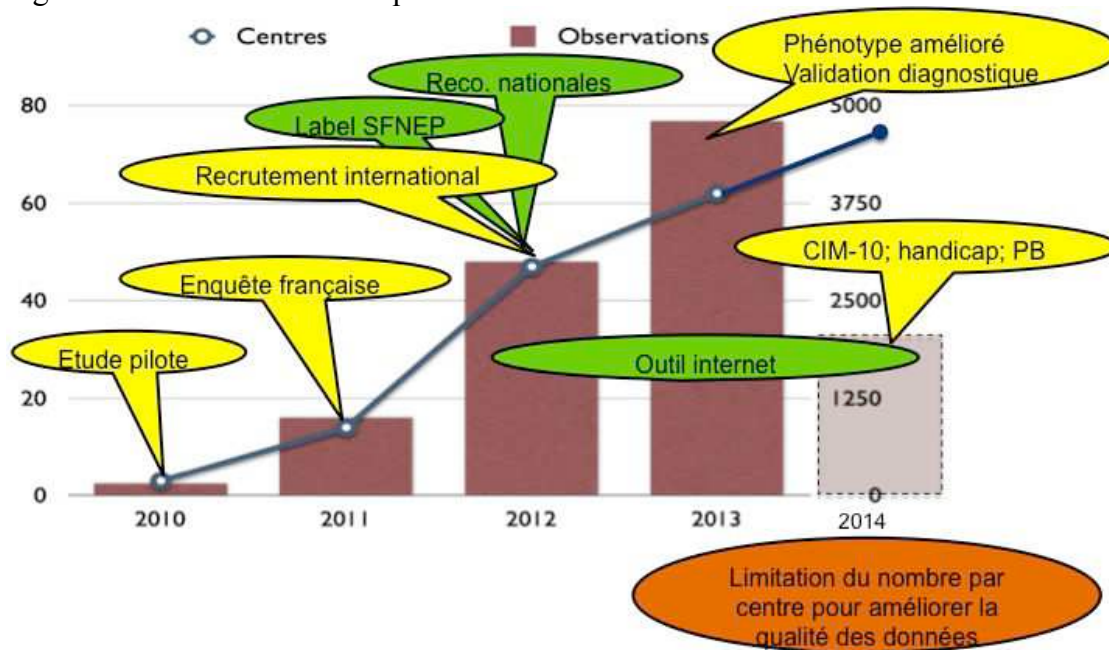
Pour y parvenir, nous avons créé un événement annuel de promotion d'évaluation de l'état nutritionnel. Nous avons débuté par une enquête tricentrique en 2010 incluant 130 enfants (Figure 20). En 2011, 923 patients ont été inclus dans 14 centres.

Nous avons ensuite développé un outil d'évaluation de l'état nutritionnel e-Pinut (www.epinut.fr), opérationnel depuis 2012 dont la procédure diagnostique est conforme aux recommandations (1), recueillant des données non identifiantes. Cet outil a reçu le label du

CEPC (Comité Éducationnel et de Pratique Clinique) de la SFNEP (Société Francophone Nutrition Clinique et Métabolisme) en 2012.

L'outil e-PINUT a servi de support de saisie pour les enquêtes ultérieures, permettant une croissance du nombre de centres participant. L'enquête 2012 a inclus 2845 patients de 47 centres dans 6 pays. Nous avons ensuite volontairement limité le nombre d'inclusion par centre afin d'améliorer l'exhaustivité et la qualité des données. L'enquête 2013 a inclus 4735 observations (1829 patients) de 62 centres dans 5 pays et l'enquête 2014 comprenait 2115 patients de 72 centres dans 7 pays.

Figure 20 : Croissance des enquêtes e-PINUT.



e-PINUT a servi de support pour 1 Master 2 Recherche (S Sissaoui, Poitiers), 1 mémoire de DES de pédiatrie (V Benzaken, Poitiers), 2 thèses de médecine (M Cap, Lille ; L Gerbaud-Morlaes, Poitiers), 3 DIU d'hépatogastroentérologie et nutrition pédiatrique (M Frasquet-Darrieux, Poitiers ; I Huard, Strasbourg ; M Talvard, Toulouse), 2 stages de Master 1 (P Duport, Poitiers ; G Dingulu, Poitiers). Depuis sa création, nous avons enregistré environ 18 500 visites de 13 000 patients, ce qui représente une base de données conséquente pour des

travaux ultérieurs. Cet outil a aussi pour vocation de pouvoir servir au quotidien en consultation, en hospitalisation mais aussi pour des projets divers.

Nous avons obtenu plusieurs appels d'offre pour arriver à ce résultat pour un total de 76 500€, ce qui rend compte de l'intérêt croissant porté à la MPE et à notre réseau :

- La création de l'outil et l'achat du serveur ont été financés par le Prix ACTICLAN Fresenius-Kabi de 7 500€ obtenu en 2011.

- Ma 1^{ère} année de thèse d'université a été financée par le Prix Nestlé de 15 000€ en 2011 (congrès de la SFP), sur l'évaluation clinique de l'état nutritionnel à partir du réseau.

- Le développement du réseau internet d'évaluation de l'état nutritionnel e-PINUT a été financé par le Prix AADAIRC (Association pour l'Assistance à Domicile Aux Insuffisants Respiratoires Chroniques, Fédération ANTADIR) de 10 000€ en 2011.

- Le développement du réseau à l'échelle interrégionale a été financé par le GIRCI-Grand Ouest et reconnu comme projet structurant pour la recherche clinique dans le Grand-Ouest. Ce financement obtenu en 2011 était de 24 000€.

- J'ai obtenu une bourse de stage du GIRCI Grand-Ouest pour financer ma 2^{ème} année de thèse d'université dans ce projet, à hauteur de 20 000€ en 2011.

Les différentes enquêtes ont permis de recruter un nombre croissant d'hôpitaux participant, faisant progresser la promotion de l'évaluation de l'état nutritionnel chez l'enfant hospitalisé. Les enquêtes successives permettent de montrer que la MPE touche particulièrement les enfants de moins de 2 ans et les porteurs de maladies chroniques, préférentiellement gastroentérologiques et dans le handicap. La fréquence de la MPE est stable au cours des années, montrant la nécessité de poursuivre nos efforts pour pérenniser le dépistage au sein des unités et améliorer la prise en charge nutritionnelle.

de Luca A, Piloquet H, Mansilla M, Simon D, Fischbach M, Caldari D, Dorigny B, Ingrand P, Hankard R. Evaluation tricentrique de l'état nutritionnel chez l'enfant hospitalisé. Arch Pediatr. 2012;19:545-6.

Sissaoui S, de Luca A, Piloquet H, Guimber D, Coste ME, Peretti N, Djeddi DD, Leke A, Vanrenterghem A, Turquet A, Triolo V, Mas E, Breton A, Lambe C, Colomb V, Goulet O, Thomassin N, Chouraqui J, Renard P, Massicot P, Bouniol A, Fischbach M, Dorigny B, Ingrand P, Hankard R. Paediatric large scale hospital malnutrition screening in France. e-SPEN Journal. 2013;8:e68-e72.

de Luca A, Benzaken V, Colomb V, Fischbach M, Guimber D, Peretti N, Piloquet H, Ingrand P, Hankard R. Systematic nutritional assessment in hospitalized children: an international survey. Article soumis – Br J Nutr.

2.2.2 Enquête e-Pinut 2010 (Publiée)

Evaluation tricentrique de l'état nutritionnel chez l'enfant hospitalisé

Multicenter nutritional screening in hospitalized children.

Titre court : N DAY2010

A De Luca (1), H Piloquet (2), M Mansilla (3), D Simon (1), M Fischbach (3), D Caldari (2), B Dorigny (4), P Ingrand (1), R Hankard (1)

1 Inserm, CIC0802, Poitiers, F-86 000France ; Univ Poitiers, Poitiers, F-86000France ; CHU Poitiers, Poitiers, F-86000 France

2 Pédiatrie, CHU Nantes, 44093 Nantes, France

3 Pédiatrie 1, CHU Strasbourg, 67098 Strasbourg, France

4 Nutricia Advanced Medical Nutrition, 92500 Rueil-Malmaison, France

Auteur correspondant : Pr Régis HANKARD

Inserm CIC 0802, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, BP 577, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers Cedex, France.

Téléphone: +33 5 49 44 43 90, fax: +33 5 49 44 38 20

E-mail: regis.hankard@inserm.fr

Conflits d'intérêts : B Dorigny est employée par Nutricia Advanced Medical Nutrition

L'indice de masse corporelle (IMC) est rarement utilisé pour évaluer l'insuffisance pondérale qui est pourtant le signe d'appel principal pour le diagnostic de dénutrition. Un $IMC < 3^{\text{ème}}$ percentile pour l'âge et le sexe de l'enfant peut être facilement détecté grâce aux courbes de corpulence qui figurent dans le carnet de santé. Il n'existe aucune étude multicentrique sur la prévalence de l'insuffisance pondérale en France. Cette étude pilote observationnelle transversale de type « un jour donné » tricentrique avait pour objectif principal d'identifier les enfants en insuffisance pondérale hospitalisés dans trois centres pédiatriques universitaires. Le rapport du poids mesuré sur le poids attendu pour la taille (RPT) a été calculé et exprimé en pourcentage et en déviations standard. Un $RPT < 80\%$ a été considéré comme compatible avec une dénutrition avérée. La taille a été exprimée en déviation standard (DS) pour l'âge et le sexe. Les comparaisons de proportions étaient testées par un χ^2 et les moyennes par analyse de variance.

Cent trente enfants ont été inclus sur les 133 données recueillies. L'âge médian était de 2,2 ans (52% de filles). Les pathologies rencontrées étaient : infectieuses 31%, endocriniennes 12%, rénales 11%, neurologiques 10%, digestives 7%, cardiologiques 6%, respiratoires 6%, psychiatriques 6%, chirurgicales 5%, oncologiques 4%, et traumatologiques 2%. Un $IMC < 3^{\text{ème}}$ percentile était observé chez 18% des enfants et variait selon les centres (c1 : 18%, c2 : 7%, c3 : 30%, $p=0,03$). Un $RPT < 80\%$ était retrouvé chez 8,5% des enfants (c1 : 8%, c2 : 2%, c3 : 16%, NS). Aucun enfant présentant un $IMC > 3^{\text{ème}}$ percentile n'avait un $RPT < 80\%$. Aucun des 11 enfants avec un $RPT < 80\%$ n'avait une taille $< -2DS$ pour l'âge (signe de dénutrition chronique). Cinquante pour cent des enfants ayant une insuffisance pondérale avaient moins de 1 an. La proportion de pathologies chroniques (52%) variait selon les centres (c1 : 38%, c2 : 56%, c3 : 68%, $p=0,02$). Nous n'avons pu mettre en évidence une plus grande fréquence de l'insuffisance pondérale chez les enfants présentant une pathologie chronique (12% vs 6%, NS).

L'insuffisance pondérale concerne jusqu'à 1 enfant hospitalisé sur 3 et concerne principalement le nourrisson. Nos données sont en accord avec les données de la littérature européenne [1-5]. Le diagnostic de dénutrition impose de confronter les indices nutritionnels à la clinique (étude de la cinétique de croissance, recherche de signes de dénutrition et orientant vers une cause somatique, psychologique ou d'interaction) ce qui n'a pas été réalisé dans cette enquête pilote. Ces données suggèrent cependant que l'IMC serait un outil simple de dépistage de la dénutrition permettant d'identifier une population pour laquelle un examen plus précis est nécessaire. Dans tous les cas, la mesure d'un poids et d'une taille est indispensable pour toute hospitalisation. Cette enquête a eu le mérite de mobiliser trois équipes pédiatriques Françaises, un même jour, autour de l'évaluation nutritionnelle de l'enfant hospitalisé. Ce travail sera la base d'enquêtes ponctuelles incluant plus de patients de tous âges, de toute discipline (médicale, chirurgicale) ou hôpitaux (CHU, CHG, Médecine Physique et de réadaptation). Une évaluation des modalités diagnostiques est nécessaire pour comparer la prévalence de la dénutrition hospitalière infantile au niveau européen.

REFERENCES

1. Joosten KF, Zwart H, Hop WC, et al. National malnutrition screening days in hospitalised children in The Netherlands. *Arch Dis Child* 2010;95:141-5.
2. Pawellek I, Dokoupil K, Koletzko B. Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. *Clin Nutr* 2008;27:72-6.
3. Marteletti O, Caldari D, Guimber D, et al. Dépistage de la malnutrition chez l'enfant hospitalisé : influence de la structure d'accueil dans la prise en charge. *Arch Pediatr* 2005;12:1226-31.
4. Hankard R, Bloch J, Martin P, et al. Etat et risque nutritionnel de l'enfant hospitalisé. *Arch Pediatr* 2001;8:1203-8.
5. Campanozzi A, Russo M, Catucci A, et al. Hospital-acquired malnutrition in children with mild clinical conditions. *Nutrition* 2009;25:540-7.

Conflits d'intérêts : B Dorigny est employée par Nutricia Advanced Medical Nutrition

2.2.3 Enquête e-Pinut 2011 (Publiée)

LARGE SCALE NUTRITIONAL STATUS ASSESSMENT IN PEDIATRIC HOSPITALS

Short title: Malnutrition in French Pediatric Hospitals

Samira Sissaoui^{1,2,3}, Arnaud De Luca^{1,2,3*}, Hugues Piloquet^{4*}, Dominique Guimber^{5,6,7*},
Virginie Colomb^{8,9*}, Noël Peretti^{10,11,12,13,14*}, Agnès Bouniol¹⁵, Anne Breton¹⁶, Jean-Pierre
Chouraqui^{17,18}, Marie-Edith Coste¹⁹, Djamal Djeddi²⁰, Béatrice Dorigny²¹, Olivier Goulet^{8,9},
Frédéric Gottrand^{5,6,7}, Pascale Hermouet², Cécile Lambe^{8,9}, André Leke²⁰, Sylvie Leprince¹⁵,
Emmanuel Mas^{16,22,23,24}, Pascal Massicot²⁵, Pierre Renard²⁵, Nadège Thomassin^{17,18}, Valérie
Triolo²⁶, Anne Turquet²⁷, Audrey Vanrenterghem²⁰, Michel Fischbach^{28*}, Pierre Ingrand^{1,2,3},
Régis Hankard^{1,2,3*\$}

1 Inserm, CIC 0802, Poitiers, F-86000, France

2 CHU Poitiers, Poitiers, F-86000, France

3 Université de Poitiers, Poitiers, F-86000, France

4 CHU Nantes, Clinique Médicale Pédiatrique, Gastroentérologie et Nutrition, Nantes, F-44000, France

5 CHRU de Lille, Lille, F-59000, France

6 Inserm U995, IFR114, Lille, F-59000, France

7 Université Lille 2, Lille, F-59000, France

8 CHU Necker-Enfants-Malades, Service de Gastroentérologie et Nutrition de l'Enfant, Paris, F-75015, France

9 Université Paris-Descartes, Paris, F-75006, France

10 Inserm, U870, Lyon, F-69008, France

- 11 INRA, UMR1235, Lyon, F-69008, France
- 12 INSA-Lyon, RMND, Villeurbanne, F-69621, France
- 13 Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France
- 14 Hospices Civils de Lyon, Lyon, F-69008, France.
- 15 CPR de Bullion, Bullion, F-78830, France
- 16 CHU Toulouse, Toulouse, F-31300, France
- 17 CHU Grenoble, Grenoble, F-38700, France
- 18 Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38700, France
- 19 CHU Marseille, Marseille, F-13000, France
- 20 CHU d'Amiens, Département de Pédiatrie, Amiens, 80000, France.
- 21 Nutricia, Advanced Medical Nutrition, St-Ouen, F-93406, France
- 22 Inserm U1043, Toulouse, F-31300 France;
- 23 CNRS, U5282, Toulouse, F-31300, France;
- 24 Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP),
Toulouse, F-31300, France
- 25 CHM, Saint-Trojan, F-17370, France
- 26 CHU Nice, Nice, F-06000, France
- 27 CHR La Réunion, St Denis, F-97400, France
- 28 CHU Strasbourg, Strasbourg, F-67000, France
- * Members of the scientific committee of the project

[§] **Corresponding author:** *Pr Régis HANKARD*

*Mailing: Inserm CIC 0802, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, BP 577, 2 rue de la
Milétrie, 86021 Poitiers Cedex, France.*

Telephone: +33 5 49 44 43 90, fax: +33 5 49 44 38 20, e-mail: regis.hankard@inserm.fr

List of non-standard abbreviations:

HFA: height for age

SFP: French Pediatric Society

WFH: weight for height

Z-HFA: Z-score height for age

Z-WFH: Z-score weight for height

Conference presentation:

-French Pediatric Society (SFP) congress, 2012

-French Nutrition Days (JFN) congress, 2011

-The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) congress, 2011

Abstract

Background & Aims: Several single-center studies have reported malnutrition among hospitalized children in France. The aim of this survey was to estimate the frequency of malnutrition and the clinical factors associated with it in a large number of centers including medical and surgical wards in university and non-university hospitals.

Methods: This multi-center one-day cross-sectional survey took place in the third week of March 2011. All participating centers followed the same diagnostic procedure. Intensive care units and emergency rooms were excluded. All children admitted on the same day were weighed and measured. Any child with a body mass index below the third centile for age and sex underwent clinical examination. Associations between clinical factors recorded in the diagnostic procedure and malnutrition ($Z\text{-WFH} < -2$) were tested using univariate and multivariate analysis.

Results: Fourteen pediatric departments (32 pediatric wards) throughout France participated in the study. Data were collected in 1063 cases and analyzed in 923. Median age was 6.0 years (1 day to 16 years). Malnutrition was observed in 12% and was associated with height faltering in 2.5% of the whole population. Among the 625 children with a documented diagnosis, 52% were hospitalized for chronic disease. Only muscle loss and disability remained significantly associated with $Z\text{-WFH} < -2$ after multivariate analysis. Body mass index $> 97^{\text{th}}$ centile (overweight including obesity) was seen in 14% of hospitalized children.

