



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA

Maria Sala-Cirtog

Aimée Chiș

Liviu Tămaș

Mirabela Romanescu

Silvia Stoia

Anda Alexa
Andrei Anghel
Alexandra Bendelic
Diana Bontê
Georgeta Bujor
Ramona Buzatu

Alina Georgescu
Daniela Grecu
Camelia Gurban
Anca Marcu
Cătălin Marian
Diana Nitușcă

Flavia Petrașcu
Corina Samoilă
Felicia Sfrijan
Edward Ședlăman

Coordinateurs: MARILENA DINUȚI, IOAN OVIDIU ȘÎRBU

BIOCHIMIE

1^{re} année, 2^e semestre
NOTES DE LABORATOIRE

GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE
DE LABORATOR

Editura „Victor Babeș”
Timișoara, 2026

Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

<https://www.umft.ro/ro/organizare-evb/>

Director: Prof. univ. dr. SORIN URSONIU

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecție: Prof. univ. dr. ADRIAN VLAD

Referent științific: Prof. univ. dr. BOGDAN TIMAR

© 2026 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-786-627-8

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude au personnel du laboratoire pour son soutien inestimable, son dévouement et son professionnalisme dans la préparation des séances pratiques.

Mirela Antonescu
Paula Ciordas
Cristiane Dragomir
Claudia Koch
Dana Tautzenberger

TABLE DES MATIÈRES

L1. Métabolisme des glucides. Dosage du glucose dans les liquides biologiques. Test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)	5
L2. Métabolisme des glucides. Glycolyse. Voie d'Embden-Meyerhof. Voie des pentoses phosphates. Test de Brewer	15
L3. Métabolisme des glucides. Régulation de la glycémie. Dosage de l'hémoglobine glyquée..	22
L4. Métabolisme des lipides. Dosage des triglycérides. Identification des corps cétoniques dans l'urine	31
L5. Métabolisme des lipides. Lipoprotéines plasmatiques. Dosage du cholestérol total et du cholestérol HDL des lipoprotéines plasmatiques	39
L6. Métabolisme des protéines. Dosage des transaminases	52
L7. Métabolisme des protéines. Métabolisme des acides aminés. Identification des troubles du métabolisme des acides aminés	60
L8. Métabolisme des protéines. Dosage de l'urée.....	70
L9. Métabolisme des protéines. Dosage de la créatinine sérique et urinaire.....	77
L10. Métabolisme des protéines. Dosage de l'hémoglobine et de la bilirubine	83
L11. Métabolisme des acides nucléiques. Dosage de l'acide urique	95
L12. Métabolisme minéral. Détermination du pH. Capacité tampon du sérum. Dosage des ions dans les liquides biologiques	101
L13. Analyse métabolique intégrative. Dosage des paramètres biochimiques à l'aide du système automatique Piccolo Xpress	112
Références	118

L1. MÉTABOLISME DES GLUCIDES. DOSAGE DU GLUCOSE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES. TEST D'HYPERGLYCÉMIE PROVOQUÉE PAR VOIE ORALE (HGPO)

Introduction. Digestion et absorption des glucides

Dans un régime alimentaire adulte typique, les glucides constituent la principale source de carburant métabolique, avec un apport quotidien moyen d'environ 250 à 350 g, représentant approximativement 45 à 65 % de l'apport énergétique total, conformément aux recommandations nutritionnelles. Les glucides alimentaires se répartissent comme suit: 50 % d'amidon, 40 % de saccharose, 5 à 10 % de lactose et une faible proportion d'autres oses. Les glucides alimentaires sont principalement constitués d'amidon et de différents disaccharides, notamment le saccharose et le lactose. Cependant, l'intestin grêle absorbe principalement les glucides sous forme de monosaccharides, principalement le glucose, le galactose et le fructose. Les glucides complexes doivent donc être préalablement digérés afin de libérer ces molécules simples. Il existe deux types d'amylases: *salivaire* (sécrétée par les glandes salivaires) et *pancréatique* (sécrétée par la partie exocrine du pancréas).

La digestion des glucides commence dans la bouche grâce à l' **α -amylase salivaire**. Cette enzyme est produite par les glandes salivaires et commence à hydrolyser les liaisons α -1,4 de l'amidon. Comme les aliments restent relativement peu de temps dans la bouche, l'action de l'amylase salivaire reste limitée. Elle permet néanmoins de former différents produits intermédiaires, notamment du maltose, du maltotriose et des dextrines. Lorsque le bol alimentaire arrive dans l'estomac, l'acidité gastrique diminue progressivement l'activité de l'amylase salivaire. La digestion de l'amidon par cette enzyme s'arrête donc lorsque le contenu gastrique devient suffisamment acide.

En entrant dans le duodénum, les sécrétions pancréatiques contenant l' **α -amylase pancréatique** poursuivent la digestion de l'amidon et du glycogène. Fonctionnant de manière optimale à un pH neutre à légèrement alcalin, l'amylase pancréatique hydrolyse les liaisons glycosidiques α -1,4 internes, générant un mélange de disaccharides et d'oligosaccharides nécessitant un traitement enzymatique supplémentaire.

La digestion finale des glucides a lieu au niveau de la bordure en brosse des entérocytes du jéjunum, où diverses disaccharidases sont exprimées à la surface apicale des cellules épithéliales intestinales. Ici, la **maltase** clive le *maltose* et le maltotriose en glucose, tandis que l'**isomaltase (α -1,6-glucosidase)** cible spécifiquement les liaisons α -1,6 présentes dans les *dextrines α -limites*, achevant la dégradation des polysaccharides ramifiés. La **saccharase (invertase)** hydrolyse le *saccharose* en glucose et fructose, et la **lactase (β -galactosidase)** dégrade le *lactose* en glucose et galactose. Une faible activité de la bêta-galactosidase peut entraîner une intolérance au lait. Les produits de cette digestion terminale, glucose, galactose et fructose, sont ensuite absorbés par les entérocytes grâce à des mécanismes de transport spécifiques.

Absorption et transport

En raison de leur nature hydrophile et de leur taille moléculaire relativement importante, les monosaccharides ne peuvent pas diffuser librement à travers la bicouche lipidique hydrophobe des membranes cellulaires. Leur transport nécessite donc l'intervention de protéines membranaires spécialisées, qui assurent leur passage à l'intérieur et à l'extérieur des cellules en fonction des besoins physiologiques et des exigences tissulaires spécifiques. Le transport du glucose s'effectue à travers différentes barrières épithéliales et cellulaires dans des contextes physiologiques distincts:

- De la lumière intestinale vers les entérocytes (absorption des nutriments dans l'intestin grêle)
- Des entérocytes vers la circulation sanguine (distribution systémique via la circulation porte)
- De la circulation sanguine vers les tissus insulino-dépendants et insulino-indépendants
- De la lumière du tubule rénal vers les cellules du tubule proximal (réabsorption du glucose filtré)

Deux grandes familles de protéines de transport assurent le mouvement du glucose à travers les membranes: les SGLT (Sodium-Glucose Linked Transporters, transporteurs sodium-glucose) et les GLUT (Glucose Transporters, transporteurs du glucose). Elles diffèrent par leur mécanisme, leur directionnalité et leur distribution tissulaire:

- **Transporteurs sodium-glucose liés (SGLT):** également appelés cotransporteurs sodium-dépendants du glucose, les SGLT transportent le glucose contre son gradient de concentration. Ce sont des transporteurs actifs secondaires qui utilisent l'énergie stockée dans le gradient électrochimique des ions Na^+ . Le gradient sodique qui entraîne ce transport est maintenu par la Na^+/K^+ -ATPase de la membrane basolatérale, qui expulse le Na^+ hors de la cellule. Ces transporteurs sont importants dans les tissus épithéliaux où le glucose doit être absorbé ou récupéré à partir de milieux à faible concentration:
 - *Absorption intestinale:* dans les entérocytes de l'intestin grêle, SGLT1 facilite l'absorption active du glucose et du galactose à partir de la lumière intestinale.
 - *Réabsorption rénale:* dans le tube contourné proximal du néphron, SGLT2 et, dans une moindre mesure, SGLT1, récupèrent le glucose filtré à partir de l'urine primitive.
- **Transporteurs spécifiques du glucose (GLUT):** les protéines GLUT assurent la diffusion facilitée du glucose selon son gradient de concentration. Elles sont indépendantes de l'énergie et varient selon leur distribution tissulaire, leur cinétique (valeurs de K_M) et leur régulation, notamment par l'insuline:
 - *GLUT1* ($K_M = 1\text{-}2\text{ mM}$, forte affinité): principalement exprimé dans les globules rouges, le cerveau, les tissus fœtaux et le placenta. Fonctionne efficacement aux concentrations de glucose à jeun; assure la captation basale dans le cerveau et les globules rouges.
 - *GLUT2* ($K_M = 15\text{-}20\text{ mM}$, faible affinité): principalement exprimé dans le foie, les cellules β pancréatiques, le rein et l'intestin. Fonctionne comme un capteur de glucose; actif principalement après les repas, lorsque la glycémie est élevée. Dans les cellules β pancréatiques, il contribue à la régulation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS).
 - *GLUT3* ($K_M = 1\text{ mM}$, très forte affinité): principalement exprimé dans le cerveau et le placenta. Assure un apport constant de glucose aux neurones, même en cas d'hypoglycémie.
 - *GLUT4* ($K_M = 5\text{ mM}$, affinité intermédiaire): principalement exprimé dans le muscle squelettique, le muscle cardiaque et le tissu adipeux. Correspond à la glycémie normale; son activité est régulée par l'insuline et non par le taux de substrat (insulino-dépendant).
 - *GLUT5* ($K_M = 5\text{-}10\text{ mM}$, affinité modérée): principalement exprimé dans l'intestin grêle, les testicules, le rein et le tissu adipeux. Spécifique du fructose et non du glucose; actif après l'ingestion d'aliments riches en fructose.

Ces différences ont d'importantes conséquences physiologiques. Ainsi, la concentration normale de glucose dans le sang (5 mM/L) est égale au K_M du GLUT4 et 4 fois inférieure au K_M du GLUT2. Le transport du glucose se produira donc à capacité maximale dans les cellules possédant le GLUT4, indépendamment de la glycémie et uniquement en fonction du nombre de molécules transporteuses. À l'inverse, dans les cellules possédant le GLUT2, le transport dépendra de la glycémie, se produisant à des vitesses plus élevées en conditions d'hyperglycémie. Dans le diabète de type 2, l'altération de la translocation du GLUT4 entraîne une réduction de la captation du glucose par le muscle squelettique et le tissu adipeux, contribuant à l'insulinorésistance et à l'hyperglycémie.

Dosage du glucose dans les liquides biologiques

Le dosage précis de la glycémie constitue un élément essentiel du diagnostic et de la prise en charge des troubles métaboliques, en particulier du diabète sucré. Plusieurs méthodes de laboratoire permettent de quantifier les concentrations de glucose dans les liquides biologiques, avec des degrés variables de spécificité, de sensibilité et de praticabilité.

- **Méthodes chimiques:** Bien que relativement simples et peu coûteuses, ces méthodes sont moins spécifiques, car elles peuvent réagir avec d'autres sucres réducteurs tels que le galactose ou le fructose.
 - *Méthode colorimétrique à l'ortho-toluidine:* le glucose réagit avec l'ortho-toluidine en milieu acide, formant une base de Schiff de couleur verte.
- **Méthodes enzymatiques:** ce sont actuellement les techniques les plus spécifiques et les plus utilisées pour le dosage du glucose. Ces méthodes reposent sur des réactions enzyme-substrat produisant des composés quantifiables proportionnels à la concentration de glucose:
 - *Méthode à l'hexokinase:* considérée comme la méthode de référence dans les laboratoires cliniques, elle repose sur la phosphorylation du glucose par l'hexokinase pour former du glucose-6-phosphate, qui est ensuite oxydé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, produisant du NADPH.
 - *Méthode à la glucose oxydase:* le glucose est oxydé par la glucose oxydase en gluconolactone (puis en acide gluconique) et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier réagit avec un chromogène en présence de peroxydase, formant un composé coloré dont l'absorbance est mesurée.
 - *Méthode à la glucose déshydrogénase:* moins couramment utilisée, elle repose sur l'oxydation du glucose en gluconolactone par la glucose déshydrogénase, avec réduction concomitante du NAD^+ ou d'un colorant.

Considérations préanalytiques:

Un dosage fiable du glucose nécessite un prélèvement, une manipulation et une conservation méticuleux de l'échantillon afin d'éviter de fausses diminutions dues à la glycolyse. Après le prélèvement, les cellules sanguines et les contaminants bactériens peuvent métaboliser le glucose, entraînant une baisse d'environ 10 mg/dL par heure à température ambiante. Pour prévenir cette dégradation:

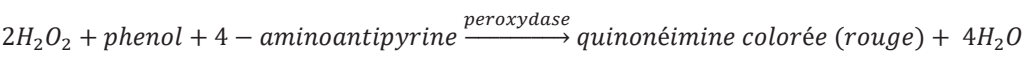
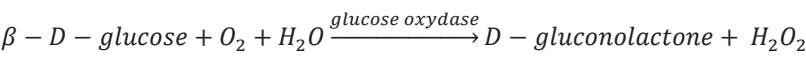
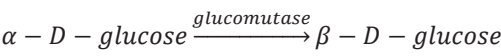
- La séparation immédiate du sérum ou du plasma des cellules sanguines est essentielle. Elle peut être obtenue par centrifugation peu après le prélèvement.
- Si le traitement est retardé, l'échantillon doit être conservé à 4 °C (réfrigération), température à laquelle le glucose reste stable jusqu'à 8 heures.
- Lorsque ni un traitement immédiat ni une réfrigération ne sont possibles, le sang doit être prélevé dans des tubes contenant un inhibiteur de la glycolyse, tel que le fluorure de sodium (NaF) à 1 mg/mL. Le NaF inhibe l'énolase, une enzyme clé de la glycolyse, préservant ainsi les taux de glucose.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage du glucose par la méthode à la glucose oxydase

Principe

La méthode à la glucose oxydase est un dosage enzymatique hautement spécifique et fiable pour la détermination quantitative du glucose dans le sérum ou le plasma. Elle repose sur une réaction enzymatique oxydative en deux étapes impliquant la glucose oxydase et la peroxydase. Dans la première réaction, la glucose oxydase catalyse l'oxydation du D-glucose en D-gluconolactone, réduisant simultanément l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la seconde réaction, la peroxydase utilise le peroxyde d'hydrogène généré pour oxyder la 4-aminoantipyrine en présence de phénol, formant un colorant quinonéimine de couleur rouge. L'intensité de la couleur rouge, proportionnelle à la concentration de glucose dans l'échantillon, est mesurée par spectrophotométrie à 546 nm.