Conclusion: One in ten hospitalized children was affected by malnutrition. The present survey is first to investigate a wide variety of pediatric wards throughout France. The initiative must be repeated in order to increase awareness of malnutrition in pediatric hospitals.

Keywords: Nutritional assessment, pediatric malnutrition, hospital malnutrition, multicenter survey

Introduction

Protein energy malnutrition (PEM) resulting from insufficient nutrient intake to cover nutritional demand leads to loss of tissue and functional problems. Food shortage is the main cause of childhood malnutrition worldwide, accounting for 260 million underweight children under the age of 5 years in developing countries¹. In developed countries, the leading cause is disease, with malnutrition mainly being observed in hospitals. Some single-center studies have reported PEM in French pediatric hospitals; however, recruitment biases prohibit generalization of the observed frequencies²⁻⁵. Moreover, as recently shown, diagnostic procedures and definitions of malnutrition varied between studies⁶. In 2010, we carried out a one-day cross-sectional pilot survey in three French academic pediatric centers⁷. The aim of the present survey was to estimate the frequency of malnutrition and the clinical factors associated with it in a large number of centers including university and non-university hospitals, medical and surgical wards, and general pediatric as well as pediatric sub-specialty units and pediatric rehabilitation centers.

Material & Methods

Population:

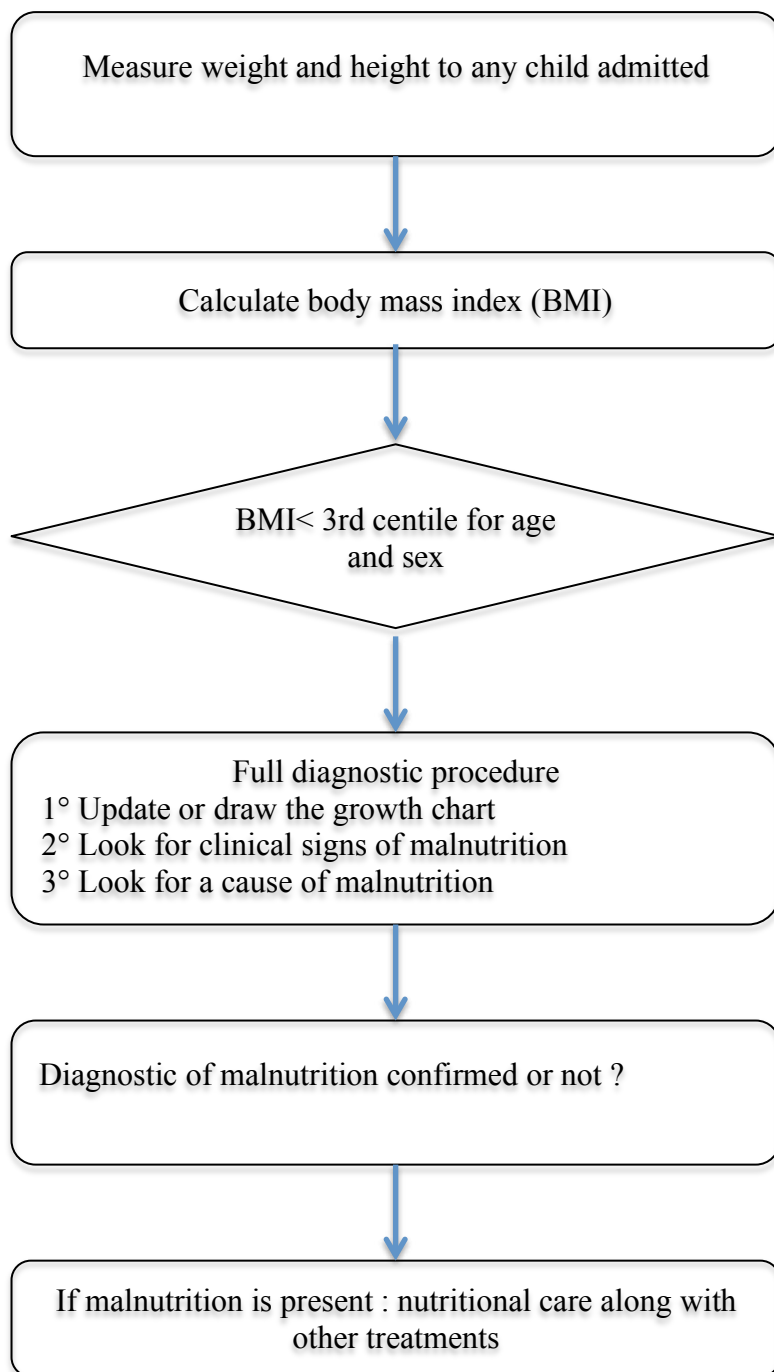
Twelve French university hospitals (Amiens: c1, Lyon: c2, Grenoble: c4, Lille: c5, Marseille: c6, Nantes: c7, Nice: c8, Paris-Necker: c9, Poitiers: c10, Strasbourg: c12, Toulouse: c13, La Réunion: c14) and two rehabilitation centers (CPRCH Bullion: c3 and CHM Saint-Trojan: c11) participated. Thirty-two pediatric wards in the 12 university hospitals were involved: general pediatrics (n=17:all hospitals except c2 and c9), oncology (n=3:c5, c6, c14), surgery (n=3:c2, c6, c8), psychiatry (n=2:c2, c5) and specialized pediatrics (n=7:c2, c4, c5, c6, c9, c13). Intensive care units and emergency departments were excluded from the survey. All

participating centers followed the same diagnostic procedure (Figure 1) as recommended by the Nutrition Committee of the French Pediatric Society (SFP) for hospital nutritional assessment⁸. According to that recommendation, every time updated growth curve is not available for weight and height at admission, body mass index (BMI) must be calculated from measured weight and height. All children admitted on the same day between March 21st and 25th, 2011 were weighed and measured regardless of their subjective nutritional status, gender, age, and pattern and duration of hospitalization. As all the data analyzed were derived from routine clinical examination of the hospitalized children and the analysis was anonymous, ethics committee approval was not required.

Diagnostic procedure

Signs of malnutrition and growth chart data were obtained from the medical files of all children with a BMI below the third centile for age and sex⁹. We checked for clinical signs of malnutrition: subjective subcutaneous fat or muscle mass loss, skin hair and nail abnormalities, edema, apathy and signs suggestive of a cause: chronic diarrhea (i.e. malnutrition of a gastro-intestinal cause with diarrhea), chronic cough, any psychiatric or mother-child interaction disorder that would lower food intake, disability, subjective insufficient food intake in the absence of any other cause. Prematurity (birth before 37 weeks of amenorrhea), intra-uterine growth retardation (weight at birth below the tenth centile for gestational age). Impaired weight and height growth were defined as the loss of one standard deviation (SD) or more on growth charts on ¹⁰ the day of the survey.

Figure 1: Diagnostic procedure



Analytical procedure

BMI was expressed as centile and Z-score according to the French reference⁹. Weight for height (WFH) was also calculated and expressed as % and Z-WFH; Z-HFA was expressed as Z-score according to French references¹⁰. Malnutrition was defined as a Z-WFH < -2 SD and considered compatible with chronic malnutrition when associated with height faltering (Z-

HFA < -2 SD)¹¹. In children under 6 years of age, Z-WFH was also calculated using the WHO standard¹². Overweight, including obesity, was defined as a BMI above 2 SD for age and sex¹³.

Calculations and statistical analysis

BMI Z-score was calculated using the LMS regression method: $Z\text{-score} = [(Q/M)^L - 1] / LS$ where Q is the observed measurement, M is median BMI by age, S is the coefficient of variation of BMI, and L curve expresses the skewness of the BMI distribution. WFH, height Z-scores were calculated using: $Z\text{-score} = (Q-M)/SD$ where Q is the observed measurement, M the median and SD the standard deviation.

Results are presented as means $\pm$ 1SD. Associations between clinical factors recorded in the diagnostic procedure and Z-WFH were tested using a two-step procedure assuming items were absent in children with BMI<third centile for age and sex: 1) univariate comparison between means using t-test, 2) items with $p < 0.2$ were included in a generalized ANOVA model with backward elimination procedure. Categorical data were compared using Chi square test. SAS® software was used for statistical analysis.

Results

Only children aged 1 month to 16 years with documented weight, height and sex were included in the analysis (923 of the 1063 questionnaires). Patient characteristics are presented in Table 1.

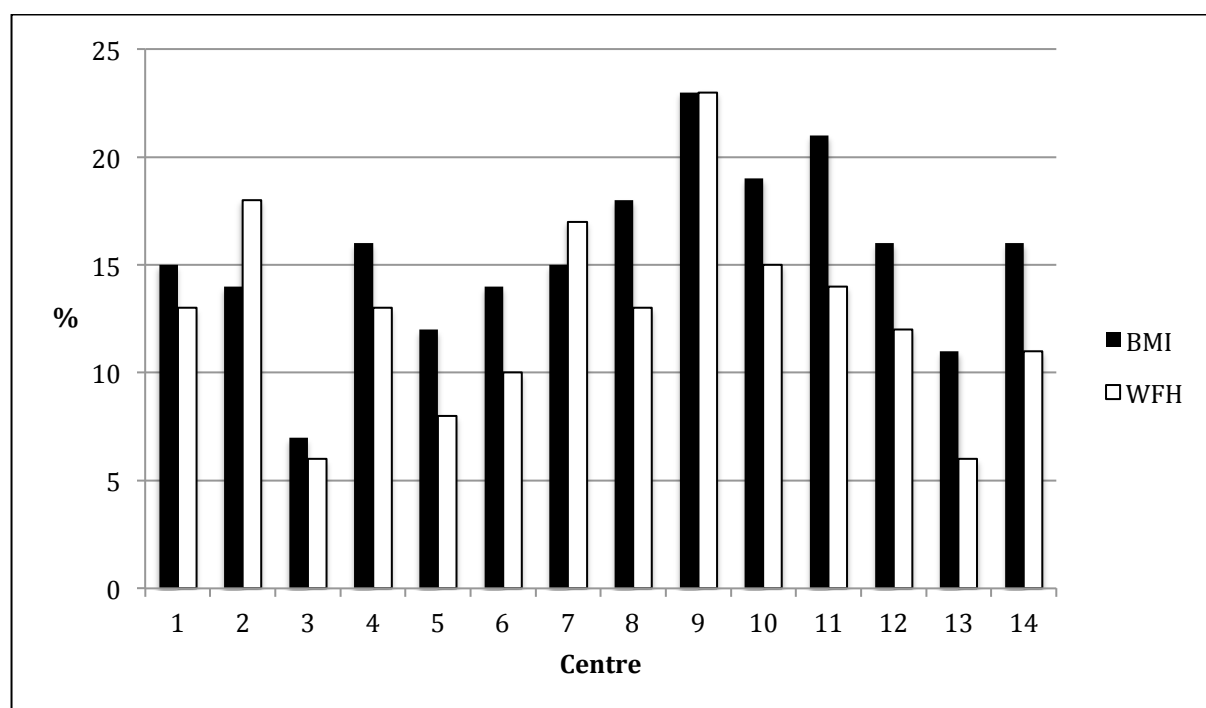
A BMI below the third centile for age and sex was observed in 137 children (14.8% of the whole population, 95% CI [12.6; 17.3%]) (Figure 2). Height faltering was present in 92 children (10.0%).

Table 1: Patients' characteristics

	All	BMI<3rd centile
N (%)	923	137 (14.8%)
Age (median in years)	6.0	2.4
Age Q1 (years)	1.3	0.8
Z-BMI	0.0±1.9	-2.9±1.0
Z-WFH	0.7±2.1	-2.4±0.8
Z-HFA	0.4±1.8	-0.4±2.2
female n (%)	442 (48%)	67 (49%)

Legend: Z-BMI : Z-score for body mass index⁹, Z-WFH : Z-score for weight for height¹⁰; Z-HFA : Z-score for height for age¹⁰; Q1 : first quartile

Figure 2: % BMI below the third percentile for age and sex or WFH below -2 SD



Legend : BMI : body mass index in solid bars⁹, WFH : weight for height in open bars¹⁰; centers 1 : Amiens ; 2 : Lyon ; 3 : Bullion ; 4 : Grenoble ; 5 : Lille ; 6 : Marseille, 7 : Nantes ;

8 : Nice ; 9 : Paris ; 10 : Poitiers ; 11 : St-Trojan ; 12 : Strasbourg ; 13 : Toulouse ; 14 : La Réunion

Malnutrition based on Z-WFH was found in 110 children (11.9%, 95% CI [9.9; 14.2%]) and associated with height faltering in 23 of them (2.5% of the whole population and 21% of malnourished children). Of 11 children who had a Z-WFH < -2SD and a BMI > 3rd centile (false negative cases with BMI), six were aged under 6 months. Median age of children with Z-WFH < -2 was 2.5 years (Q1:0.8 years, Q3:8.4 years). For each center, percentages of children below the third centile for age and sex and with a Z-WFH < -2 were reported (Figure 2).

Factors associated with Z-WFH < -2 were subjective muscle loss, skin pallor, insufficient energy intake, [mother-child interaction disorders, disability (univariate analysis) (Table 2). Using a multivariate model, only muscle loss and disability remained significant (Table 2).

Mean Z-WFH using French and WHO standards did not statistically significantly differ (n=430, mean difference 0.01 SD, P=0.8). Classification was in accord in 95% of the cases using the two references and malnutrition was observed in 53 children (12.3%). Five children were considered malnourished according to WHO but not French standards (all with age < 1 year, mean Z-WFH: -1.8 SD) and 17 were considered malnourished according to French but not WHO standards (all but two over 6 months, mean Z-WFH: -1.7 SD).

Table 2: Clinical factors associated with Z-WFH

Signs of malnutrition	Modality	n	z-score WFH mean $\pm$ SD	p uni.	p multi.
Skin pallor	Absent	72	-2.58 $\pm$ 0.42	.027	
	Present	38	-2.91 $\pm$ 0.83		
Conjunctival pallor	Absent	95	-2.67 $\pm$ 0.61	.42	
	Present	15	-2.81 $\pm$ 0.58		
Subjective muscle loss	Absent	62	-2.54 $\pm$ 0.39	.007	.039
	Present	48	-2.88 $\pm$ 0.77		
Subjective loss of subcutaneous fat	Absent	62	-2.59 $\pm$ 0.40	.069	
	Present	48	-2.82 $\pm$ 0.79		
Dry skin	Absent	82	-2.68 $\pm$ 0.63	.78	
	Present	28	-2.72 $\pm$ 0.55		
Apathy	Absent	86	-2.64 $\pm$ 0.63	.058	
	Present	24	-2.88 $\pm$ 0.50		
Slowed weight growth	Absent	69	-2.65 $\pm$ 0.65	.32	
	Present	41	-2.76 $\pm$ 0.54		
Slowed height growth	Absent	90	-2.65 $\pm$ 0.62	.11	
	Present	20	-2.87 $\pm$ 0.53		
Chronic diarrhea	Absent	103	-2.68 $\pm$ 0.61	.56	
	Present	7	-2.83 $\pm$ 0.61		

Chronic cough	Absent	105	-2.67 ± 0.55	.42	
	Present	5	-3.22 ± 1.38		
Insufficient energy intake	Absent	78	-2.59 ± 0.54	.012	
	Present	32	-2.94 ± 0.69		
Prematurity	Absent	102	-2.69 ± 0.62	.65	
	Present	8	-2.77 ± 0.49		
Intrauterine growth retardation	Absent	98	-2.67 ± 0.60	.37	
	Present	12	-2.86 ± 0.66		
Interaction disorders	Absent	95	-2.62 ± 0.53	.048	
	Present	15	-3.12 ± 0.87		
Disabilities	Absent	83	-2.56 ± 0.43	.004	.0003
	Present	27	-3.10 ± 0.86		

Legend: Z-WFH :Z-score for weight for height (10); p univ. is p value for univariate analysis; p multi. is p value for multivariate analysis. Parametric t-test was used for univariate analysis and generalized Anova model for multivariate analysis.

Among the 625 children with a documented diagnosis, 56% were hospitalized for chronic disease (66% of malnourished children). Causes for hospitalization were neurological problems (24%), infectious diseases (19%), surgery (16%), psychiatric disorders (8%), and others (32%). Malnutrition was observed in 27%, 21%, 17%, 8% and 26% of the same categories respectively, with no differences within groups.

On the day of the survey, 17% of children (25% of malnourished children) received enteral nutrition, and 6% (5% of malnourished children) were fed parenterally. Both routes of nutritional support were used in 17 patients (three malnourished children)

Overweight including obesity (Z-BMI value > 2SD) was noted in 132 children (14%); fifty-four of them (6% of the whole population) had a Z-BMI >3 SD.

Discussion

This survey is the first to provide a snapshot of the nutritional status of a large number of children hospitalized in a wide variety of French pediatric wards. Based on Z-score (Z-WFH), 12% were malnourished. Most suffered from chronic diseases and 50% were less than 2.4 years old. Low Z-WFH was associated with disability and muscle wasting.

The prevalence of malnutrition observed here is consistent with previous estimates in France and other European countries (Table 3), at an average of around 10% of hospitalized children^{2-5,7,14-20}. Merritt's study²⁰ reported a much higher prevalence, but patients in the 1980s may not be comparable to those involved in more recent studies. The Sermet-Gaudelus study was not designed to evaluate prevalence and, furthermore, used the WFA ratio, which does not take height into account⁴. The prevalence of hospital malnutrition appeared lower in a recent paper from Australia²¹. However, the population may be different (tertiary pediatric hospital, in- and out-patient population) from ours, and no diagnosis groupings were available to elucidate observed differences.

One of the main attributes of the present survey is the large number of participating pediatric institutions (university and general hospitals, rehabilitation centers), thus avoiding the bias related to single-center experience and better reflecting the diversity of pediatric clinical situations (medical and surgical patients, acute disease and patients with disabilities). It also contributed to the observed range of prevalence of malnutrition between centers (for instance, center 3 was a rehabilitation center that recruited large numbers of obese children). However,

this work must be considered as a snapshot (“same day”) survey and was not designed as a prevalence study. The primary goal was to promote nutritional assessment among all participating centers.

Table 3: Roughly 10% of hospitalized children suffer from malnutrition

	Country	n	Prevalence (%)	Index
De Luca, 2012 ⁷	France	130	8,5	WFH < 80%
Aurangzeb, 2012 ¹⁴	Australia	157	2,5	ZWFH < -2SD
Joosten, 2010 ¹⁵	Nederland	424	11	ZWFH < -2SD
Campanozzi, 2009 ¹⁶	Italy	496	10,2	ZBMI < -2SD
Pawellek, 2008 ¹⁷	Germany	475	6,1	ZWFH < 80%
Marteletti, 2005 ²	France	280	11	ZWFH < -2SD
Hankard, 2001 ³	France	58	9,6	ZWFH < -2SD
Sermet-Gaudelus, 2000 ⁴	France	296	19	WFA < 80%
Hendrikse, 1997 ¹⁸	GB	226	8	ZWFH < 80%
Hendricks, 1995 ¹⁹	USA	268	7,1	ZWFH < 80%
Girardet, 1989 ⁵	France	115	7	ZWFH < 80%
Merritt, 1979 ²⁰	USA	190	18	ZWFH < 80%

Legend: SD : standard deviation; WFH : Weight for height ratio¹⁰ ; ZWFH : Z-score WFH¹⁰ ; ZBMI : Z-score body mass index⁹ ; WFA : weight for age¹⁰; from these studies average prevalence of malnutrition is 10%

The present survey used widely available French growth references¹⁰ in order to fit to day-to-day clinical practice conditions. French growth charts were compared to WHO standards, i.e. globally representative charts that identify “optimal” growth parameters to ensure health in

infancy and later. Within the first 6 months of life, weight, height and BMI for age and sex fall below WHO reference figures, leading to “underestimation” of children with malnutrition. From 6 months to 2 years, the situation is reversed, with a progressive decrease up to 6 years (age limit of the WHO standard). In a position paper, the Nutrition Committee of the French Pediatric Society recommended upgrading the growth charts in all children’s health books using the WHO standard²². Practically speaking, the impact of switching from the French to the WHO growth chart is limited. Disagreement concerned children close to the cutoff value of either of the two standards.

The diagnostic procedure used in this survey is based on BMI charts reproduced in the health books of all children in France. To date, there is no consensus on the index that must be used to define malnutrition in children, and in some instances it is a very controversial issue. Most of the time we use the WFH (% or at best Z-score). However, even though we developed tools to calculate this index, it is seldom used in clinical practice. A study found good agreement between WFH and BMI in the diagnosis of malnutrition in a population aged 2 to 18 years²³, and indices have recently been revisited²⁴. BMI has the great advantage of being easy to calculate and, because of the burden of obesity, most physicians know how to do so. Moreover, as noted above, reference charts for BMI can be found in every child's health book, which is not the case for WFH in France. The Nutrition Committee of the French Pediatric Society recommends calculating BMI for any pediatric admission whenever growth dynamics cannot be properly analyzed⁸. It is mandatory to perform a clinical examination to look for signs and causes of malnutrition and to draw growth charts when BMI falls below the third centile for age and sex.

The present study is based on nutritional status and not on the “nutritional risk” = the estimated risk of losing weight when hospitalized, i.e. of becoming malnourished. Some scores have been validated in children^{4,25-29}. We deliberately focused on nutritional assessment and not risk because we believe it must come first. Some units with a culture of nutritional assessment and care might be ready to screen for nutritional risk. In all cases, these initiatives must be evaluated over the medium/long term²⁶ and are highly dependent on the motivation of a few individuals heavily involved in nutrition. For instance, we set up a systematic nutritional assessment that relies on medical students because, to date, motivation among health professionals has been limited.

The issues of which nutritional index and reference to use, whether to assess nutritional status or risk warrant national consensus statements on pediatric nutritional assessment in hospital. We have addressed them in France with a statement of the Nutrition Committee of the French Pediatric Society⁸. This will help encourage decision makers and others responsible for health policies to comply with resolution ResAp (2003)3 of the Council of Europe, which recommended nutritional assessment and care in response to the “unacceptable number of undernourished hospital patients in Europe”. Systematic screening for hospital malnutrition requires downstream organization (dietitians, follow-up consultation, etc) to be efficient³⁰, and a variety of health professionals must be involved, i.e. dietitians, nurses, and health auxiliaries.

The growing participation of pediatric teams from the first pilot survey in the present one is encouraging.. We believe that such “nutritional events” will contribute to improving awareness of nutrition in day-to-day practice among health professionals.

Acknowledgements:

Statement of authorship: SS, AD, HP, DG, VC, NP, ABo, ABr, JPC, MEC, DD, BD, OG, FG, PH, CL, AL, SL, EM, PM, PR, NT, VT, AT, AV, MF, PI, RH carried out the studies and data analyses and drafted the manuscript. AD, BD, HP, DG, VC, MF, PI, RH participated in the design of the study, PI, RH, AD, SS performed the statistical analysis. RH conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. RH, AD declare research support from Nutricia, Advanced Medical Nutrition (logistics of the survey) and BD is employed by Nutricia, Advanced Medical Nutrition. None of the other authors declare any conflict of interest regarding the present survey.

REFERENCES

1. Stevens GA, Finucane MM, Paciorek CJ, Flaxman SR, White RA, Donner AJ, Ezzati M; Nutrition Impact Model Study Group (Child Growth). Trends in mild, moderate, and severe stunting and underweight, and progress towards MDG 1 in 141 developing countries: a systematic analysis of population representative data. *Lancet* 2012;380:824-34.
2. Marteletti O, Caldari D, Guimber D, Mention K, Michaud L, Gottrand F. Malnutrition screening in hospitalized children: influence of the hospital unit on its management. *Arch Pediatr* 2005;12:1226-31.
3. Hankard R, Bloch J, Martin P, Randrianasolo H, Bannier MF, Machinot S, Cézard JP.. Nutritional status and risk in hospitalized children. *Arch Pediatr* 2001;8:1203-8.
4. Sermet-Gaudelus I, Poisson-Salomon AS, Colomb V, Brusset MC, Mosser F, Berrier F, Ricour C. Simple pediatric nutritional risk score to identify children at risk of malnutrition. *Am J Clin Nutr* 2000;72:64-70.
5. Girardet JP, Fontaine JL. Evaluation of nutritional status in pediatrics. *Ann Pediatr (Paris)* 1989;36:617-20.
6. Joosten K, Hulst J. Prevalence of malnutrition in pediatric hospital patients. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:590-6.
7. De Luca A, Piloquet H, Mansilla M, Simon D, Fischbach M, Caldari D, Dorigny B, Ingrand P, Hankard R. Multicenter nutritional screening in hospitalized children. *Arch Pediatr* 2012;19:545-6.
8. Hankard R, Colomb V, Piloquet H, Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP, Darmaun D, Dupont C, Frelut ML, Girardet JP, Goulet O, Rieu D, Simeoni U, Turck

- D, Vidailhet M. Malnutrition screening in clinical practice. *Arch Pediatr* 2012;19:1110-7.
9. Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempe M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991;45:13-21.
 10. Sempé M, Pédrón G, Roy-Pernot MP. Auxology, methods and sequences. *Auxologie, Méthode et séquences*. Paris: Théraplix, 1979.
 11. Waterlow JC, Buzina R, Keller W, Lane JM, Nichaman MZ, Tanner JM. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bull World Health Organ* 1977;55:489-98.
 12. De Onis M, Onyango A, Van Den Broeck, Martorel C, editors. WHO child growth standards. *Acta Paediatrica Suppl.* 2006;450:S5-S101.
 13. Rolland-Cachera MF for the ECOG Group. Childhood obesity: current definitions and recommendations for their use. *Int J Pediatr Obesity* 2011;6:325–31.
 14. Aurangzeb B, Whitten K, Harrison B, Mitchell M, Kepreotes H, Sidler M, Lemberg DA, Day AS. Prevalence of malnutrition and risk of under-nutrition in hospitalized children. *Clin Nutr* 2012;31:35-40.
 15. Joosten KF, Zwart H, Hop WC, Hulst JM. National malnutrition screening days in hospitalized children in The Netherlands. *Arch Dis Child* 2010;95:141-5.
 16. Campanozzi A, Russo M, Catucci A, Rutigliano I, Canestrino G, Giardino I, Romondia A, Pettoello-Mantovani M. Hospital-acquired malnutrition in children with mild clinical conditions. *Nutrition*. 2009;25:540-7.

17. Pawellek I, Dokoupil K, Koletzko B. Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. *Clin Nutr* 2008;27:72-6.
18. Hendrikse WH, Reilly JJ, Weaver LT. Malnutrition in a children's hospital. *Clin Nutr* 1997;16:13-8.
19. Hendricks KM, Duggan C, Gallagher L, Carlin AC, Richardson DS, Collier SB, Simpson W, Lo C. Malnutrition in hospitalized pediatric patients. Current prevalence. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995;149:1118-22.
20. Merritt RJ, Suskind RM. Nutritional survey of hospitalized pediatric patients. *Am J Clin Nutr* 1979;32:1320-25.
21. O'Connor J, Yiude L, Allen J, Baur L. Obesity and under-nutrition in a tertiary paediatric hospital. *J Paediatr Child Health* 2004;40:299-304.
22. de Onis M, Garza C, Onyango AW, Rolland-Cachera MF; le Comité de nutrition de la Société française de pédiatrie. WHO growth standards for infants and young children. *Arch Pediatr* 2009;16:47-53.
23. Mei Z, Grummer-Strawn LM, Pietrobelli A, Goulding A, Goran MI, Dietz WH. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *Am J Clin Nutr* 2002;75:978-85.
24. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* 2007;335:194-7.
25. Secker DJ, Jeejeebhoy KN. Subjective global nutritional assessment for children. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1083-9.

26. McCarthy H, Dixon M, Crabtree I, Eaton-Evans MJ, McNulty H. The development and evaluation of the screening tool for the assessment of malnutrition in paediatrics (STAMP©) for use by healthcare staff. *J Hum Nutr Diet* 2012;25:311-8.
27. Gerasimidis K, Keane O, Macleod I, Flynn DM, Wright CM. A four-stage evaluation of the Paediatric Yorkhill Malnutrition Score in a tertiary paediatric hospital and a district general hospital. *Br J Nutr* 2010;104:751–6.
28. Hulst JM, Zwart H, Hop WC, Joosten KFM. Dutch national survey to test the STRONG kids nutritional risk screening tool in hospitalized children. *Clin Nutr* 2010;29:106–11.
29. Hartman C, Shamir R, Hecht C, Koletzko B. Malnutrition screening tools for hospitalized children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012, 15:303–9.
30. Wilson JMG, Jungner F. Principles and Practice of Screening for Disease (Public Health Papers No.34). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1968. (Accessed October 29, 2012, at: http://whqlibdoc.who.int/php/WHO_PHP_34.pdf)

2.2.4 Enquête e-Pinut 2012 (Soumise)

Systematic nutritional assessment in hospitalized children: an international survey

Arnaud De Luca^{1,2*}, Virginie Benzaken², Virginie Colomb^{3,4*}, Michel Fischbach^{5*},
Dominique Guimber^{6*}, Noël Peretti^{7,8,9*}, Hugues Piloquet^{10*}, Pierre Ingrand^{1,2}, Régis
Hankard^{11,12,13*}

¹ Inserm, CIC 1402, Poitiers, 2 rue Milétrie, F-86021, France

² CHU Poitiers, Poitiers, 2 rue Milétrie, F-86021, France

³ CHU Necker-Enfants-Malades, Service de Gastroentérologie et Nutrition de l'Enfant, 149
rue de Sèvres, Paris, F-75015, France

⁴ Université Paris-Descartes, 12 Rue de l'Ecole de Médecine, Paris, F-75006, France

⁵ CHU Strasbourg, 1 Av Moliere, Strasbourg, F-67000, France

⁶ CHRU de Lille, 2 Avenue Oscar Lambret, Lille, F-59000, France

⁷ Inserm, U1060, INRA, UMR1235, 11 Avenue Jean Capelle, F-69100, France

⁸ Université Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, F-69622, France

⁹ Hospices Civils de Lyon, 59 boulevard Pinel, Bron, F-69677, France

¹⁰ CHU Nantes, Clinique Médicale Pédiatrique, Gastroentérologie et Nutrition, 38 boulevard
Jean-Monnet, Nantes, F-44093, France

¹¹ Inserm U 1069, 2 boulevard Tonnellé, Tours, F-37044, France

¹² CHU Tours, 2 boulevard Tonnellé, Tours, F-37044, France

¹³ Université Tours, 60 rue du Plat D'Etain, Tours, F-37044, France

*Members of the scientific committee

Corresponding author: *Pr Régis HANKARD*

Mailing: Inserm U 1069, CHU Bretonneau, 2 Bd Tonnelé, F-37044 Tours Cedex

Telephone: +33 2 47 47 98 17, Fax: +33 2 47 36 62 26

E-mail: regis.hankard@inserm.fr

Short title: Hospital malnutrition survey in Paediatrics

Keywords: multidisciplinary nutritional team; paediatrics; protein-energy malnutrition; survey

ABSTRACT

Protein energy malnutrition (PEM) is poorly investigated in paediatric wards. Our aim was to determine PEM frequency in hospitalized children from different countries using the same diagnostic procedure. For the third consecutive year, we conducted a systematic nutritional assessment survey using a two-week cross-sectional methodology. All participating centres followed the same standardized procedure. Weight and height were measured in children from 0 to 18 years, body mass index (BMI) and weight-for-height ratio (WFH) were calculated and z-scores were derived. Diagnostic procedure (clinical examination) was conducted only for children below the third centile of BMI for age and sex. Forty-seven centres from 6 countries (France, Belgium, Canada, Colombia, Democratic Republic of the Congo and Tunisia) participated in this survey. Of the 3097 data collected, 2845 were analysed (47% girls), 2378 of whom were from France. Mean age was 5.7 ± 5.3 years. BMI below 3rd centile represented 16% of the whole population (max 44% in Congo, min 10% in Tunisia). Eleven per cent of children presented with WFH z-score $< -2SD$ (acute PEM) (max 40% in Congo, min 6% in Canada) and 12% had height for age $< -2SD$ (up to 29% in Canada). BMI $> +2SD$ was found in 8.6% children. In high-income countries, PEM frequency remained quite the same and PEM was more frequent in low-income countries where it is still a public health problem. We achieved the first international nutritional survey in hospitalized children, contributing to develop the awareness of PEM with a growing number of participating centres every year.

INTRODUCTION

The exact number of hospitalized children concerned by protein-energy malnutrition (PEM) is unknown. Several transversal “same day” studies reported a frequency ranging from 7 to 19% in Europe (¹⁻⁹). The problem is even greater in low-income countries, since the nutritional impact of disease comes on top of poor nutritional status. Annual statistics report over 20 million children concerned by severe PEM in these countries, especially those less than 5 years old (¹⁰). Even though nutritional status globally improved, notably in Latin America, and in a lesser extent in sub-Saharan Africa (¹¹), PEM has a short and long-term impact on growth and cognitive level (^{12,13}). Most of the time, the nutritional status is not evaluated at admittance. Consequently PEM is under diagnosed. In high-income countries PEM is mainly a consequence of disease. A recent report estimated the financial burden of PEM in Irish adults around 1.4 billion €, showing the pivotal role of PEM care in health costs (¹⁴).

For the third year, we conducted a systematic nutritional assessment survey using a two-week cross-sectional methodology, involving an increasing number of centres (^{8,9}). For the first time, we included countries of different socio-economic level and local experts were asked to confirm PEM diagnosis. A questionnaire was sent to all centres to record local organization for PEM screening.

The aim of our survey was to determine PEM frequency in hospitalized children in different countries in the world.

METHODS

Population

Inclusion criteria were every hospitalized child less than 18 years old at admittance, with general status allowing anthropometric measurements. No length of stay was expected. Intensive care, neonatology and emergency units were excluded from this survey.

Diagnostic procedure

We performed an international multicentre observational cross-sectional study. Patients were included during two weeks (March 16-30th 2012) in centres from France, Belgium, Canada, Colombia, Democratic Republic of the Congo and Tunisia. All hospitalized children, without selection, admitted during the survey in the paediatric units involved were weighed and heighted using usual devices. In children that could not stand, height was estimated using Chumlea formula of knee height (¹⁵). Children were classified in diagnostic groups according to leading hospitalization cause and type of ward (medical, surgical, rehabilitation, general, specialised). Z-scores for age and sex in all children were calculated for weight for height (Z-WFH), body mass index (Z-BMI), height for age (Z-HFA) and head circumference (Z-HCFA) (any age – when available) using French references (^{16,17}).

All calculations were performed in accordance with the French Paediatric Society guidelines for paediatric PEM using “e-PINUT” web-tool (www.epinut.fr) (FileMaker Pro Advanced 11 – Apple Inc., Cupertino, CA, USA) (¹⁸). A BMI below the 3rd centile for age and sex using French growth curves defined underweight (^{17,19}) and a Z-WFH below -2 standard deviations (SD) was considered compatible with PEM (²⁰).

We asked senior physicians to confirm the diagnosis of malnutrition in any child with a Z-BMI < 3rd centile (first step of the guidelines procedure) or with growth faltering (⁹). PEM

signs were collected: clinical loss of muscular or fat mass, skin or hair/nails abnormalities and oedema. Guiding signs for aetiology were recorded: chronic diarrhoea (>3 weeks), cough, chronic disease (lasting 3 months or more), cancer, psychiatric disease and social condition. Weight or height faltering were defined as a drop of 1 standard deviation or more on growth curves, judged in the subgroup of children whose growth dynamics was documented. Growth faltering may occur in patients with Z-BMI>3rd centile, in that case senior physician could correct and confirm PEM.