Réactifs

1. Réactif de travail:

- tampon phosphate, 0,5 mol/l, pH 7,50
- phénol, 7,5 mmol/l
- glucose oxydase, 12000 U/l
- peroxydase, 660 U/l
- 4-aminoantipyrine, 0,4 mmol/l

Le réactif est stable 3 mois à 2-8⁰C ou 3 semaines à 20-25⁰C.

2. Étalon glucose, 100 mg%

Procédure

Préparer 3 tubes à essai étiquetés: Échantillon, Étalon et Blanc. Pipeter les réactifs comme suit:

Réactifs, µl	Échantillon	Étalon	Blanc
Réactif de travail	1000	1000	1000
Étalon dilué	-	100	-
Sérum dilué	100	-	-
Eau distillée	-	-	100

Bien mélanger et incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Mesurer l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à λ = 546 nm, en utilisant le blanc pour mettre le spectrophotomètre à zéro. La coloration rouge est stable jusqu'à 60 minutes, et la méthode présente une linéarité pour des concentrations de glucose allant jusqu'à 400 mg/dL.

Calcul

La concentration de glucose dans l'échantillon de sérum est calculée comme suit:

$$\text{glucose}(mg/dL) = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \cdot c_{\text{étalon}} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \cdot 100$$

Sources d'erreur

L'exactitude de la méthode à la glucose oxydase peut être compromise par des substances interférentes:

- Une hémoglobine > 4 g/L, une bilirubine > 200 mg/L, une créatinine > 100 mg/L et un galactose > 1 g/L peuvent entraîner un biais positif ou négatif. L'EDTA (2 g/L) peut inhiber l'activité enzymatique.
- La déprotéinisation à l'acide trichloracétique ou à l'acide perchlorique peut entraîner une lyse érythrocytaire et une libération de glutathion, qui réagit avec le peroxyde d'hydrogène et réduit la formation de couleur, donnant des résultats faussement bas. Agent de déprotéinisation préféré: l'acétate d'uranyle, en solution isotonique, préserve l'intégrité des globules rouges et empêche la libération de glutathion.
- La vitamine C (acide ascorbique) à des concentrations > 5 mg% (généralement d'origine intraveineuse) peut consommer le peroxyde d'hydrogène, entraînant également des résultats faussement diminués. La vitamine C orale ne provoque généralement pas d'interférence.

Valeurs normales

- Sérum, plasma: 75 - 115 mg/100 ml (4,16 - 6,38 mmol/l)

Signification clinique

• Hyperglycémie:

- Physiologique:
 - Hyperglycémie postprandiale: après l'ingestion de repas riches en glucides, la glycémie peut atteindre jusqu'à ~140 mg/dL.
 - Hyperglycémie de stress: déclenchée par un stress physique ou émotionnel aigu (par ex. chirurgie, traumatisme, douleur, anxiété). Les catécholamines et le cortisol sont libérés via l'activation du système nerveux sympathique et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, entraînant une stimulation de la néoglucogenèse et une réduction de la captation périphérique du glucose.
 - À la puberté, l'augmentation de l'hormone de croissance et des stéroïdes sexuels peut élever transitoirement la glycémie à jeun. Pendant la grossesse, des hormones placentaires telles que l'hormone lactogène placentaire humaine (hPL), les œstrogènes et le cortisol exercent des effets anti-insuliniques, augmentant l'insulinorésistance et favorisant une légère hyperglycémie postprandiale. Ceci est physiologique, sauf en cas d'excès (comme dans le diabète gestationnel).
- Pathologique:
 - Diabète sucré: insulinorésistance / déficit en insuline.
 - Troubles endocriniens: syndrome de Cushing (excès de glucocorticoïdes), acromégalie (excès d'hormone de croissance), phéochromocytome (tumeur sécrétant des catécholamines).
 - Troubles pancréatiques: pancréatite chronique, pancréatectomie, carcinome pancréatique.
 - Causes pharmacologiques: glucocorticoïdes, diurétiques thiazidiques, β -agonistes, antipsychotiques et inhibiteurs de protéase.

- **Hypoglycémie:** surdosage en insuline, insulinome (tumeurs sécrétant de l'insuline), consommation excessive d'alcool, syndromes post-gastrectomie ou hypoglycémie réactionnelle.

Dosage du glucose urinaire

Dans des conditions physiologiques normales, les reins réabsorbent efficacement le glucose filtré au niveau des tubes proximaux, de sorte que seules des traces (généralement moins de 350-500 mg/24 heures) apparaissent dans l'urine. Cette élimination urinaire minimale de glucose n'est pas détectable par les méthodes courantes à la bandelette et est considérée comme normale. Les méthodes analytiques utilisées pour la quantification du glucose urinaire sont similaires à celles utilisées pour le sérum ou le plasma.

Le seuil rénal du glucose désigne la concentration plasmatique de glucose à partir de laquelle la capacité de réabsorption des tubules rénaux est saturée et le glucose commence à apparaître dans l'urine. Chez la plupart des individus, ce seuil se situe autour de 180 mg/dL (10 mmol/L). Lorsque la glycémie dépasse cette valeur, les transporteurs responsables de la réabsorption (principalement SGLT2 dans le tube proximal) sont dépassés, entraînant une glycosurie. Il existe cependant une variation individuelle du seuil rénal. Certains individus en bonne santé peuvent excréter du glucose dans l'urine même à des taux glycémiques normaux ou proches de la normale, une affection appelée glycosurie rénale bénigne, due à un seuil rénal inférieur à la moyenne.

- **Glycosurie physiologique:** ces épisodes sont transitoires, cliniquement bénins et disparaissent sans intervention
 - Glycosurie postprandiale: après l'ingestion d'une grande quantité de glucides, en particulier de sucres simples, une hyperglycémie légère et transitoire peut entraîner une excrétion de glucose.
 - Glycosurie de stress: lors d'épisodes de stress émotionnel ou physique aigu, l'hyperglycémie induite par les catécholamines peut dépasser temporairement le seuil rénal, entraînant une glycosurie passagère.
- **Glycosurie pathologique:** la glycosurie persistante est le plus souvent associée au diabète sucré, en particulier lorsque la glycémie est chroniquement élevée. Dans ces cas, le glucose urinaire constitue un reflet qualitatif ou semi-quantitatif d'un mauvais contrôle glycémique, bien qu'il soit considéré comme un marqueur moins précis que la glycémie ou l'HbA1c. Les autres causes de glycosurie pathologique comprennent:
 - Anomalies tubulaires rénales (par ex. syndrome de Fanconi)
 - Grossesse (en raison de l'augmentation de la filtration glomérulaire et de l'altération de la gestion tubulaire)
 - Effets médicamenteux (par ex. inhibiteurs du SGLT2)

Test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)

Le test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (également appelé test de tolérance au glucose) est une procédure diagnostique utilisée pour évaluer l'homéostasie du glucose et la capacité de l'organisme à éliminer le glucose de la circulation sanguine après une charge orale de glucose. Il est principalement utilisé pour le diagnostic du diabète sucré, de l'intolérance au glucose, de l'insulinorésistance, et occasionnellement dans l'évaluation de l'hypoglycémie réactionnelle, de l'acromégalie et de troubles rares du métabolisme des glucides.

Indications:

- Individus présentant une glycémie à jeun comprise entre **110-126 mg/dL**, évoquant une glycémie à jeun altérée.
- Patients présentant des facteurs de risque tels qu'obésité, antécédents familiaux positifs de diabète, syndrome métabolique ou risque de diabète gestationnel.
- Suspicion d'hypoglycémie: une version prolongée du test (jusqu'à 5 heures) peut être utilisée pour rechercher une hypoglycémie postprandiale.
- Évaluation de la fonction des cellules β et de la sensibilité à l'insuline dans certaines affections endocriniennes (par ex. acromégalie).