Organizational questionnaire

A questionnaire was sent to participating senior paediatricians eight months after the survey to identify professionals involved in the nutritional assessment in their hospital. Questions focused on nutritional assessment organization, new patients found out and on the awareness of professionals.

Ethical considerations

Since the survey merged anonymous data from standard care procedure, it did not require approval by an ethic committee according to the French regulation.

Statistical analysis

Results were expressed in mean $\pm$ SD. Comparisons of means between countries were tested using non-parametric multiple comparisons test (Kruskal-Wallis). Z-scores comparisons between groups of population were tested using t-test. Comparisons of frequencies (between sub-populations or countries) were tested using Chi² test (two or multiple frequencies). Statistical analyses were performed with StatPlus:mac (AnalystSoft Inc., Alexandria, VA, USA).

RESULTS

Population

Forty-seven centres participated in the survey. Six countries were involved, embodying high- and low-income countries in 3 continents: Belgium (3 centres), Canada (2 centres), Colombia (1 centre), Democratic Republic of Congo (DR Congo) (1 centre), France (38 centres) and Tunisia (2 centres). Data from 2845 in 3097 patients were analysed (252 excluded: 84 duplicates, 20 entry errors, 22 over 18y, 18 second visits, 6 missing sex, 102 previous visits). Total eligible admissions were not recorded. The patients' characteristics are presented in Table 1. Mean age was 5.7 ± 5.3 years. Children from Canada were older than those from France ($p=10^{-3}$) and from Belgium ($p=10^{-4}$). Mean ages of children from DR Congo, Colombia and Tunisia were not different.

Table 1: Characteristics of the patients

	All	SD	BMI < 3 rd centile	SD	Z-WFH < - 2SD	SD
n	2845		446		301	
Female n (%)	1324 (47%)		186 (42%)		117 (39%)	
Mean age (years)	5.7	5.3	4.8	5.3	4.3	4.8
Z-BMI (SD)	-0.3	1.8	-3.0	1.1	-3.2	1.3
Z-WFH (SD)	0.0	2.1	-2.3	0.9	-2.7	0.7
Z-HFA (SD)	0.1	1.9	-0.5	2.1	-0.3	2.0
Head Circumference (n)	1237		245		174	
Z-HC (SD)	-0.4	1.9	-1.4	2.1	-1.4	2.1

Z-BMI, body mass index Z-score; Z-WFH, weight for height Z-score; Z-HFA, height for age Z-score, Z-HC, head circumference Z-score.

Nutritional status

Four hundred and forty-six patients had their BMI below 3rd centile, representing 16% of the whole population (max 44% in DR Congo, min 10% in Tunisia). Z-WFH and Z-HFA < -2SD were observed respectively in 301 patients (11% of the whole population) and 340 patients (12% of cases). Nutritional status for each country is displayed in Table 2.

Table 2: Frequencies of index abnormalities in the different countries

	n	Mean age (years)	Mean age (SD)	BMI < 3 rd centile	Z-WFH <-2SD	Confirmed PEM	Z-HFA <-2SD	Z-BMI >+2SD
Belgium	129	4.8	5.3	25.6%	16.3%	17.8%	12.4%	4.7%
Canada	68	8.2	5.8	10.3%	5.9%	13.2%	29.4%	19.1%
Columbia	74	2.7	3.6	20.3%	18.9%	16.2%	12.2%	6.8%
DR Congo	101	2.6	3.6	43.6%	39.6%	7.9%	25.7%	2.0%
France	2378	6.0	5.4	14.2%	9.0%	8.8%	10.9%	8.7%
Tunisia	95	2.8	3.6	9.5%	8.4%	7.4%	10.5%	11.6%
Total	2845	5.7	5.3	15.7%	10.6%	9.4%	12.0%	8.6%

CI95, Confidence Interval 95%; DR Congo, Democratic Republic of the Congo; BMI, Body Mass Index; Z-BMI, BMI Z-score; Z-HFA, height for age Z-score; Z-WFH, weight for height Z-score; Confirmed PEM, clinical confirmation of Protein-energy malnutrition by senior physician.

PEM was confirmed by the senior physician in 234 (59%) children with BMI below the 3rd centile. A Z-WFH<-2SD was present in 93% of children with a BMI<3rd centile. PEM was confirmed by senior physician in 53% of children with a Z-BMI<3rd centile and 58% of children with a Z-WFH<-2 SD. Twenty-six children had growth faltering and a Z-BMI>3rd centile, confirmed as PEM. The frequency of children with Z-WFH<-2SD for each diagnostic group is shown in Table 3. Top 5 diagnostics were: General Paediatrics (including

undetermined or unclassified or general diseases and growth and failure to thrive), medical and surgical cardiology, genetics, gastroenterology, and neurology. Main causes for hospitalization varied between countries: Colombia had 51% of pneumology (5-20% in other countries), DR Congo had 47% of general paediatrics (majority of malaria), Canada had 31% of neurology (7-12% in other countries) and Belgium had 8% of medical or surgical cardiology (0-3% in others countries). Chronic disease was present in 2125 patients with documented diagnosis (56%). PEM was more frequent in that population when compared to acute disease (80% vs. 20%, $p<0.0001$). Chronic diseases were most frequent in Belgium (90%) and the least in DR of Congo (14%). We did not observe a higher frequency of PEM in children from rehabilitation wards (9.8%) compared to other wards (10.7%), neither between medical (11.6%) and surgical (10.6%) diagnoses.

Nutritional support was on going in 144 patients (5% of all patients) of whom 55 with confirmed PEM, thus representing 20% of children with PEM. Nutritional support was enteral ($n=101$), parenteral ($n=33$) or both ($n=10$).

Z-HFA was lower in children with a $Z\text{-WFH}<-2SD$ (-0.25 ± 2.03 vs. 0.12 ± 1.92 , $p=0.003$). The frequency of children with $Z\text{-HFA}<-2SD$ was higher in children with $Z\text{-WFH}<-2SD$ (16 vs. 11%, $p=0.02$).

Head circumference was available in 1237 patients. Seventeen % of children had a $Z\text{-HC}<-2SD$. This frequency differed between countries ($p=0.004$), respectively for DR of Congo, Tunisia, Belgium, France and Colombia: 32%, 22%, 21%, 15% and 12%. Top five group of diagnoses associated with $Z\text{-HC}<-2SD$ was: genetics (50%), nutrition (37%), cardiac surgery (29%), cardiology (27%), visceral surgery (22%) and neurology (21%). Frequency of $Z\text{-HC}<-2SD$ was higher in hospitalized children with chronic diseases when compared to those with

acute diseases (25 vs. 12%, $p<0.0001$), with Z-HFA<-2SD (55 vs. 10%, $p<0.0001$), and with Z-WFH <-2SD (35 vs. 14%, $p<0.0001$).

Table 3: Malnutrition repartition in diagnostic groups

Diagnostic group	n	Z-WFH<-2SD (n)	Z-WFH<-2SD % of total	Z-WFH<-2SD % of each diagnostic group
Cardiology	69	10	3.3%	14.5%
Dermatology	20	1	0.3%	5.0%
Hepato-gastroenterology	435	63	20.9%	14.5%
Endocrinology	51	2	0.7%	3.9%
Genetics	24	7	2.3%	29.2%
Medicine	85	7	2.3%	8.2%
Nephrology	84	7	2.3%	8.3%
Neurology	334	45	15.0%	13.5%
Nutrition / Growth	54	23	7.6%	42.6%
Oncology	164	15	5.0%	9.1%
ORL	75	7	2.3%	9.3%
General Paediatrics	196	22	7.3%	11.2%
Pneumology	310	40	13.3%	12.9%
Psychiatry	114	15	5.0%	13.2%
Rheumatology	17	2	0.7%	11.8%
Cardiac surgery	22	7	2.3%	31.8%
Neurosurgery	32	3	1.0%	9.4%
Orthopaedic surgery	72	4	1.3%	5.6%
Visceral surgery	140	16	5.3%	11.4%
Other surgery	39	1	0.3%	2.6%
Unknown	508	4	1.3%	0.8%
TOTAL	2845	301	100%	10.6%

Z-WFH, weight for height Z-score; General Paediatrics, undetermined or unclassified or general diseases and growth and failure to thrive.

Overweight and obesity ($\text{BMI} > +2\text{SD}$) concerned 244 children (8.6%) and only 2% of these came for obesity check.

Organizational questionnaire

We get 22 questionnaires from participating centres (47%). Systematic nutritional assessment was performed in 68% centres, with 27% of written procedure and 47% of unwritten procedure. Local organization was recorded: paramedical staff measured children in 60% of cases, medical staff in 27% and both of them in 13%. An improvement of PEM awareness in paramedical staff was declared in 55% hospitals, 68% in medical staff and 14% declared none. Paediatric nutrition week led to new diagnosis of PEM in 10 centres.

DISCUSSION

We achieved the very first international hospital PEM survey in Paediatrics, involving nearly 3000 patients in 47 centres and federated 6 countries around a same diagnostic procedure. The frequency of PEM was higher in DR Congo, in which hospitalized children were younger, showing care of more serious diseases and/or a difference of income. Only 6 centres (13%) claimed to use written procedure to detect PEM.

Comparison between countries showed a higher frequency of PEM in the DR Congo and in Colombia. This might have been a consequence of the higher prevalence of malnutrition in the population of both countries (^{21,22}). However Z-HFA, a marker of chronic PEM, was lower in DR Congo but not in Colombia. Mean age was lower in both countries increasing the risk to develop acute malnutrition. The survey was conducted in late March, which was the beginning of the peak season for bronchiolitis in Colombia (²³). Confirmed PEM in DR Congo was particularly lower than frequency of $\text{Z-WFH} < -2\text{SD}$, this may be relative to the endemic prevalence in that country and to consider only severe PEM. In DR Congo most of

the children suffered from malaria, which is also a specific pattern of hospital recruitment that might have contributed to the high frequency of PEM in this country (²⁴).

Belgium had a surprisingly high frequency of PEM and low frequency of overweight and obesity because one of the three participating centres was a cardiologic unit with a high prevalence of PEM. Canada showed a higher frequency of Z-HFA<-2SD and lower frequency of Z-WFH<-2SD than in France. This might have been due to a recruitment bias. Half of the population came from a rehabilitation centre with disabilities of genetic or acquired origin. Moreover, obesity is much more prevalent in Canada than in other countries participating in the survey, therefore decreasing the frequency of PEM (²⁵). This was also the case in Tunisia and obesity might have overruled PEM (²⁶). Recruitment biases are known limitations of observational cross-sectional survey; another limitation is the number of patients in each country (France excepted).

Chronic diseases accounted for more than half of hospitalized children. This was in accordance to our previous surveys (^{8,9}) but higher than in other studies (³). We observed a higher frequency of Z-WFH<-2SD in that group according to previous studies (²). One of the specific inputs of the 2012 survey was to include paediatric wards from different countries and level of income. All of them were assessed using the same diagnostic procedure and references. French references for growth were built on a reference population studied from the 50's to the 70's (¹⁶). Applicability of this reference to surveyed populations is questionable although providing homogenous methodology of evaluation. Z-HC<-2SD was observed in 18% of the whole population. This might have been due to malnutrition and chronic diseases particularly in developed countries. However the highest rate was observed in DR of Congo where children suffering for chronic diseases were at the lowest rate. Similarly DR of Congo showed one of the highest rates of Z-HFA<-2SD. This might reflect chronic malnutrition of

the whole population. With 8.5% of children under 5 below -2 SD of Z-WFH (²⁷), DR of Congo is one of the countries with the highest rate of malnutrition and lowest change to reach the millennium development goals 1 (¹³).

We assessed the organization of systematic nutritional assessment and malnutrition awareness in the participating centres. Self-reported awareness of malnutrition among health care professionals was important both in physicians and in paramedical staff. Surveys improve the awareness of malnutrition and the acquisition of measurements (²⁸). However, participating to this survey may have induced a recruitment bias. Only four centres had written procedures. French guidelines were not published at the time of the survey and may provide implementation of such procedures. Nearly half of centres declared new cases during the two weeks of the survey, underlining the importance of a perennial systematic nutritional assessment at admittance. Paramedical staff had a pivotal role in the whole process leading to the diagnostic of malnutrition and must be targeted in future actions promoting awareness of malnutrition in hospitalized children.

This survey, the first international one, contributed to the awareness of PEM and to improve PEM screening in a growing number of paediatric wards in France and abroad. It allowed comparison between countries using the same methodology and growth charts references. Causes for malnutrition varied between low- and high-income countries. In high-income countries, acute PEM frequency remained quite the same and PEM was more frequent in the DR Congo and Colombia. Written guidelines available in each centre and targeting paramedics could probably improve systematic nutritional assessment. Our objective for 2013 will be to increase the number of participating countries and centres, and record a better phenotype of patients.

Acknowledgements: Thanks to all participating centres and persons involved in this survey: Michel Abely (CHU Reims), Marie Alphonse (CH La Rochelle), Gaëlle Ardouin (CH Le Mans), Françoise Aubier (Hôpital d'Enfants, Margency), Hamid Azlagui (Hôpital d'Enfants, Margency), Catalina Bages (Universidad El Bosque , Bogotá, Colombia), Sandrine Baron Joly (CHU Nîmes), Mongi Ben Hariz (Hôpital Mongi SLIM, Tunis, Tunisie), Carole Bérard (Hospices Civils de Lyon), Laurence Blanc (CHU Poitiers), Gwenaëlle Bolle (CHC - Clinique de l'Espérance, Liège, Belgique), Samir Boukthir (Hôpital d'enfants, Tunis, Tunisie), Agnès Bouniol (CPR de Bullion), Anne Breton (CHU Toulouse), Estelle Breton (CH Saint-Brieuc), David Briard (CHU Rennes), Aurélia Carbasse (CHU Strasbourg), Diana Cardenas (Universidad El Bosque , Bogotá, Colombia), Clotilde Carlier (CH Niort), Emilie Chaillou (CHU Angers), Jean-Pierre Chouraqui (CHU Grenoble), Françoise Cieslik (CHU Raymond Poincaré, Garches), Marie-Edith Coste (CHU Marseille), Clara Crémilleux (CHU Besançon), Jean-Marie Cuisset (CHU Lille), Alain Dabadie (CHU Rennes), Elena Dain (Hôpital Universitaire des Enfants Reine Fabiola, Bruxelles, Belgique), Céline Delvert (Hospices Civils de Lyon), Djamal Djeddi (CHU Amiens), Béatrice Dubern (CHU Armand Trousseau, Paris), Claire Dupont (CHU Caen), Marine Frasset-Darrieux (CHU Poitiers), Virginie Gandemer (CHU Rennes), Delphine Gérard (Hôpital d'Enfants, Margency), Louis Gerbaud Morlaes (CHU Bordeaux), Jean-Louis Ginies (CHU Angers), Frédéric Gottrand (CHU Lille), Olivier Goulet (CHU Necker-Enfants-Malades, Paris), Philippe Goyens (Hôpital Universitaire des Enfants Reine Fabiola, Bruxelles, B-1020, Belgique), Chloé Guinet (CHU Nancy), Céline Halb (CHU Reims), Dominique Hermans (Cliniques St-Luc, Bruxelles, Belgique), Pascale Hermouet (CHU Poitiers), Agathe Jobert (CH Saint-Nazaire), Simon Kayemba (CH Dreux), François Labarthe (CHU Tours), Marie Laberge (CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada), Cécile Lambe (CHU Necker-Enfants-Malades, Paris), Thierry Lamireau (CHU Bordeaux), Delphine Lapeyre (CH La Rochelle), André Léké (CHU Amiens), Sylvie

Leprince (CPR de Bullion), Daniel Lesbros (CHU Nîmes), Guy Letellier (CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada), Marie Mansilla (CHRU Strasbourg), Valérie Marchand (CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada), Evelyne Marinier (CHU Robert Debré, Paris), Camille Marteau (CHRU Strasbourg), Léonie Martigne (CH Angoulême), Emmanuel Mas (CHU Toulouse), Pascal Massicot (CHM, Saint-Trojan), Alain Morali (CHU Nancy), Olivier Mouterde (CHU Rouen), Adolphine Nkuadiolandu (Hôpital pédiatrique Kalembelembe, Kinshasa, République Démocratique du Congo), Cécile Pélatan (CH Le Mans), Isabelle Pharaon (Hôpital d'Enfants, Margency), Stéphanie Pignier (CHU Rouen), Pierre Renard (CHM, Saint-Trojan), Robert Rubinsztajn (CHU Raymond Poincaré, Garches), Amandine Rubio (CHU Grenoble), Marion Savelli (CHU Raymond Poincaré, Garches), Christine Scarinci (CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada), Patrick Schlessler (CHC - Clinique de l'Espérance, Liège, Belgique), Jean-François Ségura (CHU Brest), Bérangère Sigart (CHC - Clinique de l'Espérance, Liège, Belgique), Sanja Stojanovic (CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada), Carmel Tete (CH Dreux), Nadège Thomassin (CHU Grenoble), Giselle Tores (Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia), Jean Turgeon (CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada), Anne Turquet (CHU La Réunion, St Denis), Audrey Vanrenterghem (CHU Amiens), Christine Vitoux (CHU Robert Debré, Paris), Carsten Walenda (CHU Nîmes), Stéphanie Willot (CHU Tours).

Financial support: Nutricia, Advanced Medical Nutrition had no role in the design, analysis or writing of this article.

Conflict of Interest Statement: RH, AD declare research support from Nutricia, Advanced Medical Nutrition (logistics of the survey). None of the other authors declare any conflict of interest regarding the present survey.