Préparation du patient: la fiabilité du test d'HGPO dépend fortement d'une préparation adéquate du patient. Les protocoles suivants doivent être respectés:

- Pendant au moins 3 jours avant le test, le patient doit consommer un régime riche en glucides (**≥150 g/jour ou 1,75 g/kg de poids corporel**) afin d'assurer une réserve insulinique adéquate.
- Éviter de fumer, tout effort physique et la consommation d'alcool pendant 24 heures.
- Interrompre/reporter les médicaments affectant le métabolisme du glucose (par ex. glucocorticoïdes, β-bloquants, diurétiques, biguanides, antihypertenseurs), sauf contre-indication clinique.
- Jeûner pendant 8 à 14 heures avant le test.

Tests préliminaires avant l'HGPO: avant d'administrer la charge orale de glucose, les paramètres suivants doivent être évalués:

- **Corps cétoniques urinaires:** la présence de cétones suggère un état de carence en glucides (jeûne, maladie récente), invalidant les résultats du test. L'HGPO doit être reportée.
- **Glucose urinaire:** si positif, indique une hyperglycémie préexistante ou un seuil rénal réduit; l'HGPO n'est pas réalisée.
- **Glycémie à jeun:** si la glycémie à jeun dépasse 126 mg/dL, le diabète est déjà établi et l'HGPO est inutile.

Procédure du test: dans la version la plus couramment réalisée du test, une dose standard de glucose est ingérée par voie orale et la glycémie est vérifiée deux heures plus tard:

- Administrer du glucose par voie orale à raison de **1 g/kg de poids corporel**, jusqu'à un maximum de 75 g, dissous dans environ 400 mL d'eau. La solution doit être ingérée en 5 minutes. Étant fortement hypertonique, des nausées ou vomissements peuvent survenir; associer le glucose au maltose peut améliorer la tolérance. Le patient doit rester assis pendant toute la durée du test, car la vidange gastrique est retardée en position couchée.
- Des échantillons sanguins sont prélevés aux moments suivants: Temps 0 (à jeun), 60 minutes après l'ingestion, 120 minutes après l'ingestion. Optionnel: en cas de suspicion d'hypoglycémie, des échantillons supplémentaires sont prélevés à 180, 240 et 300 minutes.
- Un échantillon d'urine est prélevé à la fin du test afin d'évaluer la glycosurie.

De nombreuses variantes de l'HGPO ont été conçues au fil des années à des fins diverses, avec différentes doses standard de glucose, différentes voies d'administration, différents intervalles et durées de prélèvement, ainsi que diverses substances mesurées en plus de la glycémie.

Pour les adultes de moins de 45 ans, avec un IMC normal et sans comorbidités majeures, les résultats doivent être interprétés comme suit:

	Temps 0 (à jeun)	Après 60 minutes	Après 120 minutes
Courbe glycémique normale	75-115 mg/100 ml	<140 mg/100 ml	75-115 mg/100 ml
Tolérance au glucose diminuée	115-126 mg/100ml	140-200 mg/100ml	126-200 mg/100ml
Diabète sucré	>126 mg/100 ml	>200 mg/100 ml	>200 mg/100 ml

Contre-indications à l'HGPO: le test ne doit pas être réalisé dans les conditions cliniques suivantes:

- Diabète sucré connu (diagnostic établi)
- Régimes amaigrissants en cours
- Troubles gastro-intestinaux altérant l'absorption du glucose (maladie cœliaque, résection gastrique)
- Maladies fébriles aiguës
- Dysfonctionnement hépatique (métabolisme du glucose altéré)

Questions

1. Complétez les espaces: la digestion des glucides débute dans la _____ où l'amylase _____ (ptyaline) hydrolyse les liaisons glycosidiques α -1,4 internes de l'amidon. En raison du temps de séjour court et de l'environnement acide, l'amylase salivaire devient inactive dans le/la _____. Dans l'intestin grêle, l'amylase _____ poursuit l'hydrolyse des liaisons α -1,4, produisant du _____, du maltotriose et des dextrines α -limites. Le/la _____ clive le maltose en deux unités de glucose, tandis que le/la _____ (α -1,6-glucosidase) rompt les liaisons α -1,6 des oligosaccharides ramifiés. Le saccharose est hydrolysé par le/la _____ en glucose et _____, tandis que le lactose est hydrolysé par le/la _____ en glucose et _____.

2. Associez chaque transporteur à sa localisation et à sa fonction:

SGLT1	Transporte le fructose dans l'intestin grêle par diffusion facilitée
SGLT2	Cotransport actif du glucose et du sodium dans le tube proximal rénal
GLUT2	Captation du glucose insulino-dépendante dans le muscle et le tissu adipeux
GLUT4	Facilite l'absorption du glucose et du galactose depuis la lumière intestinale
GLUT5	Transporteur du glucose de faible affinité dans les hépatocytes et les cellules β pancréatiques

3. Un patient a récemment reçu de la vitamine C par voie intraveineuse. Vous effectuez un dosage à la glucose oxydase et obtenez un résultat étonnamment bas. Comment pouvez-vous l'expliquer?

4. Énumérez les principales causes physiologiques et pathologiques de l'hyperglycémie.

5. Pourquoi le glucose peut-il apparaître dans l'urine même lorsque la glycémie est inférieure à 180 mg/dL chez certains individus ?

6. Esquissez ou décrivez la courbe glycémique attendue chez un patient diabétique par rapport à un patient non diabétique après une charge orale de glucose (0, 60, 120 min).

7. Pourquoi l'HGPO ne doit-elle pas être réalisée chez un patient présentant de la fièvre ou une maladie gastro-intestinale en cours ?

8. Une patiente de 30 ans ayant des antécédents familiaux de diabète subit une HGPO: à jeun = 120 mg/dL, 60 min = 168 mg/dL, 120 min = 182 mg/dL. Comment interpréteriez-vous ces résultats ? Justifiez votre réponse en vous basant sur les valeurs de référence.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L2. MÉTABOLISME DES GLUCIDES. GLYCOLYSE. VOIE D'EMBDEN-MEYERHOF. VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES. TEST DE BREWER

Glycolyse. Voie d'Embden-Meyerhof

Pour être en mesure de remplir le rôle de substance ergogène, le glucose doit passer par la voie du catabolisme de glycolyse. Cette dégradation du glucose peut se produire en l'absence ou la présence d'oxygène. La version qui a lieu en l'absence d'oxygène, ce qui entraîne la production d'acide lactique, est appelé glycolyse anaérobie. La version de la dégradation en présence d'oxygène fait partie d'un processus plus large – le catabolisme oxydatif complet du glucose. Les deux ont un mécanisme identique, la transformation du glucose en pyruvate, représenté par une série de réactions enzymatiques oxydatives anaérobies, connus sous le nom de **voie d'Embden-Meyerhof**.

En **conditions aérobies**, le pyruvate, produit final de la glycolyse, entre dans les mitochondries où il est converti en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA entre ensuite dans le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs), conduisant à une oxydation complète en CO_2 et H_2O , avec un rendement élevé en ATP grâce à la phosphorylation oxydative. Le NADH généré pendant la glycolyse est réoxydé en NAD^+ dans la chaîne respiratoire mitochondriale, assurant la poursuite de la glycolyse en maintenant l'équilibre redox. L'oxydation aérobie complète du glucose via le cycle de Krebs produit un total d'environ 30-32 ATP.