Authorship: AD, VB, VC, MF, DG, NP, HP, PI, RH carried out the studies and data analyses and drafted the manuscript. AD, VC, MF, DG, NP, HP, PI, RH participated in the design of the study, PI, RH, AD performed the statistical analysis. RH conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Hankard R, Bloch J, Martin P, *et al.* (2001) Etat et risque nutritionnel de l'enfant hospitalisé. *Arch Pediatr* **8**, 1203-1208.
2. Marteletti O, Caldari D, Guimber D, *et al.* (2005) Dépistage de la malnutrition chez l'enfant hospitalisé : influence de la structure d'accueil dans la prise en charge. *Arch Pediatr* **12**, 1226-1231.
3. Joosten KF, Zwart H, Hop WC, *et al.* (2010) National malnutrition screening days in hospitalised children in The Netherlands. *Arch Dis Child* **95**, 141-145.
4. Sermet-Gaudelus I, Poisson-Salomon AS, Colomb V, *et al.* (2000) Simple pediatric nutritional risk score to identify children at risk of malnutrition. *Am J Clin Nutr* **72**, 64-70.
5. Hendricks KM, Duggan C, Gallagher L, *et al.* (1995) Malnutrition in hospitalized pediatric patients. Current prevalence. *Arch Pediatr Adolesc Med* **149**, 1118-1122.
6. Hendrikse WH, Reilly JJ, Weaver LT (1997) Malnutrition in a children's hospital. *Clin Nutr* **16**, 13-18.
7. Pawellek I, Dokoupil K, Koletzko B (2008) Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. *Clin Nutr* **27**, 72-76.
8. de Luca A, Piloquet H, Mansilla M, *et al.* (2012) Evaluation tricentrique de l'état nutritionnel chez l'enfant hospitalisé. *Arch Pediatr* **19**, 545-546.
9. Sissaoui S, de Luca A, Piloquet H, *et al.* (2013) Paediatric large scale hospital malnutrition screening in France. *e-SPEN Journal* **8**, e68-e72.
10. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, *et al.* (2008) Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet* **371**, 243-260.
11. Lutter CK, Lutter R (2012) Fetal and Early Childhood Undernutrition, Mortality, and Lifelong Health. *Science* **337**, 1495-1499.

12. Emond AM, Blair PS, Emmett PM, *et al.* (2007) Weight faltering in infancy and IQ levels at 8 years in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Pediatrics* **120**, e1051-e1058.
13. Stevens GA, Finucane MM, Paciorek CJ, *et al.* (2012) Trends in mild, moderate, and severe stunting and underweight, and progress towards MDG 1 in 141 developing countries: a systematic analysis of population representative data. *Lancet* **380**, 824-834.
14. Rice N, Normand C (2012) The cost associated with disease-related malnutrition in Ireland. *Public Health Nutr* **15**, 1966-1972.
15. Chumlea WC, Guo SS, Steinbaugh ML (1994) Prediction of stature from knee height for black and white adults and children with application to mobility-impaired or handicapped persons. *J Am Diet Assoc* **94**, 1385-1388.
16. Sempé M, Pédrón G, Roy-Pernot MP (1979) *Auxologie : méthodes et séquences*. Paris: Théraplix.
17. Rolland-Cachera MF, Sempé M, Guilloud-Bataille M, *et al.* (1982) Adiposity indices in children. *Am J Clin Nutr* **36**, 178-184.
18. Hankard R, Colomb V, Piloquet H, *et al.* (2012) Malnutrition screening in clinical practice. *Arch Pediatr* **19**, 1110-1117.
19. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, *et al.* (2007) Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* **335**, 194-197.
20. Waterlow JC (1979) Anthropometric assessment of malnutrition in children. *Lancet* **2**, 250-251.
21. République Démocratique du Congo: Final report (2008) Enquête démographique et de Santé (EDS-RDC 2007). <http://www.measuredhs.com/pubs/pdf/FR208/FR208.pdf> (accessed October 2014).

22. Dekker LH, Mora-Plazas M, Marín C, *et al.* (2010) Stunting associated with poor socioeconomic and maternal nutrition status and respiratory morbidity in Colombian schoolchildren. *Food Nutr Bull* **31**, 242-250.
23. Bedoya VI, Abad V, Trujillo H. (1996) Frequency of respiratory syncytial virus in hospitalized infants with lower acute respiratory tract infection in Colombia. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 1123-1124.
24. Kang H, Kreuels B, Adjei O, *et al.* (2013) The causal effect of malaria on stunting: a Mendelian randomization and matching approach. *Int J Epidemiol* **42**, 1390-1398.
25. Roberts KC, Shields M, de Groh M, *et al.* (2012) Overweight and obesity in children and adolescents: results from the 2009 to 2011 Canadian Health Measures Survey. *Health Rep* **23**, 37-41.
26. Ben Amara H, Jelidi J, Bouguerra R, *et al.* (2008) Tunisian children reference for body mass index and prevalence of obesity. *Tunis Med* **86**, 906-911.
27. World Health Organisation (2013) Democratic Republic of the Congo. Child malnutrition estimates by WHO Child Growth Standards. <http://www.who.int/nutgrowthdb/database/countries/cod/en> (accessed October 2014).
28. Milani S, Wright C, Purcell O, *et al.* (2013) Acquisition and utilisation of anthropometric measurements on admission in a paediatric hospital before and after the introduction of a malnutrition screening tool. *J Hum Nutr Diet* **26**, 294-297.

2.2.5 Syndrome du Cri-du-chat (Soumise)

Le handicap et les maladies génétiques posent le problème de la mise en défaut de l'IMC et de l'indice de Waterlow par la difficulté de mesure du poids et de la taille. Leur fiabilité pour le calcul des index et la nécessité d'intégrer la trajectoire de croissance propre à la pathologie rendent l'évaluation nutritionnelle difficile. Pour cela, nous avons étudié le syndrome du Cri-du-chat en comparant les courbes spécifiques et l'évaluation par l'outil e-PINUT. Ce syndrome est pourvoyeur de MPE notamment par les troubles de déglutition mais ce travail a mis en évidence la difficulté d'évaluation de l'état nutritionnel dans cette pathologie.

Lefranc V, de Luca A, Hankard R. Protein-energy malnutrition is frequent and precocious in Cri du Chat syndrome. Article soumis - Am J Med Genet.

Protein-Energy Malnutrition is Frequent and Precocious in Cri du Chat Syndrome

Violaine Lefranc¹, Arnaud de Luca^{1,2,3}, Régis Hankard^{2,3*}

¹ Pédiatrie Multidisciplinaire – Nutrition de l’Enfant, CHU Poitiers, Poitiers, F-86000 France

² Inserm, CIC1402, Poitiers, F-86 000 France

³ University of Poitiers, Poitiers, F-86 000 France

RUNNING TITLE: Nutrition in Cri du Chat syndrome

*** Corresponding author:** *Pr Régis HANKARD*

Mailing: Inserm U 1069, CHU Bretonneau, 2 Bd Tonnelé, F-37044 Tours Cedex

Telephone: +33 2 47 47 98 17, fax: +33 2 47 47 60 15

email: regis.hankard@inserm.fr

ABSTRACT

Protein-energy malnutrition (PEM) is poorly reported in Cri du Chat syndrome (CCS) (OMIM #123450), a genetic disease that causes developmental delay and global growth retardation. The objective was to determine the nutritional status at different ages in children with CCS and factors associated with PEM. A questionnaire focused on growth and nutritional care was sent to 190 families. Among 36 analyzable questionnaires, diagnosis compatible with PEM occurred in 47% of patients: 19% before 6 months of age, 24% between 6 to 12 months and 34% after 12 months. Enteral feeding was achieved in 22% of patients. Speech therapy for swallowing education was performed more often in malnourished children (63 vs. 22%, $p<0.02$). PEM is frequent and occurs early in this disease, requiring closed nutritional monitoring.

Key words: cri-du-chat syndrome; growth; protein-energy malnutrition; child

INTRODUCTION

The Cri du Chat syndrome (CCS) is a rare orphan genetic disease, caused by deletion of the short arm of chromosome 5 (5p-). The incidence is evaluated from 1:15,000 to 1:50,000 liveborn children [Cerruti-Mainardi, 2006]. Eighty-five to 90% of patients are de novo mutations. Diagnosis notably lays on a characteristic cry (cat-like cry) in the first months of life, microcephaly, intrauterine growth restriction (IUGR), round face and hypotonia [Marinescu et al., 2000]. Growth restriction is constant and present at birth. Neonatal respiratory and food intake trouble associated to swallowing disorders may be present. Severe psychomotor retardation is constant, beginning in the first months of life. Early diagnosis and environment education improve the prognosis. Treatment is only symptomatic and requires nutritional assessment and nutritional support if needed. Nutritional care may include mixed diet, enteral feeding, speech therapy improving swallowing disorders and constipation treatment. Specific growth curves (weight, height, and head circumference) have been published. Based on 374 patients from USA, Great Britain and Australia, they show global growth retardation particularly on head circumference [Marinescu et al., 2000; Collins et al., 2001]. Protein-energy malnutrition (PEM) is frequent in this syndrome and nutritional care is inconstant. Impact of nutritional support in CCS is poorly reported. PEM increases morbidity, complication occurrence, hospitalization duration and societal cost [Hecht et al., 2014]. The objective of this questionnaire based retrospective study was to determine the nutritional status of children with CCS at different ages and factors associated with PEM.

METHODS

Population. Patients were recruited through the Valentin APAC association (association of chromosomal abnormalities carriers), which sent by mail questionnaires to 190

families in France, Switzerland, Belgium, Spain, Israel, Canada, Brazil and Peru. Items were medical history, clinical signs of CCS, growth parameters for nutritional status assessment and nutritional care. Investigators have never been in contact with families. The association managed the questionnaires and forwarded them anonymously to investigators.

Data collected. Weight, height, head-circumference were recorded at 1, 2, 4, 6, 9, 18, 24 months, 4 and 6 years. Gender, genetic abnormality, clinical signs of syndrome, feeding problems (food intake insufficiency, swallowing troubles, constipation, gastro-esophageal reflux), onset of feeding problems and type of nutritional care (nutritional support, mixed food needed, vitamins and iron supplementation), associated complications and global care (speech therapy, physiotherapy, psychomotor therapy) were collected.

Diagnostic procedure. Nutritional indices were determined using e-PINUT (www.epinut.fr). The system was developed using FileMaker pro 11 server (Apple, Cupertino, CA, USA), French growth charts [Sempé et al., 1979] and conformed to the French guidelines of the Nutrition Committee of the French Pediatric Society [Hankard et al., 2012]. Body Mass Index (BMI) was expressed in Z-score according to the French references [Rolland-Cachera et al., 1991] and the last weight and height known were defined with specific CCS curves [Marinescu et al., 2000]. IUGR was defined as a birth weight below -2 standard deviation (SD) based on Usher and McLean references [1969]. We calculated Z-scores for weight for height (Z-WFH) [Waterlow et al., 1977], weight for age (Z-WFA) and height for age (Z-HFA) using the French references [Sempé et al., 1979]. Diagnosis compatible with PEM was defined as $Z\text{-WFH} < -2\text{ SD}$ in at least two points separated from 3 months at any time or change of weight growth channeling, clarified as chronic PEM if associated with impact on height channeling. The confirmed diagnosis of PEM would require searching an etiology, history recording, clinical signs of PEM but both latter items were not

available with our study design. Marinescu's specific growth references for children with CSS were used.

Calculation and statistical analysis. BMI Z-score were calculated using LMS regression method: $Z\text{-score} = [(Q/M)L - 1] / LS$ where Q is the observed measurement, M is median BMI by age, S is the coefficient of variation of BMI, and L curve is the skewness of BMI distribution. WFH, height Z-scores were calculated using: $Z\text{-score} = (Q-M)/SD$ where Q is the observed measurement, M the median and SD the standard deviation.

Data were expressed as mean $\pm$ SD. Association between associated factors was tested using t-test. Categorical data were compared using χ^2 test. XLSTAT 2010.2.03 software (Addinsoft, Paris, France) was used for statistical analysis.

Ethics. Since this retrospective report survey merged anonymous data from standard care procedure, it did not require approval by an ethic committee according to the French regulation.

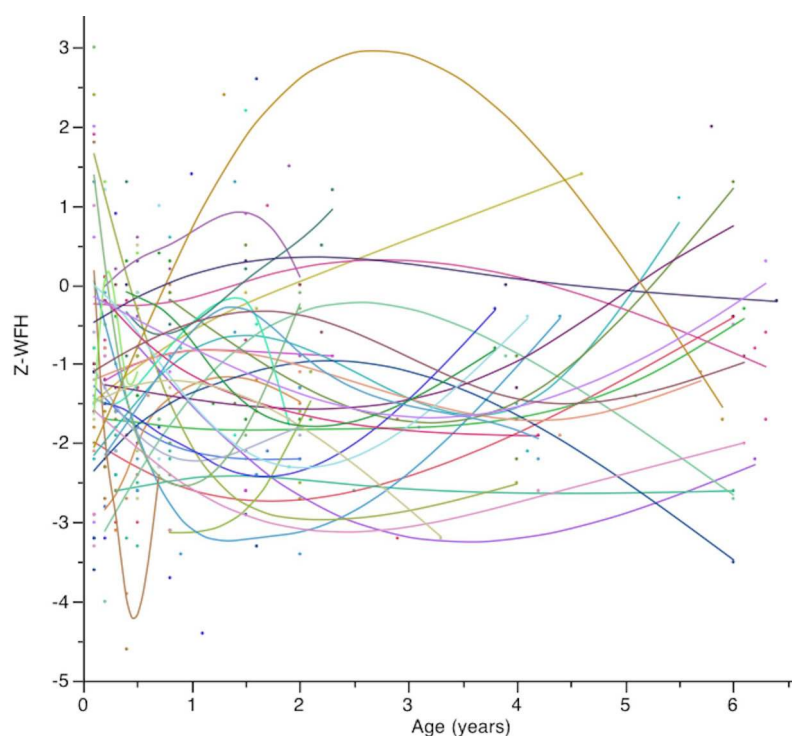
RESULTS

Among 190 questionnaires sent, 44 (23%) were returned to investigators and 36 (19%) were analyzable for growth. All children had karyotype analysis: 31 had 5p- deletion, 2 had t(5;9) translocation, 1 had t(3;11) translocation and 2 results were not communicated.

Patient's characteristics at birth were: mean weight 2471 ± 596 g, mean length 46.2 ± 4.1 cm, mean head circumference 32.0 ± 1.9 cm, mean term of birth 38.4 ± 2.7 weeks of amenorrhea (8 were born preterm) and 7 (19%) children had IUGR. Mean age at the time of the study was 10.5 ± 7.5 years with a mean growth follow-up of 2.9 ± 1.2 years. Mean and IC95 of last data of follow-up were: age 4.4 [2.4;6.4] years, Z-WFA -1.1 [-2.5;0.3], Z-HFA -0.2 [-1.9;1.5], Z-IMC -1.4 [-2.6;-0.2] and Z-WFH -1.3 [-2.4;-0.2]. Weight for age below the lower limit of the distribution (underweight) on the last documented point was present in 11% of the

children using Marinescu's specific references and 28% using French standards (Table 1). Five children had their height below the 5th centile. Four of them had IUGR and were considered malnourished using French references. Nutritional data are presented in Table 1. Diagnosis compatible with PEM was present in 47% of patients (17 children). Nineteen per cent of children were malnourished before 6 month-old, 24% between 6 to 12 months and 34% after 12 months (Figure 1). Diagnosis compatible with PEM was not more frequent in IUGR children (57% vs. 43%, NS). Eleven patients had Z-BMI below -2SD and 10 had Z-WFH below -2 SD. All were classified as children compatible with PEM except one patient with Z-BMI -2.2SD and Z-WFH -1.8SD, while only four children had their weight below the 5th centile using specific Marinescu's references, also detected with standard French references. Figure 2 shows an example of chronic PEM and putting right growth at 27 months i.e. a growth faltering in a patient with change in weight and height channeling, both improving when nutrition became adapted to requirements.