En **conditions anaérobies**, comme dans le muscle squelettique en exercice ou les tissus à approvisionnement limité en oxygène (par ex. tissus ischémiques), la phosphorylation oxydative est entravée. Pour maintenir la production d'ATP par la glycolyse dans ces conditions, les cellules régénèrent le NAD^+ en réduisant le pyruvate en lactate, une réaction catalysée par le lactate déshydrogénase (LDH). Cette conversion permet à la glycolyse de continuer à produire de l'ATP en l'absence d'oxygène, bien qu'avec une efficacité bien moindre par rapport au métabolisme aérobie. Le rendement net en ATP par molécule de glucose en glycolyse anaérobie est de 2.

Bien que la glycolyse anaérobie soutienne la production d'énergie lors des demandes énergétiques aiguës, l'accumulation de **lactate** peut contribuer à la fatigue musculaire et à l'acidose. Mais le lactate n'est pas un simple déchet. Il peut être exporté des tissus vers la circulation sanguine et capté par le foie, où il entre dans le cycle de Cori, étant reconverti en glucose par néoglucogenèse. Ce recyclage du lactate contribue au maintien de l'homéostasie glucidique lors d'un exercice intense ou d'un jeûne. Dans des états pathologiques tels que le sepsis, le choc ou l'hypoxie, une production excessive de lactate peut entraîner une acidose lactique, un marqueur diagnostique et pronostique important en contexte clinique.

Voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (VPP), également appelée voie du phosphogluconate ou shunt des hexoses monophosphates, est une voie métabolique **non énergétique**. Cette voie métabolique cytosolique fonctionne en parallèle de la glycolyse et représente une voie oxydative alternative pour le catabolisme du glucose-6-phosphate. Bien que la glycolyse et la VPP partagent le glucose-6-phosphate comme intermédiaire commun, les deux voies divergent significativement par leur fonction, leurs produits et leur régulation. Contrairement à la glycolyse, qui utilise le NAD^+ et produit de l'ATP, la VPP emploie le NADP^+ comme accepteur d'électrons et ne produit pas d'ATP. Une caractéristique distinctive de la VPP est la production de CO_2 , un produit absent de la Voie glycolytique.

Les fonctions principales de la VPP sont:

- La génération de **NADPH**, un équivalent réducteur pour les réactions anaboliques (biosynthétiques), la régénération du glutathion et la production d'anion superoxyde.
- La production de **ribose-5-phosphate (R5P)**, essentiel à la synthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques.

Distribution tissulaire

La VPP est présente de manière ubiquitaire dans toutes les cellules, mais présente une activité accrue dans les tissus ayant des besoins importants en NADPH ou en précurseurs nucléotidiques. Le NADPH produit par la VPP sert à:

- Biosynthèse réductrice: de manière générale, les enzymes impliquées dans la biosynthèse réductrice, telles que celles de la synthèse des acides gras et des hormones stéroïdiennes, nécessitent le couple coenzymatique $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, contrairement aux enzymes cataboliques oxydatives qui dépendent du NAD^+/NADH . Par conséquent, les tissus à forte activité anabolique, dont le foie, le tissu adipeux, la corticosurrénale, les testicules et la glande mammaire en lactation, expriment des niveaux élevés d'enzymes de la VPP. Fait notable, jusqu'à 30 % de l'oxydation hépatique du glucose est acheminée par cette voie.
- Détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO): par régénération du glutathion réduit via l'enzyme NADPH-dépendante glutathion réductase.
- Soutien de la défense immunitaire: particulièrement dans les neutrophiles et les macrophages, où le NADPH alimente le complexe NADPH oxydase, générant l'anion superoxyde (O_2^-) lors de l'explosion respiratoire qui détruit les agents pathogènes phagocytés.

Tissu	Fonction principale de la VPP
Foie	Synthèse des acides gras et du cholestérol
Corticosurrénale	Synthèse des hormones stéroïdiennes
Testicules et ovaires	Stéroidogénèse
Glande mammaire (lactation)	Synthèse des acides gras
Tissu adipeux	Synthèse des acides gras
Globules rouges	Maintien du glutathion réduit
Neutrophiles et macrophages	Explosion respiratoire NADPH-dépendante

La VPP peut également fonctionner comme une voie anabolique utilisant les six carbones du glucose pour produire des oses à cinq carbones, en particulier le R5P nécessaire à la biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques. Les cellules à division rapide, notamment les précurseurs hématopoïétiques et les cellules néoplasiques, nécessitent des quantités importantes de R5P et de NADPH pour la synthèse de l'ADN et l'équilibre redox, présentant ainsi une activité accrue de la VPP.

La VPP dans les érythrocytes

Les principales voies métaboliques actives dans les érythrocytes sont la glycolyse anaérobie, la voie des pentoses phosphates (VPP) et le shunt du 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BPG), chacune remplissant des fonctions cellulaires essentielles. La glycolyse constitue la seule source d'ATP des globules rouges, dépourvus de mitochondries, fournissant ainsi l'énergie nécessaire au maintien des gradients ioniques membranaires via des pompes ATP-dépendantes. De plus, la glycolyse produit du NADH, nécessaire à la réduction enzymatique de la méthémoglobine (hémoglobine oxydée, Fe^{3+}) vers sa forme ferreuse fonctionnelle (Fe^{2+}).

La VPP revêt une importance particulière dans les érythrocytes, où elle constitue la seule source de NADPH, essentielle au maintien de l'homéostasie redox par la régénération du *glutathion*. Le glutathion réduit détoxifie les ERO, en particulier le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), grâce à l'action de la glutathion peroxydase, qui convertit le H_2O_2 en eau. Une production insuffisante de NADPH compromet la régénération du glutathion réduit, entraînant des lésions oxydatives des lipides membranaires (par peroxydation lipidique) et de l'hémoglobine, dont les groupements sulfhydryles s'oxydent, formant des agrégats dénaturés et réticulés (corps de Heinz). L'instabilité membranaire qui en résulte prédispose à l'hémolyse.

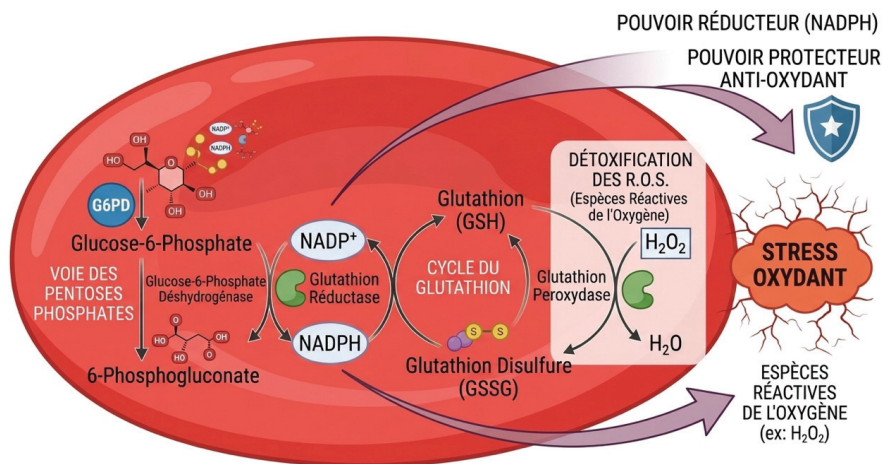


Figure 1. Synthèse du NADPH dans les érythrocytes

Étant donné que la VPP est la source exclusive de NADPH dans les érythrocytes, tout déficit enzymatique, en particulier celui de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), compromet significativement la viabilité cellulaire en cas de stress oxydatif. Le déficit en G6PD, l'enzymopathie la plus fréquente au monde, se manifeste cliniquement par une *anémie hémolytique*, pouvant être déclenchée par des infections, l'ingestion de médicaments oxydants (par ex. primaquine, sulfamides) ou de fèves (favisme). Fait intéressant, le déficit en G6PD confère également une résistance partielle à *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable de la forme la plus sévère du paludisme. Le mécanisme proposé est que les érythrocytes structurellement compromis des sujets déficients en G6PD ne parviennent pas à fournir un environnement stable à la réplication du parasite, entravant ainsi l'achèvement du cycle intraérythrocytaire.