Figure 1: Weight-for-height Z-score variations during growth



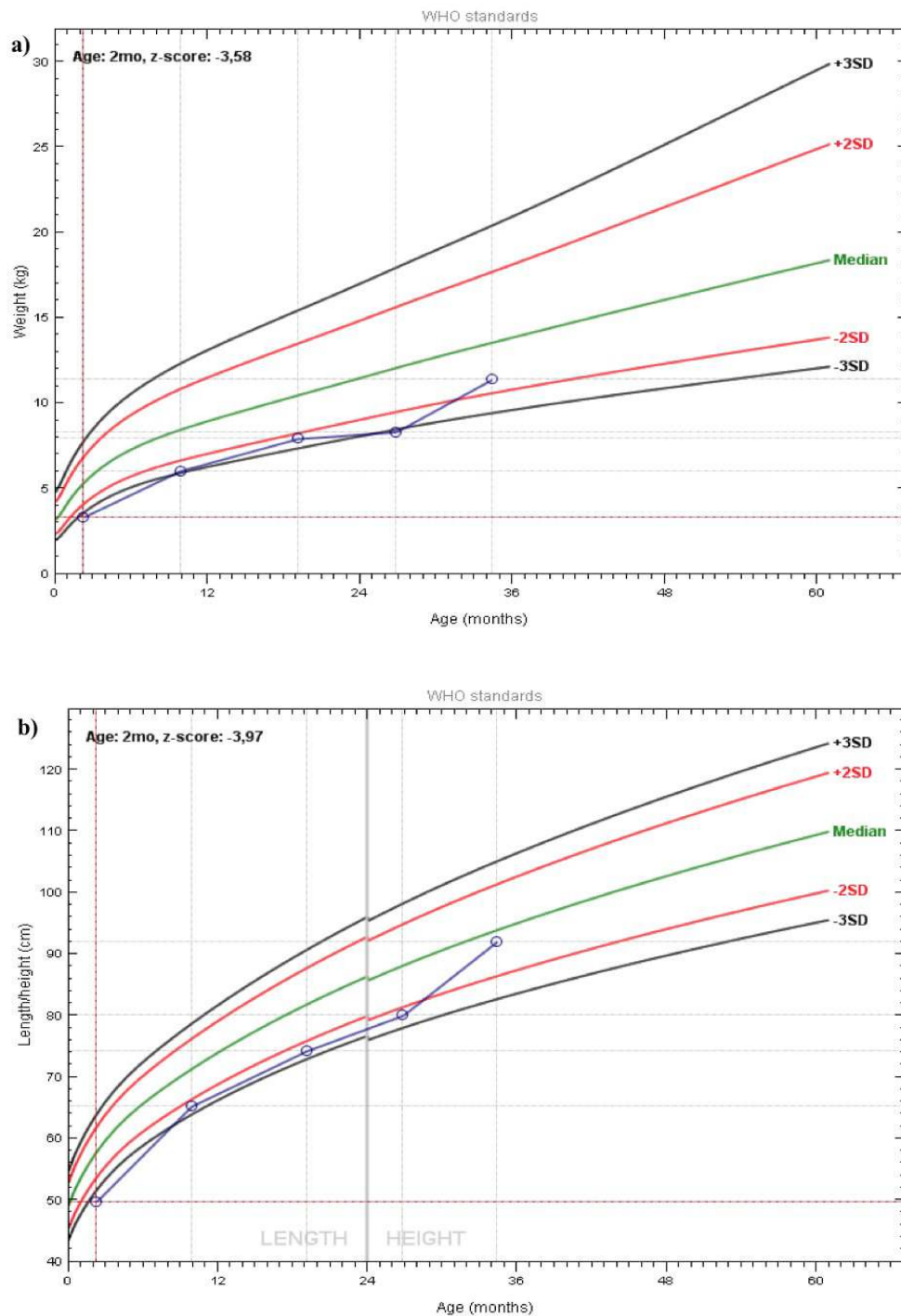
Legend: Z-WFH: weight for height expressed in Z-score using French standards, each color represents a child; curvilinear spline modeling was only performed to show global trend of nutritional status and must not be used as growth modeling in CCS. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552-4833](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-4833).]

Table 1: Nutritional assessment and nutritional care in children with CCS

n = 36	n (%)
Nutritional assessment	
IUGR	7 (19%)
Z-WFH < -2 SD (at anytime)	17 (47%)
Weight below the 5 th percentile using specific reference (last growth point)	4 (11%)
Z-WFA < -2 SD (last growth point)	10 (28%)
Height below the 5 th percentile using specific reference (last growth point)	5 (14%)
Z-HFA < -2 SD (last growth point)	4 (11%)
Nutritional care	
Mixed food	18 (50%)
Iron, vitamins	12 (33%)
Dietary supplements	3 (8%)
Enteral feeding	8 (22%)

IUGR: intrauterine growth restriction, Z-HFA: height for age Z-score, Z-WFA: weight for age Z-score, Z-WFH: weight for height Z-score.

Figure 2 a and b: Example of growth charts (WHO standards) from a patient with change in growth channeling. a) weight chart, b) height chart



Legend: a) weight stagnation between 19 and 27 months and improving after 27 months b) height channel was improved with weight improvement showing a nutritional mechanism.

Among 17 malnourished children with available follow-up, 5 (29%) received enteral nutrition. Among the 19 other children, 3 received enteral nutrition (16%). Enteral feeding was performed starting from birth for 7 children associated with oral supplement in two patients, and at 5 months for one of them. One child had only oral supplement as nutritional support. In the group of malnourished children, no difference of the last Z-HFA was observed between children with or without enteral feeding, respectively -0.9 ± 2.4 SD vs. -0.2 ± 1.6 SD ($p=0.48$) as far as the last Z-WFH, respectively -2.6 ± 0.3 SD vs. -1.7 ± 1.3 SD ($p=0.11$). No correlation was found between PEM and associated signs of the syndrome. Speech therapy for swallowing education was performed in 41% of patients, 63% in malnourished children vs. 22% for others ($p<0,02$); other global treatments were not significantly associated to PEM.

DISCUSSION

The CCS is a rare orphan disease including growth retardation. We showed that the frequency of patients compatible with PEM is high, reaching 47% mainly in the first 6 months of life, from which only one third of patients compatible with PEM had nutritional support. Children compatible with PEM had more speech therapy for swallowing education suggesting that oral sphere is a major cause of PEM in the CCS.

Present survey reported a higher proportion of children with CCS below the 5th centile for weight, height and head-circumference using French standards for growth than using specific Marinescu et al. standards [2000]. This was also the case when specific standards were compared to American standards, the 95th centile of the former being superposed to the 50th centile of the later. This reflects the growth impairment as a sign of the CCS. Specific standards do not provide weight for height chart, which is pivotal to assess the nutritional status. Weight for height charts for standard population may be used after 2 years of age in CCS since both weight and height depart from standards for standard population in a same

fashion. This is more questionable before two years of age since weight appears more impaired than height on Marinescu's specific charts. This discrepancy may reflect the high frequency of diagnoses compatible with PEM in children with CCS observed in present survey. Frequency of PEM in hospitalized children ranges between 10 to 15%, mostly in children with chronic diseases [De Luca et al., 2012; Sissaoui et al., 2013] and is much lower than that observed here. For the day-to-day practice, growth kinetics must be monitored regularly and any change of weight growth channeling may be interpreted as a possible sign of PEM whatever standard is used (Figure 2). Such a situation must lead to thorough clinical examination seeking for clinical signs of malnutrition and possible causes for it. We did not find any correlations between PEM and associated signs of the syndrome. IUGR was also not associated with PEM. This suggests that no associated risk factor for PEM is involved except the syndrome itself.

Enteral feeding was performed in only 1/5 of patients, mostly started from birth. Nutritional status seems to break-up later in life, both in patients with nutritional support or not. This could explain the lack of difference between Z-scores at the end of follow-up for children compatible with PEM or not. To our knowledge, no publication reported the frequency of nutritional support in the CCS preventing any comparison with previous results. We observed more speech therapy in children compatible with PEM. Many factors of the oral sphere are involved in PEM development in the CCS, like facial characteristics, orofacial features, perioral muscle hypotonia, gastroesophageal reflux, teeth alteration (bruxism, acidity, oral hygiene) [Rodríguez-Caballero et al., 2012]. These factors impair oral nutrition and can lead to PEM. Speech therapy for swallowing education can improve most of these factors combined with nutritional support. This highlights the key role of global care in this syndrome.

Our study had some limitations. The number of patients included was relatively weak but relevant considering the incidence of syndrome. According to the French recommendations, the diagnosis of PEM lays on the growth charts (with low indices, growth failure), the history recording, the clinical signs of PEM and the searching of an etiology. The design was retrospective then PEM diagnosis was made only with growth curves declared by families since children were not examined. Self-family report could be another bias. Relevant events (e.g. severe complications) were not recorded to document growth impairment, which may have an impact on growth. Items like digestive or swallowing troubles were only subjective, weakening the reliability of data.

This study shows a high frequency of PEM in the CCS. The nutritional status is difficult to assess in genetic diseases with growth impairment. Our study underlines that regular follow-up of growth is a key factor to assess the nutritional status. The requirement of nutritional support and speech therapy to care for syndrome associated feeding problems must be discussed as soon as possible.

Take home message for the clinical practice: the evaluation of growth is complex in genetic diseases since they often include height dynamics impairment. Whatever standard is used, to monitor the growth response to increased nutritional intake helps to separate the nutrition from the genetic fixed impact of the disease. When looking carefully to growth curve same information may be retrieved when height faltering occurs a few months after weight faltering.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors have no conflicts of interest to report.

We thank all the participating families, Véronique Dujardin and the Valentin APAC association for their help to contact families.

REFERENCES

- Cerruti Mainardi P. Cri du Chat syndrome. 2006. *Orphanet J Rare Dis* 1:33.
- Collins MS, Eaton-Evans J. 2001. Growth study of cri du chat syndrome. *Arch Dis Child* 85:337-338.
- De Luca A, Piloquet H, Mansilla M, Simon D, Fischbach M, Caldari D, Dorigny B, Ingrand P, Hankard R. 2012. [Multicenter nutritional screening in hospitalized children]. *Arch Pediatr* 19:545-546.
- Hankard R, Colomb V, Piloquet H, Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP, Darmaun D, Dupont C, Frelut ML, Girardet JP, Goulet O, Rieu D, Simeoni U, Turck D, Vidailhet M. 2012. Malnutrition screening in clinical practice. *Arch Pediatr* 19:1110-1117.
- Hecht C, Weber M, Grote V, Daskalou E, Dell'era L, Flynn D, Gerasimidis K, Gottrand F, Hartman C, Hulst J, Joosten K, Karagiozoglou-Lampoudi T, Koetse HA, Kolaček S, Książyk J, Niseteo T, Olszewska K, Pavesi P, Piwowarczyk A, Rousseaux J, Shamir R, Sullivan PB, Szajewska H, Vernon-Roberts A, Koletzko B. 2014. Disease associated malnutrition correlates with length of hospital stay in children. *Clin Nutr*. doi: 10.1016/j.clnu.2014.01.003.
- Marinescu RC, Mainardi PC, Collins MR, Kouahou M, Coucourde G, Pastore G, Eaton-Evans J, Overhauser J. 2000. Growth charts for cri-du-chat syndrome: an international collaborative study. *Am J Med Genet* 94:153-162.
- Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Yáñez-Vico RM, Gutiérrez-Pérez JL, Machuca-Portillo G. 2012. Assessment of orofacial characteristics and oral pathology associated with cri-du-chat syndrome. *Oral Dis* 18:191-197.
- Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempé M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. 1991. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 45:13-21.

- Sempé M, Pédrón G, Roy-Pernot MP. 1979. Auxologie : méthodes et séquences. Paris: Théraplix. 205p.
- Sissaoui S, De Luca A, Piloquet H, Guimber D, Colomb V, Peretti N, Bouniol A, Breton A, Chouraqui JP, Coste ME, Djeddi D, Dorigny B, Goulet O, Gottrand F, Hermouet P, Lambe C, Leke A, Leprince S, Mas E, Massicot P, Renard P, Thomassin N, Triolo V, Turquet A, Vanrenterghem A, Fischbach M, Ingrand P, Hankard R. 2013. Large scale nutritional status assessment in pediatric hospitals. *e-SPEN Journal* 8:e68-e72.
- Usher R, McLean F. 1969. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr* 74:901-910.
- Waterlow JC, Buzina R, Keller W, Lane JM, Nichaman MZ, Tanner JM. 1977. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bull World Health Organ* 55:489-498.

3. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux suggère que la mesure de l'AIN en ^{15}N dans les tissus est un bio-marqueur du renouvellement protéique car :

- il est plus élevé chez le nouveau-né que chez sa mère ce qui peut traduire le renouvellement protéique intense du fœtus chez le nouveau-né
- il suit la progression de l'insuffisance rénale chez l'adulte atteint de diabète de type 2
- il est altéré dès la naissance chez les souriceaux issus de mères soumises à une restriction protéique
- il reste altéré dans ce dernier modèle malgré une alimentation normale ce qui suggère l'importance du métabolisme comme déterminant de la mesure

La dénutrition protéino-énergétique est présente chez 10% des enfants hospitalisés. Le diagnostic de cette dénutrition reste difficile et principalement basé sur la clinique en l'absence de bio-marqueur adapté.

Les perspectives de ce travail sont :

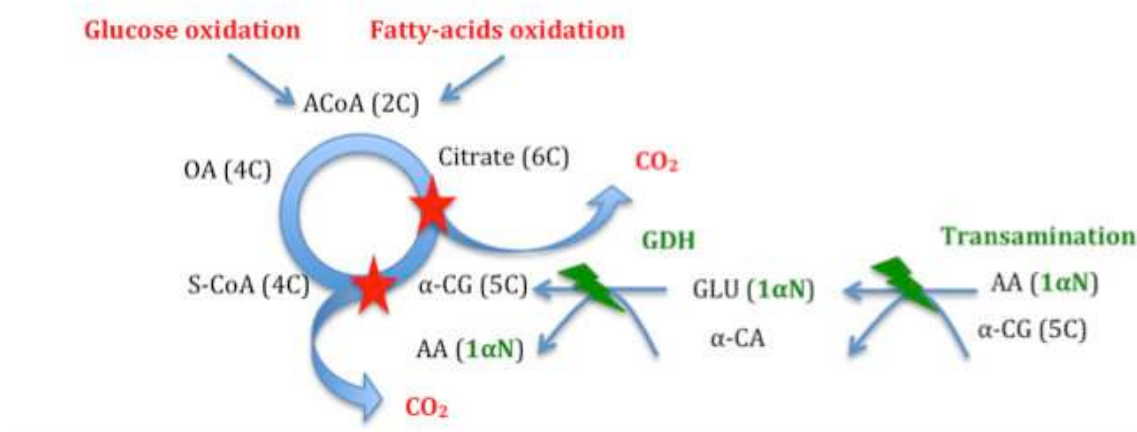
- 1) de mieux comprendre les mécanismes à l'origine d'un effet isotopique et les enzymes responsables de cet effet (AO Cancéropôle Grand-Ouest 2014)
- 2) de tester la mesure de l'AIN en ^{15}N comme bio-marqueur de la dénutrition protéino-énergétique (PHRC national 2014)
- 3) de poursuivre la promotion de l'évaluation nutritionnelle systématique en milieu hospitalier en passant à une échelle Européenne chez l'enfant.

L'ensemble de ces projets s'inscrit dans mon projet professionnel au sein de l'Unité Mobile de Nutrition Clinique au CHU de Tours. Ce projet permettra d'associer à l'expertise clinique une approche translationnelle via l'U 1069 « Nutrition, croissance, cancer » et clinique via le CIC du CHU de Tours et le laboratoire d'explorations nutritionnelles.

Comprendre les mécanismes à l'origine de l'effet isotopique

Plusieurs enzymes potentiellement responsables du fractionnement suscitent notre intérêt, notamment l'isocitrate déshydrogénase (IDH) mitochondriale, l' α -cétoglutarate déshydrogénase (OGDC) ainsi que la glutamate déshydrogénase (GLUD) qui fait le lien entre le métabolisme du carbone et de l'azote, intervenant dans le cycle de Krebs et dans la transamination (Figure 21).

Figure 21 : Sites potentiels d'effet isotopique



Légende : éclair vert : perte d'azote aminé de l' α -cétoglutarate, étoile rouge : perte de carbone dans le cycle de Krebs (dont 1 de l' α -cétoglutarate par l'action de l' α -CG déshydrogénase). AA : acide aminé, ACoA : acétyl-CoA, α -CA : α -cétoacide, α -CG : α -cétoglutarate, CO₂ : dioxyde de carbone, GDH : glutamate déshydrogénase, GLU : glutamate, OA : oxaloacétate, S-CoA : succinyl-CoA.

Nous avons déposé un projet à l'appel d'offre de projets émergents du Cancéropôle Grand-Ouest, dont la lettre d'intention a été acceptée (projet complet en cours de rédaction). Ce projet fondamental vise à explorer les mécanismes responsables de l'effet isotopique sur un modèle de cellules perméabilisées conditionnées à différentes doses de DHA (C22 :6 ω 3, qui augmente la sensibilité tumorale aux anthracyclines) et de modulateurs du métabolisme

oxydatif. Des travaux préliminaires réalisés à l'INSERM U1069 de Tours suggèrent que les différences de métabolisme oxydatif mitochondrial observées entre des cellules cancéreuses mammaires sensibles et celles non sensibles à la doxorubicine induisent un fractionnement isotopique au niveau du carbone, produisant une signature isotopique spécifique des modifications métaboliques. Nous avons également des données préliminaires sur la variation de l'AIN en ^{13}C via le $^{13}\text{CO}_2$ expiré lors d'un effort et lors de l'alimentation, ce qui pourrait être un témoin de l'activité du métabolisme oxydatif. Les fractionnements isotopiques du ^{13}C et ^{15}N pourraient être liés et être le reflet des 3 métabolismes protéique, glucidique et lipidique. Cette étude serait la première étape pour proposer la mesure de l'AIN comme bio-marqueur du métabolisme tumoral et de la réponse aux traitements.

Concernant les expérimentations chez l'animal

Le travail de Master 2 Recherche de Karine Bernardo, que je codirige, portant sur l'impact d'un régime contrôlé en protéines chez la souris est en cours d'analyses. L'exploitation des résultats à J11, J30 et J60 permettra d'apprécier l'évolution dans le temps de l'AIN en ^{15}N à la fin de la phase de croissance intense de la souris, au moment du sevrage et à distance lorsque les souris F1 adultes ont une alimentation identique. D'autres projets sur des modèles animaux cataboliques ou de contrôle complet des apports sont envisagés.

Proposer un bio-marqueur du métabolisme protéique en pratique clinique

Dans la dénutrition protéino-énergétique de l'enfant

Chez l'homme, nous avons déposé un projet au PHRC national (investigateur principal : Pr Régis Hankard) intitulé « La mesure de l'abondance isotopique naturelle en ^{15}N permet-elle de distinguer les enfants hospitalisés dénutris? » qui est en cours d'évaluation (lettre d'intention acceptée, dossier déposé). Ce projet multicentrique (10 centres) porte sur l'analyse

de l'AIN en ^{15}N dans les cheveux, l'urine et le plasma chez des enfants ayant une MPE ou non. Notre objectif est de tester la pertinence de l'AIN en ^{15}N en tant que marqueur de la MPE. Les enfants de 1 mois à 18 ans seront inclus dans les 48h de leur entrée en hospitalisation. Nous prévoyons d'inclure 100 enfants ayant une MPE et de les comparer à 100 enfants témoins sans MPE appariés en âge et en groupe de pathologie. La MPE sera évaluée à l'aide de l'outil e-PINUT. Le recrutement s'appuie sur le réseau HUGOPEREN, regroupant les 6 CHU du grand-Ouest et le réseau e-PINUT issu de nos enquêtes annuelles de dépistage de la MPE chez l'enfant hospitalisé. Ce projet fait le lien entre nos recherches portant sur l'AIN en ^{15}N en tant que bio-marqueur de l'état nutritionnel et les enquêtes de fréquence de la MPE.