La VPP dans les leucocytes

Les neutrophiles et les macrophages, principales cellules phagocytaires du système immunitaire inné, présentent les niveaux les plus élevés d'activité enzymatique de la VPP. Ici, le NADPH joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte en alimentant le complexe NADPH oxydase, un système enzymatique membranaire qui catalyse la réduction à un électron de l'oxygène moléculaire (O_2) pour former l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).

Le superoxyde généré est ensuite converti en une cascade d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) et l'acide hypochloreux ($HOCl$), qui exercent de puissants effets microbicides. Cette production rapide d'ERO se produit lors d'un état métabolique intense appelé explosion oxydative ou explosion respiratoire, déclenché lors de la phagocytose des agents pathogènes ou de l'exposition à des stimuli inflammatoires. L'explosion oxydative contribue non seulement à la destruction des micro-organismes phagocytés, mais joue également un rôle dans la signalisation et l'inflammation.

Le rôle indispensable du NADPH dans ce processus souligne l'importance immunologique de la VPP, en particulier dans la surveillance immunitaire innée et l'élimination microbienne. Les déficits de production de NADPH, tels que ceux résultant d'un déficit en G6PD ou de mutations des composants du complexe NADPH oxydase (par ex. dans la granulomatose septique chronique), peuvent gravement altérer la production d'ERO et accroître la susceptibilité aux infections récurrentes.

La voie des pentoses phosphates (VPP) se divise en deux phases fonctionnellement distinctes:

- Dans la **phase oxydative**, le glucose-6-phosphate subit des réactions séquentielles de déshydrogénation et de décarboxylation, catalysées par des enzymes telles que la *glucose-6-phosphate déshydrogénase* et la *6-phosphogluconate déshydrogénase*, aboutissant à la production de ribulose-5-phosphate, de CO_2 et de deux molécules de NADPH par molécule de glucose-6-phosphate oxydée. Cette phase est irréversible et sert principalement à générer du NADPH.
- La **phase non oxydative** comprend une série de réactions réversibles d'interconversion de sucres phosphates qui réarrangent les sucres phosphates à cinq carbones produits lors de la phase oxydative en ribose-5-phosphate et autres intermédiaires glycolytiques, tels que le glycéraldéhyde-3-phosphate et le fructose-6-phosphate. Le ribose-5-phosphate sert de précurseur à la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques, tandis que l'érythrose-4-phosphate, un autre produit de cette phase, est essentiel à la biosynthèse des acides aminés aromatiques.

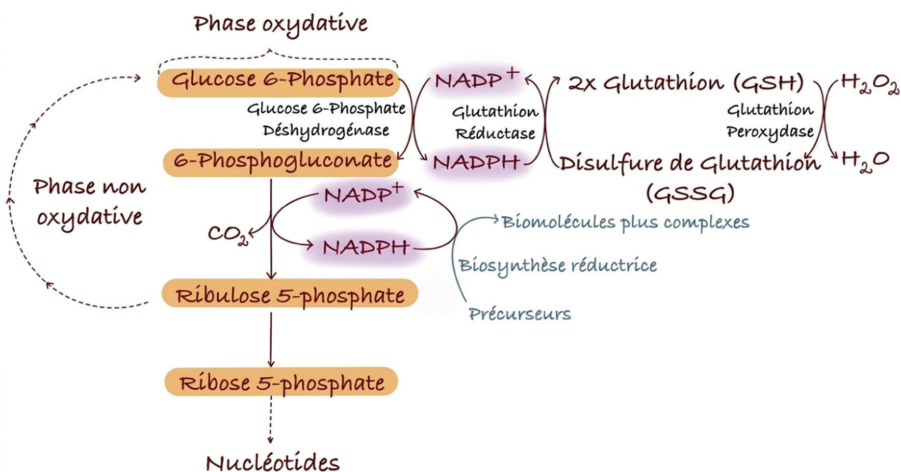


Figure 2. Les phases oxydative et non oxydative de la VPP

Régulation

L'enzyme régulatrice principale de la VPP est la glucose-6-phosphate déshydrogénase, qui catalyse l'étape initiale et limitante de la phase oxydative. Son activité est étroitement contrôlée par le rapport intracellulaire $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Le NADP^+ agit comme un effecteur allostérique positif, stimulant l'activité de la G6PD, tandis que le NADPH exerce une inhibition rétroactive, réduisant ainsi la production de NADPH lorsque les niveaux cellulaires sont suffisants. Dans des conditions physiologiques, en particulier dans les hépatocytes, le rapport $\text{NADPH}:\text{NADP}^+$ est d'environ 100:1, maintenant un environnement intracellulaire fortement réducteur, favorable aux processus anaboliques. De plus, l'acétyl-CoA peut servir de signal métabolique inhibant la voie dans certaines conditions, reflétant une interaction entre le métabolisme des glucides et celui des lipides.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Test de Brewer

Principe

Le test de Brewer est un dosage qualitatif *in vitro* conçu pour évaluer l'intégrité fonctionnelle de la VPP dans les érythrocytes en évaluant la capacité des cellules à réduire la méthémoglobine en hémoglobine fonctionnelle. Ce processus de réduction dépend de la production de NADPH par la VPP, principalement grâce à l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Dans ce test, l'hémoglobine des globules rouges est oxydée par le nitrite de sodium en méthémoglobine, une forme incapable de fixer l'oxygène. Cette transformation est normalement réversible en présence de bleu de méthylène, qui agit comme accepteur d'électrons artificiel et est lui-même réduit par le NADPH. La restauration de l'hémoglobine indique donc une VPP fonctionnelle. À l'inverse, la persistance de méthémoglobine suggère un déficit enzymatique, le plus souvent un défaut en G6PD, altérant la production de NADPH et, par conséquent, la réduction de la méthémoglobine.

Réactifs

1. nitrite de sodium 0,18 M dans du glucose 0,28 M
2. bleu de méthylène 0,0004 M dans NaCl 0,9 %
3. héparine 50 UI / 1 ml de sang

Procédure

- Pipeter les réactifs dans trois tubes à essai comme suit:

Réactif	Tube 1 (témoin)	Tube 2 (témoin)	Tube 3 (échantillon test)
Sang hépariné	2,00 ml	2,00 ml	2,00 ml
Nitrite de sodium	-	0,100 ml	0,100 ml
Bleu de méthylène	-	-	0,100 ml

Mélanger les solutions dans chaque tube à essai et incuber le mélange pendant 3 heures à 37°C.

Interprétation des résultats

- Tube 1 (rouge vif): contient uniquement du sang; sert de référence pour la coloration normale de l'hémoglobine.
- Tube 2 (brun): contient du nitrite de sodium; l'hémoglobine est oxydée en méthémoglobine, entraînant une coloration brune.
- Tube 3: contient du nitrite de sodium et du bleu de méthylène; le résultat est:
 - Coloration rouge (comme T1): indique une production normale de NADPH par la voie des pentoses phosphates - la méthémoglobine est réduite en hémoglobine.
 - Coloration brune (comme T2): suggère un déficit de l'activité enzymatique de la VPP (déficit en G6PD), entraînant une faible production de NADPH et une méthémoglobine persistante.

Signification clinique

Ce test est particulièrement utile pour le dépistage du déficit en G6PD, une enzymopathie fréquente à l'échelle mondiale, en particulier dans les populations d'origine méditerranéenne, africaine ou asiatique. Les sujets présentant un déficit en G6PD sont exposés à un risque accru d'hémolyse oxydative en réponse à certains médicaments (par ex. primaquine, sulfamides), infections ou à l'ingestion de fèves (favisme). Un test de Brewer positif (absence de réduction de la méthémoglobine) conforte le diagnostic et oriente la prise en charge du patient et les stratégies préventives.

Questions

1. Complétez les espaces: la phase oxydative de la VPP débute par la conversion du glucose-6-phosphate en _____, catalysée par l'enzyme _____, et produit une molécule de _____. Le/la _____ est ensuite converti(e) en _____ par l'enzyme 6-phosphogluconate déshydrogénase, libérant une molécule de _____ et générant une autre molécule de _____.
2. Lesquels des éléments suivants constituent des rôles majeurs de la voie des pentoses phosphates ?
 - A. Production d'ATP
 - B. Génération de NADPH
 - C. Synthèse du ribose-5-phosphate
 - D. Soutien de la phosphorylation oxydative
 - E. Fourniture d'intermédiaires pour la biosynthèse des nucléotides
3. Lesquelles des conséquences suivantes découlent directement d'un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase ?
 - A. Réduction de la génération de NADPH
 - B. Risque accru d'anémie hémolytique
 - C. Synthèse accrue des acides gras
 - D. Accumulation de peroxyde d'hydrogène dans les érythrocytes
 - E. Résistance à l'infection par *Plasmodium falciparum*
4. Quelles sont les différences entre la glycolyse aérobie et anaérobie ?
5. Nommez les tissus présentant une activité intense de la voie des pentoses phosphates.
6. Quand le test de Brewer est-il indiqué ?
7. Expliquez l'importance de la voie des pentoses phosphates pour les globules rouges.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L3. MÉTABOLISME DES GLUCIDES. RÉGULATION DE LA GLYCÉMIE. DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

Les glucides (oses, saccharides) constituent la principale source d'énergie métabolique pour les cellules humaines. Parmi ceux-ci, le glucose joue un rôle central en tant que source unique d'énergie pour le système nerveux central et les érythrocytes. Le besoin quotidien en glucose de l'organisme humain est d'environ 250 grammes par jour. Ce besoin est couvert par trois sources:

- **Apport alimentaire:** le glucose est absorbé dans l'intestin grêle après la digestion enzymatique des polysaccharides alimentaires (amidon, glycogène) et des disaccharides (saccharose, lactose, maltose).
- **Glycogénolyse:** la dégradation du glycogène *hépatique* maintient les concentrations plasmatiques de glucose pendant les états de jeûne. Le glycogène *du muscle squelettique*, bien qu'abondant, sert des besoins énergétiques locaux et ne contribue pas directement au glucose circulant en raison de l'absence de glucose-6-phosphatase dans les myocytes.
- **Néoglucogenèse:** la synthèse *hépatique* (et, dans une moindre mesure, *rénale*) de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le lactate, le glycérol et les acides aminés glucoformateurs assure la disponibilité en glucose pendant un jeûne prolongé ou un stress métabolique (déficit en insuline).

Le glucose est une molécule polaire et hydrophile, incapable de diffuser passivement à travers la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Les protéines GLUT assurent donc le transport passif (diffusion facilitée) du glucose selon son gradient de concentration, sans dépense d'ATP. L'expression, la distribution tissulaire et la régulation des isoformes de GLUT déterminent l'efficacité et le contrôle de la captation du glucose dans les différents organes. Certains transporteurs GLUT sont régulés par l'insuline, tandis que d'autres fonctionnent indépendamment de celle-ci:

- **Tissus insulino-dépendants:** le muscle squelettique, le tissu adipeux et le myocarde expriment le GLUT4, dont la translocation vers la membrane plasmique est insulino-dépendante. Ces tissus ont une captation limitée de glucose en l'absence d'insuline.
- **Tissus insulino-indépendants:** le foie (GLUT2), le cerveau (GLUT1, GLUT3), les érythrocytes, les cellules tubulaires rénales, les îlots de Langerhans et la muqueuse intestinale captent le glucose indépendamment de l'insuline.

Régulation de la glycémie

Le maintien de la glycémie dans les limites physiologiques est essentiel à l'homéostasie métabolique et au fonctionnement optimal des tissus glucodépendants tels que le système nerveux central et les érythrocytes. Une régulation étroite est assurée par un système intégré impliquant un ensemble d'hormones aux actions opposées:

- **Hormones hypoglycémiantes:** *l'insuline*. Sécrétée par les cellules bêta pancréatiques, l'insuline abaisse la glycémie en stimulant la captation du glucose par les tissus insulino-dépendants (muscle, tissu adipeux), en favorisant la glycogénèse, la lipogenèse et la synthèse protéique, et en inhibant la néoglucogenèse, la glycogénolyse et la lipolyse.
- **Hormones hyperglycémiantes:** *le glucagon, l'adrénaline* (épinéphrine), *les glucocorticoïdes* (cortisol), *la thyroxine* (T4), *l'hormone de croissance* (somatotropine - STH). Ces hormones s'opposent à l'action de l'insuline, en particulier pendant le jeûne, le stress ou une forte demande énergétique.

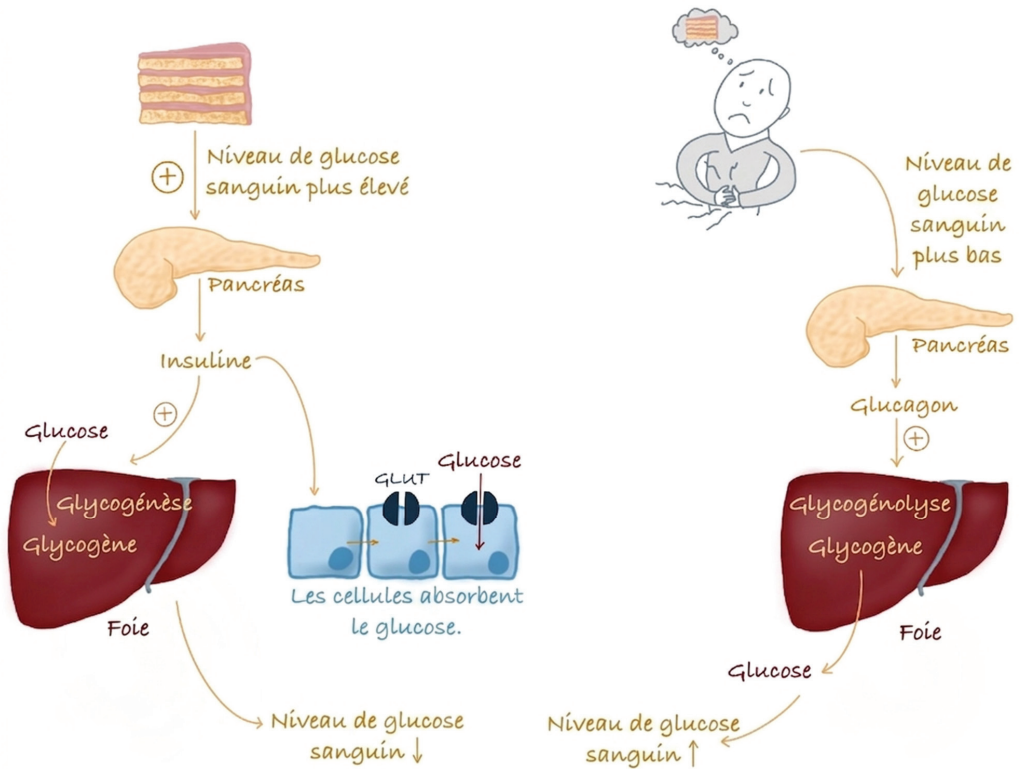


Figure 1. Régulation de la glycémie en phase postprandiale précoce vs tardive

La glycémie n'est pas statique et varie selon les cycles d'alimentation-jeûne. Les mécanismes régulateurs diffèrent entre la phase postprandiale précoce et la phase postprandiale tardive (jeûne):