Cette approche métabolique est complétée par une étude de l'impact de la dénutrition sur la régulation de l'expression de gènes d'intérêt en nutrition. J'ai effectué une mobilité de 6 mois dans le laboratoire du Dr E Levy, unité Santé Métabolique, Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine à Montréal, Canada. La thématique portait sur l'empreinte épigénétique et le devenir métabolique des survivants de leucémie aiguë lymphoblastique. Nous avons étudié deux groupes de survivants appariés en âge et en sexe et se différenciant par la présence d'un syndrome métabolique. Les analyses ont porté sur la méthylation génétique, les micro ARN et le séquençage des ARN messagers. Seule la partie sur la méthylation a été analysée et montrait que 117 gènes impliqués en nutrition étaient différenciellement méthylés entre les groupes. Ceci suggère une altération du méthylome qui pourrait expliquer les complications à long terme des survivants de leucémie exposés à des traitements agressifs dans l'enfance. Ce travail pourrait conduire à l'établissement de bio-marqueurs de prédiction de la survenue de syndrome métabolique chez les survivants. Par ailleurs, une revue de littérature sur le lien

entre l'épigénétique et la MPE est en cours de soumission. Ces travaux vont être poursuivis et seront la base de collaborations futures.

Dans l'étude de la nutrition et croissance périnatales

Dans l'étude Regulact, une analyse complémentaire de l'AIN en ^{15}N des protéines et de l'urée du lait maternel est en cours, afin d'expliquer la faible AIN en ^{15}N du lait maternel et l'effet trophique important entre le nouveau-né et son alimentation. Nous déposerons un PHRC l'année prochaine portant sur l'étude de l'AIN en ^{15}N des enfants allaités exclusivement dans des situations cliniques plus contrastées.

Un autre travail est en cours chez l'homme portant sur l'analyse de l'AIN en ^{15}N du plasma issu de sang du cordon ombilical de 15 enfants nés à terme ou prématuré, avec ou sans retard de croissance. Les échantillons sont issus d'une étude explorant le stress oxydant (143). Ces prélèvements sont assimilables à la technique de différence artério-veineuse, adaptée au corps entier du fœtus. Nous avons analysé l'AIN en ^{15}N spécifique des AA dans le sang artériel, le sang veineux du cordon ombilical du nouveau-né et le sang maternel. Les résultats sont en cours d'interprétation. Ceci permettra 1) d'observer s'il existe une différence d'AIN en ^{15}N avant et après captation des AA par le fœtus et 2) de comparer ces résultats à leur mère pour corréler nos résultats au métabolisme maternel et apprécier le rôle du placenta dans le passage sélectif des isotopologues des AA.

Dans l'étude du métabolisme protéique dans l'insuffisance rénale

Le travail réalisé chez l'adulte atteint de diabète de type 2 n'a pas permis d'inclure de patients en insuffisance rénale terminale, en dialyse. Cette situation s'accompagne pourtant de modifications majeures de l'état nutritionnel et du métabolisme protéique. La néphrologie

adulte fait partie des services pilotes qui bénéficieront de l'action de l'Unité Mobile de Nutrition clinique. Cette collaboration clinique nous permettra d'établir un suivi des patients dialysés dénutris et de tester l'effet de la nutrition parentérale per-dialytique sur la mesure de l'AIN en bénéficiant d'un contrôle étroit des paramètres de la fonction rénale et du métabolisme acide base. Nous avons un projet d'exploration chez des patients dialysés du service du Pr JM Halimi (Tours) avec le Dr Maud François, qui utilise un dispositif de nutrition per dialytique dans lequel nous pourrions mesurer l'AIN.

Mieux prendre en charge la dénutrition protéino-énergétique de l'enfant hospitalisé

Nos enquêtes cliniques d'évaluation de l'état nutritionnel à l'hôpital sont devenues un événement annuel pour la promotion du dépistage de la MPE à l'hôpital et participent à une meilleure caractérisation du phénotype des enfants dénutris. Depuis 5 ans, chaque enquête a impliqué de plus en plus de centres dans un nombre croissant de pays. Notre objectif est de pérenniser cet événement et de consolider la structuration du réseau e-PINUT. Nous avons débuté l'organisation de l'édition 2015 afin d'intégrer plus de centres en France et à l'étranger. Nous préparons le passage à un événement d'échelle Européenne en collaboration avec l'ESPGHAN (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) sur un modèle de consortium d'investigateurs, ayant pour objectif principal la promotion du dépistage de la MPE à l'hôpital et pour objectif pratique, 100% des enfants hospitalisés pesés et mesurés.

L'outil e-PINUT que nous avons créé a permis l'implémentation d'une base de données conséquente et peut être utilisé pour des projets de recherche spécifiques. Une étude est en cours pour l'établissement de courbes de croissance dans l'amyotrophie spinale infantile (Dr G Letellier, AP-HP Raymond-Poincaré). Nous venons de concevoir des routines pour

l'utilisation du référentiel OMS, utilisé dans de nombreux pays dans le monde. Le système est aussi mis à disposition des cliniciens pour une utilisation en pratique quotidienne.

Ce projet entre dans le cadre des projets Horizon 2020 et pourrait faire l'objet d'un projet Européen une fois le consortium constitué.

CONCLUSION

L'étude de l'AIN en ^{15}N en tant que bio-marqueur du métabolisme protéique est un domaine de recherche innovant, peu exploré et dont le mécanisme commence à être appréhendé. Nos données chez l'homme et chez l'animal suggèrent qu'un phénomène de fractionnement isotopique est modulé par l'intensité du métabolisme. Les caractéristiques de cette nouvelle méthode, sa non invasivité et sa simplicité renforcent le potentiel d'applications cliniques dans des situations diverses (stress, chirurgie, suivi nutritionnel).

Nous allons poursuivre dans cette voie sur des projets fondamentaux en lien avec l'U1069 sur le mécanisme de fractionnement isotopique, l'exploration du métabolisme énergétique par l'étude du ^{13}C , sur des modèles cellulaires et animaux. Des projets cliniques seront explorés comme dans la MPE chez l'enfant (projet PHRC), dans la croissance, dans l'insuffisance rénale. Nous allons développer un vaste projet transversal mêlant notre activité de recherche et de soins afin de mieux phénotyper la MPE (projet Horizon 2020, projet e-PINUT européen).

Mon projet d'activité de soins dans l'Unité Transversale de Nutrition Clinique du CHU de Tours (dès janvier 2015) me permettra de coupler la clinique et la recherche afin de mieux appréhender les mécanismes de la MPE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hankard R, Colomb V, Piloquet H, et al. Malnutrition screening in clinical practice. *Arch Pediatr*. 2012;19:1110-7.
2. Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempé M, et al. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr*. 1991;45:13-21.
3. Joosten KF, Hulst JM. Prevalence of malnutrition in pediatric hospital patients. *Curr Opin Pediatr*. 2008;20:590-6.
4. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:475-82.
5. de Luca A, Barsotti K, Roumy J, Hankard R. Mesure des plis cutanés par échographie haute-fréquence. *Cahiers Nutrition Diététique* 2014. *Cah Nutr Diet*. 2014;49:126-9.
6. Hankard RG, Haymond MW, Darmaun D. Effect of glutamine on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol*. 1996;271:E748-54.
7. Beaufrere B, Putet G, Pachiaudi C, Salle B. Whole body protein turnover measured with ¹³C-leucine and energy expenditure in preterm infants. *Pediatr Res*. 1990;28:147-52.
8. Fomon SJ, Haschke F, Ziegler EE, Nelson SE. Body composition of reference children from birth to age 10 years. *Am J Clin Nutr*. 1982;35:1169-75.
9. Bergström J, Fürst P, Norée LO, Vinnars E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol*. 1974;36:693-7.
10. Cano N, Barnoud D, Schneider SM, et al. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Nourrir l'homme malade*. 3ème éd. Paris : Springer, 2007, 1189p.
11. Patureau-Mirand P, Beaufrère B, Grizard J, et al. Protéines et acides aminés. In : *Apports nutritionnels conseillés*. Martin A. Paris : Tec et Doc. Lavoisier, 2001:37-62.
12. Welle S, Nair KS. Relationship of resting metabolic rate to body composition and protein turnover. *Am J Physiol*. 1990;258:E990-8.

13. Darmaun D. Métabolisme protéique. In: Traité de nutrition clinique de l'adulte. Basdevant A, Laville M, Lerebours E. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 2001:53-62.
14. Darmaun D. Intestin et métabolisme de la glutamine. Med Sci (Paris). 1993;9:884-90.
15. Wolfe RR. Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine. Principles and practice of kinetic analysis. New-York : Wiley-Liss, 1992, 471p.
16. Blommaert EF, Luiken JJ, Meijer AJ. Autophagic proteolysis: control and specificity. Histochem J. 1997;29:365-85.
17. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science. 1996;273:501-3.
18. Attaix D, Taillandier D. The critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle wasting in comparison to lysosomal and Ca^{2+} -dependent systems. Adv Mol Cell Biol. 1998;27:235–66.
19. Carillo S, Pariat M, Jariel-Encontre I, et al. Le catabolisme protéique intracellulaire : une fonction biologique majeure. I: Les mécanismes de dégradation. Medecine/Sciences. 1995;11:723-34.
20. Lecker SH, Mitch WE. Proteolysis by the ubiquitin-proteasome system and kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2011;22:821–4.
21. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev. 2002;82:373-428.
22. Wing SS. Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35:590-605.
23. Lecker SH, Solomon V, Price SR, et al. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. J Clin Invest. 1999;104:1411-20.

24. Garlick PJ, McNurlan MA, Essén P, Wernerman J. Measurement of tissue protein synthesis rates in vivo: a critical analysis of contrasting methods. *Am J Physiol.* 1994;266:E287-97.
25. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 1986;234:364-8.
26. Cynober L. Amino acid metabolism. In : *Encyclopedia of biological chemistry*, volume 1. New-York : Elsevier Inc., 2004:90-5.
27. Darmaun D. In: *La nutrition humaine, la recherche au service de la santé*. Desjeux JF, Hercberg S. Paris : INSERM-Nathan, 1996, 203 p.
28. Barrett EJ, Gusberg R, Ferrannini E, et al. Amino acid and glucose metabolism in the postabsorptive state and following amino acid ingestion in the dog. *Metabolism.* 1986;35:709-17.
29. Darmaun D. Role of nutrients in the regulation of in vivo protein metabolism in humans. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88:92-4.
30. Beaufrère B, Fournier V, Salle B, Putet G. Leucine kinetics in fed low-birth-weight infants: importance of splanchnic tissues. *Am J Physiol.* 1992;263:E214-20.
31. Golden MH, Waterlow JC, Picou D. Protein turnover, synthesis and breakdown before and after recovery from protein-energy malnutrition. *Clin Sci Mol Med.* 1977;53:473-7.
32. Robert JJ, Beaufrere B, Koziat J, et al. Whole body de novo amino acid synthesis in type I (insulin-dependent) diabetes studied with stable isotope-labeled leucine, alanine, and glycine. *Diabetes.* 1985;34:67-73.
33. Beaufrere B, Tessari P, Cattalini M, et al. Apparent decreased oxidation and turnover of leucine during infusion of medium-chain triglycerides. *Am J Physiol.* 1985;249:E175-82.
34. Bailey JW, Miles JM, Haymond MW. Effect of parenteral administration of short-chain triglycerides on leucine metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1993;58:912-6.

35. Beaufrère B, Chassard D, Broussolle C, et al. Effects of D-beta-hydroxybutyrate and long- and medium-chain triglycerides on leucine metabolism in humans. *Am J Physiol.* 1992;262:E268-74.
36. Castellino P, Luzi L, Simonson DC, et al. Effect of insulin and plasma amino acid concentrations on leucine metabolism in man. Role of substrate availability on estimates of whole body protein synthesis. *J Clin Invest.* 1987;80:1784-93.
37. Giordano M, Castellino P, DeFronzo RA. Differential responsiveness of protein synthesis and degradation to amino acid availability in humans. *Diabetes.* 1996;45:393-9.
38. Häussinger D, Roth E, Lang F, Gerok W. Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. *Lancet.* 1993;341:1330-2.
39. Ziegler TR, Young LS, Benfell K, et al. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study. *Ann Intern Med.* 1992;116:821-8.
40. Leverve XM, Caro LH, Plomp PJ, Meijer AJ. Control of proteolysis in perfused rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1987;219:455-8.
41. Cynober L, de Bandt JP, Moinard C. Leucine and citrulline: two major regulators of protein turnover. *World Rev Nutr Diet.* 2013;105:97-105.
42. Souba WW, Pacitti AJ. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *J Parenter Enteral Nutr.* 1992;16:569-78.
43. Mauras N. Growth hormone, insulin-like growth factor I and sex hormones: effects on protein and calcium metabolism. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;88:81-3.
44. Kuhn KS, Schuhmann K, Stehle P, et al. Determination of glutamine in muscle protein facilitates accurate assessment of proteolysis and de novo synthesis-derived endogenous glutamine production. *Am J Clin Nutr.* 1999;70:484-9.

45. Couet C, Fukagawa NK, Matthews DE, et al. Plasma amino acid kinetics during acute states of glucagon deficiency and excess in healthy adults. *Am J Physiol.* 1990;258:E78-85.
46. Miles JM, Nissen SL, Gerich JE, Haymond MW. Effects of epinephrine infusion on leucine and alanine kinetics in humans. *Am J Physiol.* 1984;247:E166-72.
47. Stumvoll M, Meyer C, Perriello G, et al. Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am J Physiol.* 1998;274:E817-26.
48. Cynober L, De Bandt JP, Lim SK, Giboudeau L. Cytokines et métabolisme protéique. *Cah Nutr Diet.* 1992;27:224-8.
49. England BK, Greiber S, Mitch WE, et al. Rat muscle branched-chain ketoacid dehydrogenase activity and mRNAs increase with extracellular acidemia. *Am J Physiol.* 1995;268:C1395-400.
50. Viollet B, Foretz M, Guigas B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol.* 2006;574:41-53.
51. Cooney RN, Kimball SR, Vary TC. Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis: mechanisms and mediators. *Shock.* 1997;7:1-16.
52. Vittorelli A, Gauthier C, Michoudet C, et al. Characteristics of glutamine metabolism in human precision-cut kidney slices: a ¹³C-NMR study. *Biochem J.* 2005;387:825-34.
53. Tizianello A, De Ferrari G, Garibotto G, et al. Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. *J Clin Invest.* 1980;65:1162-73.
54. Pickering WP, Price SR, Bircher G, et al. Nutrition in CAPD: serum bicarbonate and the ubiquitin-proteasome system in muscle. *Kidney Int.* 2002;61:1286-92.

55. Weiner ID, Mitch WE, Sands JM. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014. In press. doi: 10.2215/CJN.10311013.
56. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev*. 1990;70:701-48.
57. Walser M. Determinants of ureagenesis, with particular reference to renal failure. *Kidney Int*. 1980;17:709-21.
58. Patterson BW, Carraro F, Klein S, Wolfe RR. Quantification of incorporation of [¹⁵N]ammonia into plasma amino acids and urea. *Am J Physiol*. 1995;269:E508-15.
59. Hibbert JM, Forrester T, Jackson AA. Urea kinetics: comparison of oral and intravenous dose regimens. *Eur J Clin Nutr*. 1992;46:405-9.
60. Curis E, Nicolis I, Moinard C, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*. 2005;29:177-205.
61. Busque SM, Wagner CA. Potassium restriction, high protein intake, and metabolic acidosis increase expression of the glutamine transporter SNAT3 (Slc38a3) in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297:F440–50.
62. De Bandt JP, Cynober L, Ballet F, et al. Amino acid metabolism in isolated perfused rat liver. *J Surg Res*. 1990;49:8-13.
63. Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, et al. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am J Clin Nutr*. 1983;37:478-94.
64. Matthews DE, Motil KJ, Rohrbaugh DK, et al. Measurement of leucine metabolism in man from a primed, continuous infusion of L-[1-¹³C]leucine. *Am J Physiol*. 1980;238:E473-9.
65. Boirie Y, Gachon P, Corny S, et al. Acute postprandial changes in leucine metabolism as assessed with an intrinsically labeled milk protein. *Am J Physiol*. 1996;271:E1083-91.

66. Picou D, Taylor-Roberts T. The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. *Clin Sci*. 1969;36:283-96.
67. Garlick PJ, Wernerman J, McNurlan MA, et al. Measurement of the rate of protein synthesis in muscle of postabsorptive young men by injection of a 'flooding dose' of [1-¹³C]leucine. *Clin Sci (Lond)*. 1989;77:329-36.
68. Rennie MJ, Millward DJ. 3-Methylhistidine excretion and the urinary 3-methylhistidine/creatinine ratio are poor indicators of skeletal muscle protein breakdown. *Clin Sci (Lond)*. 1983;65:217-25.
69. Ballard FJ, Tomas FM. 3-Methylhistidine as a measure of skeletal muscle protein breakdown in human subjects: the case for its continued use. *Clin Sci (Lond)*. 1983;65:209-15.
70. Tuvdendorj D, Chinkes DL, Herndon DN, et al. A novel stable isotope tracer method to measure muscle protein fractional breakdown rate during a physiological non-steady-state condition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304:E623-30.
71. Macko SA, Lubec G, Teschler-Nicola M, et al. The Ice Man's diet as reflected by the stable nitrogen and carbon isotopic composition of his hair. *FASEB J*. 1999;13:559-62.
72. Bocherens H, Billiou D, Mariotti A, et al. New isotopic evidence for dietary habits of Neandertals from Belgium. *J Hum Evol*. 2001;40:497-505.
73. Richards MP. A brief review of the archaeological evidence for Palaeolithic and Neolithic subsistence. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:1270-8.
74. Petzke KJ, Boeing H, Klaus S, Metges CC. Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *J Nutr*. 2005;135:1515-20.

75. Deniro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta*. 1981;45:341-51.
76. Fuller BT, Fuller JL, Harris DA, Hedges RE. Detection of breastfeeding and weaning in modern human infants with carbon and nitrogen stable isotope ratios. *Am J Phys Anthropol*. 2006;129:279-93.
77. Herrscher E. Comportements socioculturels liés à l'allaitement et au sevrage: le cas d'une population grenobloise sous l'Ancien Régime. *Ann Fyssen*. 2005;20:46-66.
78. O'Connell TC, Hedges RE. Investigations into the effect of diet on modern human hair isotopic values. *Am J Phys Anthropol*. 1999;108:409-25.
79. Petzke KJ, Boeing H, Metges CC. Choice of dietary protein of vegetarians and omnivores is reflected in their hair protein ^{13}C and ^{15}N abundance. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19:1392-400.
80. Petzke KJ, Lemke S. Hair protein and amino acid ^{13}C and ^{15}N abundances take more than 4 weeks to clearly prove influences of animal protein intake in young women with a habitual daily protein consumption of more than 1 g per kg body weight. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009;23:2411-20.
81. Ogrinc N, Kosir IJ, Spangenberg JE, Kidric J. The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. *Anal Bioanal Chem*. 2003;376:424-30.
82. Kaminski ZJ, Paneth P, O'Leary MH. Nitrogen kinetic isotope effects on the acylation of aniline. *J Org Chem*. 1991;56:5716-8.
83. Macko SA, Fogel M, Engel MH, Hare PE. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta*. 1986;50:2143-6.

84. Rishavy MA, Cleland WW. ^{13}C and ^{15}N kinetic isotope effects on the reaction of aspartate aminotransferase and the tyrosine-225 to phenylalanine mutant. *Biochemistry*. 2000;39:7546-51.
85. Wright SK, Rishavy MA, Cleland WW. ^2H , ^{13}C , and ^{15}N kinetic isotope effects on the reaction of the ammonia-rescued K258A mutant of aspartate aminotransferase. *Biochemistry*. 2003;42:8369-76.
86. Sick H, Roos N, Saggau E, et al. Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. *Z Ernahrungswiss*. 1997;36:340-6.
87. Balter V, Simon L, Fouillet H, Lécuyer C. Box-modeling of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in mammals. *Oecologia*. 2006;147:212–22.
88. Gannes LZ, del Rio CM, Koch P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol*. 1998;119:725-37.
89. Seila AC, Okuda K, Nunez S, et al. Kinetic isotope effect analysis of the ribosomal peptidyl transferase reaction. *Biochemistry*. 2005;44:4018-27.
90. Silfer JA, Engel MH, Macko SA. Kinetic fractionation of stable carbon and nitrogen isotopes during peptide-bond hydrolysis – experimental evidence and geochemical implications. *Chem Geol*. 1992;101:211–21.
91. Snider MJ, Reinhardt L, Wolfenden R, Cleland WW. ^{15}N kinetic isotope effects on uncatalyzed and enzymatic deamination of cytidine. *Biochemistry*. 2002;41:415-21.
92. Rishavy MA, Cleland WW, Lusty CJ. ^{15}N isotope effects in glutamine hydrolysis catalyzed by carbamyl phosphate synthetase: evidence for a tetrahedral intermediate in the mechanism. *Biochemistry*. 2000;39:7309-15.

93. Tcherkez G. Natural $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ isotope composition in C-3 leaves: are enzymatic isotope effects informative for predicting the ^{15}N -abundance in key metabolites? *Funct Plant Biol.* 2011;38:1-12.
94. Hill S, Hirano K, Shmanai VV, et al. Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect yeast cells from oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:130–8.
95. Hill H, Lamberson CR, Xu L, et al. Small amounts of isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids suppress lipid autoxidation. *Free Radic Biol Med.* 2012;53:893–906.
96. Arneson LS, MacAvoy SE. Carbon, nitrogen, and sulfur diet-tissue discrimination in mouse tissues. *Can J Zool.* 2005;83:989-95.
97. Poupin N, Huneau JF, Mariotti F, et al. Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;304:R218-31.
98. Poupin N, Bos C, Mariotti F, et al. The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet ^{15}N discrimination factors in laboratory rats. *PLoS One.* 2011;6:e28046.
99. Braun A, Vikari A, Windisch W, Auerswald K. Transamination governs nitrogen isotope heterogeneity of amino acids in rats. *J Agric Food Chem.* 2014;62:8008-13.
100. Poupin N, Mariotti F, Huneau JF, et al. Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: a compartmental model analysis. *PLOS Comp Biol.* 2014;10:e1003865.
101. Tea I, Le Guennec A, Frasquet-Darrieux M, et al. Simultaneous determination of natural-abundance $\delta^{15}\text{N}$ values and quantity of individual amino acids in proteins from milk of lactating women and from infant hair using gas chromatography-isotope ratio measurement by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013;27:1345–53.
102. Romek KM, Julien M, Frasquet-Darrieux M, et al. Human baby hair amino acid natural-abundance ^{15}N -isotope values are not related to the ^{15}N -isotope values of amino acids in mother's breast-milk protein. *Amino Acids.* 2013;45:1365-72.

103. Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, Metges CC. Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20:2973–8.
104. Hatch KA, Crawford MA, Kunz AW, et al. An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in hair. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20:3367–73.
105. Mekota AM, Grupe G, Ufer S, Cuntz U. Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20:1604-10.
106. Mekota AM, Grupe G, Ufer S, Cuntz U. Identifying starvation episodes using stable isotopes in hair Forensic approach on serial hair analysis. *Rechtsmedizin*. 2009;19:431-40.
107. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, et al. Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19:2497-506.
108. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, et al. Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18:2889-96.
109. Duggleby SL, Jackson AA. Higher weight at birth is related to decreased maternal amino acid oxidation during pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:852-7.
110. McClelland ISM, Persaud C, Jackson AA. Urea kinetics in healthy women during normal pregnancy. *Br J Nutr*. 1997;77:165-81.
111. Ebling FJ. The biology of hair. *Dermatol Clin*. 1987;5:467-81.
112. Loussouarn G, El Rawadi C, Genain G. Diversity of hair growth profiles. *Int J Dermatol*. 2005;44:S6-9.
113. Ohnemus U, Uenalan M, Inzunza J, et al. The hair follicle as an estrogen target and source. *Endocr Rev*. 2006;27:677-706.
114. Randall VA. Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18:274-85.

115. Foitzik K, Krause K, Conrad F, et al. Human scalp hair follicles are both a target and a source of prolactin, which serves as an autocrine and/or paracrine promoter of apoptosis-driven hair follicle regression. *Am J Pathol.* 2006;168:748-56.
116. Liu JP, Baker J, Perkins AS, et al. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993;75:59-72.
117. Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J Invest Dermatol.* 1994;102:857-61.
118. van Beek N, Bodó E, Kromminga A, et al. Thyroid hormones directly alter human hair follicle functions: anagen prolongation and stimulation of both hair matrix keratinocyte proliferation and hair pigmentation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:4381-8.
119. Johnson AA, Latham MC, Roe DA. The use of changes in hair root morphology in the assessment of protein-calorie malnutrition. *J Invest Dermatol.* 1975;65:311-4.
120. Miller JF, Millar JS, Longstaffe FJ. Carbon- and nitrogen-isotope tissue–diet discrimination and turnover rates in deer mice, *Peromyscus maniculatus*. *Can J Zool.* 2008;86:685–91.
121. Macko SA, Engel MH. Assessment of indigeneity in fossil organic matter: amino acids and stable isotopes. *Phil Trans R Soc Lond.* 1991;333:367–74.
122. Yudkoff M, Ah Mew N, Daikhin Y, et al. Measuring in vivo urea- nesis with stable isotopes. *Mol Genet Metab.* 2010;100:S37-41.
123. Mok E, Multon C, Piguel L, et al. Decreased full breastfeeding, altered practices, perceptions, and infant weight change of prepregnant obese women: a need for extra support. *Pediatrics.* 2008;121:e1319-24.
124. Balagopal P, Bayne E, Sager B, et al. Effect of lifestyle changes on whole-body protein turnover in obese adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27:1250-7.

125. Chevalier S, Burgess SC, Malloy CR, et al. The greater contribution of gluconeogenesis to glucose production in obesity is related to increased whole-body protein catabolism. *Diabetes*. 2006;55:675-81.
126. Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, et al. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J*. 2011;25:3271-8.
127. DeMots RL, Novak JM, Gaines KF, et al. Tissue-diet discrimination factors and turnover of stable carbon and nitrogen isotopes in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Can J Zool*. 2010;88:961-7.
128. Joosten KF, Hulst JM. Malnutrition in pediatric hospital patients: Current issues. *Nutrition*. 2011;27:133-7.
129. Waterlow JC. Anthropometric assessment of malnutrition in children. *Lancet*. 1979;2:250-1.
130. Sermet-Gaudelus I, Poisson-Salomon AS, Colomb V, et al. Simple pediatric nutritional risk score to identify children at risk of malnutrition. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:64-70.
131. Hankard R, Bloch J, Martin P, et al. Etat et risque nutritionnel de l'enfant hospitalisé. *Arch Pediatr*. 2001;8:1203-8.
132. Sullivan PB. Malnutrition in hospitalised children. *Arch Dis Child*. 2010;95:489-90.
133. Marteletti O, Caldari D, Guimber D, et al. Dépistage de la malnutrition chez l'enfant hospitalisé : influence de la structure d'accueil dans la prise en charge. *Arch Pediatr*. 2005;12:1226-31.
134. Joosten KF, Zwart H, Hop WC, Hulst JM. National malnutrition screening days in hospitalised children in The Netherlands. *Arch Dis Child*. 2010;95:141-5.
135. Pawellek I, Dokoupil K, Koletzko B. Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. *Clin Nutr*. 2008;27:72-6.

136. Rice N, Normand C. The cost associated with disease-related malnutrition in Ireland. *Public health nutrition* 2012;15:1966-72.
137. Emond AM, Blair PS, Emmett PM, Drewett RF. Weight faltering in infancy and IQ levels at 8 years in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Pediatrics*. 2007;120:e1051-8.
138. Stevens GA, Finucane MM, Paciorek CJ, et al. Trends in mild, moderate, and severe stunting and underweight, and progress towards MDG 1 in 141 developing countries: a systematic analysis of population representative data. *Lancet*. 2012;380:824-34.
139. Hoddinott J, Behrman JR, Maluccio JA, et al. Adult consequences of growth failure in early childhood. *Am J Clin Nutr*. 2013;98:1170-8.
140. Crookston BT, Schott W, Cueto S, et al. Postinfancy growth, schooling, and cognitive achievement: Young Lives. *Am J Clin Nutr*. 2013;98:1555-63.
141. Mei Z, Grummer-Strawn LM, Pietrobelli A, et al. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:978-85.
142. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ*. 2007;335:194-7.
143. Küster A, Tea I, Ferchaud-Roucher V, et al. Cord blood glutathione depletion in preterm infants: correlation with maternal cysteine depletion. *PLoS One*. 2011;6:e27626.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schématisation du métabolisme protéique corps entier. D'après Attaix et Boirie (10).	8
Figure 2 : Voies métaboliques du catabolisme protéique. D'après Wolfe (15).	12
Figure 3 : La protéolyse par la voie lysosomale. D'après Carillo et al. (19).	13
Figure 4 : La protéolyse par la voie ubiquitine-protéasome. D'après Attaix et Boirie (10)	14
Figure 5 : Echange d'AA inter-organe en phase post-absorptive. D'après Darmaun (27).	16
Figure 6 : Echange d'AA inter-organe en phase post-absorptive. D'après Darmaun (27).	17
Figure 7 : Métabolisme rénal de la glutamine. D'après Baverel et al. (10)	21
Figure 8 : Cycle de l'urée. D'après Wolfe (15).	22
Figure 9 : Modèle de mesure du métabolisme protéique par injection de leucine marquée. D'après Darmaun (13).	26
Figure 10 : Schéma du modèle exploré par la perfusion continue de ^{15}N -glycine. D'après Picou et Taylor-Roberts (66).	28
Figure 11 : Teneurs en ^{15}N selon le type de régime alimentaire. Enrichissement progressif avec un régime de plus en plus carnivore. D'après Petzke et al. (79).	35
Figure 12 : Schéma simplifié du métabolisme protéique végétal montrant les principaux effets isotopiques. D'après Tcherkez (93).	40
Figure 13 : Pool d'AA et transfert d'azote chez les mammifères. Adapté de Braun et al. (99).	42
Figure 14 : Schématisation d'un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse de rapports isotopiques on line. D'après Tea (schéma personnel).	47
Figure 15 : Courbes des moyennes de croissance par groupe.	151
Figure 16 : Comparaison des AIN en ^{15}N à 16 mois selon le groupe d'alimentation	152
Figure 17 : Comparaison des AIN en ^{15}N selon le tissu prélevé et le groupe d'alimentation	153

Figure 18 : Evolution du poids des souriceaux F1 pour chaque groupe.	154
Figure 19 : Prise en charge de la MPE chez l'enfant, du diagnostic au traitement.	160
Figure 20 : Croissance des enquêtes e-PINUT.....	161
Figure 21 : Sites potentiels d'effet isotopique.....	223

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Apports Nutritionnels Conseillés en protéines chez l'enfant et l'adulte selon l'âge (11).	10
Tableau 2 : Etudes de mesure d'AIN en ^{15}N en temps que marqueur métabolique en pathologie humaine	44
Tableau 3 : Mesure de l'AIN en ^{15}N des foies et pattes des souris F1 à J1 et moyennes de l'effet trophique pour le foie.	155
Tableau 4 : Mesure de l'AIN en ^{15}N des poils, foies et muscles gastrocnémiens des souris F0 à J1 et moyennes de l'effet trophique.....	156

ABBREVIATIONS

^{13}C	Carbone 13
$^{13}\text{C}\text{-Leu}$	Leucine marquée au carbone 13
^{14}N	Azote 14
^{15}N	Azote 15
3-MH	3-Méthylhistidine
AA	Acide aminé
AIN	Abondance isotopique naturelle
FSR	Taux de synthèse fractionnaire
irm-MS	Spectrométrie de masse de rapports isotopiques
MPE	Malnutrition protéino-énergétique
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NOLD	Utilisation non oxydative de la leucine (non oxydative leucine disposal)
Ox	Oxydation

RESUME

La malnutrition protéino-énergétique (MPE), de diagnostic clinique, est insuffisamment recherchée à l'hôpital. Depuis 2010, nous avons initié des enquêtes annuelles multicentriques nationales puis internationales qui fixent la fréquence de la MPE chez l'enfant hospitalisé autour de 10%. La gravité de la MPE dépend de son impact sur le métabolisme protéique. Il manque actuellement un biomarqueur simple et fiable de la MPE. La mesure de l'abondance isotopique naturelle (AIN) en ^{15}N dans les protéines totales de phanères est testée comme index du métabolisme protéique. Cette méthode innovante est non invasive et adaptée à la pédiatrie.

Nous avons observé une AIN en ^{15}N des cheveux systématiquement supérieure chez le nouveau-né par rapport à sa mère, alors que les acides aminés proviennent d'une source commune, suggérant un métabolisme protéique différent. Dans la néphropathie diabétique, l'AIN en ^{15}N des cheveux était corrélée aux indices de filtration glomérulaire et donc à l'impact de la maladie sur le métabolisme protéique. Chez la souris, la restriction protéique pendant la gestation et/ou la lactation entraînait une modification de l'AIN en ^{15}N à 16 mois, témoin d'une empreinte nutritionnelle à l'âge adulte.

Nos données chez l'homme et chez l'animal suggèrent un fractionnement isotopique lié au métabolisme protéique. Cette propriété fait de la mesure de l'AIN en ^{15}N un potentiel biomarqueur utile en pratique clinique. Il est nécessaire de poursuivre nos travaux de recherche chez l'animal et sur la cellule pour explorer les mécanismes biochimiques responsables.

Mots clés : Isotopes--Séparation, Malnutrition, Protéines—Métabolisme, Pédiatrie, Spectrométrie de masse

ABSTRACT

Protein-energy malnutrition (PEM) is insufficiently investigated in pediatric wards. Since 2010, we initiated annual national then international multicentric surveys, which evaluated PEM frequency around 10%. PEM diagnosis is clinical and its severity depends on the impact on protein metabolism. It currently lacks a simple and reliable biological marker of PEM. The measurement of the hair bulk ^{15}N natural isotopic abundance (NIA) is assessed as an index of the protein metabolism. This innovative measurement is a non-invasive method, suitable for Pediatrics.

We observed a bulk hair ^{15}N NIA systematically higher in the newborn from its mother, while amino acids come from the same source, suggesting a different protein metabolism. In diabetic nephropathy, bulk hair ^{15}N NIA was correlated to glomerular function indices, and thus to the impact of chronic kidney disease on protein metabolism. In mice, protein restriction during gestation and/or lactation resulted in a modification of bulk hair ^{15}N NIA at 16 months, suggesting a nutritional imprinting in adulthood.

Our data in humans and animals suggest that an isotopic fractionation is linked to protein metabolism. Thus bulk ^{15}N NIA may be a potential useful biomarker in clinical practice. Further researches in animals and cells are needed to explore the biochemical mechanisms of isotope fractionation.

Keywords: Isotopes--Separation, Malnutrition, Proteins--Metabolism, Paediatrics, Mass spectrometry