- **Phase postprandiale précoce** (0-2 heures après le repas): la glycémie augmente => la sécrétion d'insuline est initiée pour abaisser la glycémie:
 - *Utilisation du glucose comme source d'énergie:* l'insuline stimule la translocation de GLUT4 dans le muscle et le tissu adipeux pour la captation du glucose.
 - *Glycogenèse/synthèse du glycogène:* dans le foie et le muscle, l'insuline favorise la conversion du glucose en glycogène. Le glycogène hépatique constitue un tampon pour la glycémie; le glycogène musculaire est réservé à l'usage local.
 - *Lipogenèse:* dans le tissu adipeux et le foie, l'excès de glucose est dérivé vers la synthèse d'acides gras. Ceux-ci sont ensuite estérifiés en triacylglycérols (TAG) pour le stockage.
- **Phase postprandiale tardive** (> 4 heures après le repas): la glycémie diminue => la sécrétion d'insuline est réduite, et les hormones hyperglycémiantes contribuent à l'élévation de la glycémie:
 - *Glycogénolyse:* le glycogène hépatique est dégradé en glucose sous stimulation du glucagon. Le glycogène musculaire, bien qu'abondant, est dépourvu de glucose-6-phosphatase et ne peut donc pas exporter de glucose libre vers la circulation; il sert de source d'énergie locale.

- *Néoglucogenèse*: la synthèse *de novo* de glucose dans le foie (et les reins lors d'un jeûne prolongé) est stimulée à partir du lactate (issu du pyruvate via le cycle de Cori), du glycérol (issu de la lipolyse) et des acides aminés glucoformateurs (issus de la protéolyse).
- *Lipolyse et cétogenèse*: le tissu adipeux, sous l'influence de l'épinéphrine et du cortisol, dégrade les triglycérides en acides gras libres et en glycérol. Le foie oxyde les acides gras pour générer des corps cétoniques (β -hydroxybutyrate, acétoacétate), servant de carburants alternatifs pour les tissus périphériques et pour le cerveau lors d'un jeûne prolongé ou d'une famine.

Diabète sucré

Le trouble le plus fréquent et le plus significatif sur le plan clinique du métabolisme glucidique est le diabète sucré (DS), caractérisé par une hyperglycémie chronique due soit à un déficit absolu en insuline (comme dans le diabète sucré de type 1, DT1), soit à une insulino-résistance relative aboutissant à une défaillance sécrétoire (comme dans le diabète sucré de type 2, DT2). Les principales caractéristiques métaboliques du diabète sucré comprennent:

- **Hyperglycémie**: la glycémie à jeun dépasse 126 mg/dL ou la glycémie aléatoire dépasse 200 mg/dL.
- **Glycosurie**: lorsque la glycémie dépasse le seuil rénal (~180 mg/dL), le glucose filtré dépasse la capacité de réabsorption du tube proximal. Il en résulte une excrétion urinaire de glucose, souvent accompagnée de polyurie, polydipsie et déséquilibre électrolytique.
- **Renforcement des voies cataboliques dans les tissus insulino-dépendants**: la lipolyse est stimulée dans le tissu adipeux, libérant des acides gras libres dans la circulation. La protéolyse est accrue dans le tissu musculaire pour fournir des acides aminés à la néoglucogenèse. La néoglucogenèse augmente, en particulier dans le foie, contribuant davantage à l'hyperglycémie.
- **Acidocétose**: l'augmentation de la lipolyse entraîne une élévation des taux d'acides gras libres, convertis en acétyl-CoA dans le foie. Lorsque l'acétyl-CoA dépasse la capacité du cycle de Krebs (en raison de faibles niveaux d'oxaloacétate), il est dérivé vers la production de corps cétoniques.

Plusieurs tests diagnostiques sont utilisés en pratique clinique pour évaluer l'homéostasie du glucose, diagnostiquer le diabète et surveiller le contrôle glycémique:

- la glycémie à jeun et postprandiale à deux heures
- le test de tolérance au glucose par voie orale
- l'hémoglobine glyquée (HbA1c)

Hémoglobine glyquée (HbA1c)

Le dosage de l'HbA1c joue un rôle central dans l'évaluation et le suivi à long terme du métabolisme du glucose. Contrairement aux mesures ponctuelles de la glycémie, l'HbA1c offre une vision intégrée du statut glycémique chronique sur une période de 2 à 3 mois, correspondant à la durée de vie moyenne des érythrocytes circulants.

L'HbA1c se forme par une **réaction lente et non enzymatique de glycosylation (glycation)** entre le glucose (qui pénètre facilement dans les globules rouges) et le résidu valine N-terminal des chaînes β -globine de l'hémoglobine adulte (HbA).

Le processus de glycation se déroule en deux phases:

1. **Formation d'une base de Schiff labile (aldimine).** Le glucose diffuse librement dans les érythrocytes et réagit avec le groupe amine libre de la valine. La réaction est rapide et réversible, avec un rendement directement dépendant de la concentration ambiante de glucose sanguin. L'aldimine est instable et se dissocie facilement, n'étant donc pas mesurée dans la plupart des dosages standardisés de l'HbA1c.
2. **Réarrangement d'Amadori (cétamine).** En l'espace de plusieurs heures à plusieurs jours, l'aldimine subit un réarrangement d'Amadori spontané. La cétamine résultante est stable et représente l'hémoglobine glyquée (HbA1c). La plupart des méthodes de dosage de l'HbA1c mesurent ce produit glyqué sans inclure la base de Schiff labile, qui est influencée par les variations alimentaires.

Le taux d'HbA1c sanguin est corrélé à la fois avec la **durée de vie de l'hémoglobine** et avec le **taux moyen de glucose sanguin** sur la durée de vie des érythrocytes. Cela signifie qu'une augmentation du taux d'HbA1c peut refléter une glycémie moyenne élevée au cours des 8 à 12 dernières semaines. L'HbA1c constitue donc un biomarqueur rétrospectif de l'exposition chronique au glucose et du contrôle métabolique.

Le dosage de l'HbA1c est un test clé pour ***l'évaluation à long terme*** et le suivi du contrôle glycémique chez les patients atteints de diabète sucré. Il joue également un rôle prédictif dans l'évaluation du risque de complications du diabète, telles que l'acidocétose, la néphropathie et la rétinopathie. Pour améliorer l'interprétabilité clinique, l'HbA1c peut être convertie en une valeur de glycémie moyenne estimée (eAG) à l'aide de la formule suivante:

$$\text{eAG} = \text{glycémie moyenne estimée (mg/dL)} = 28,7 \times \text{HbA1c (\%)} - 46,7$$

HbA1c	eAG	
	mg/dL	mmol/L
6	126	7
6,5	140	7,8
7	154	8,6
7,5	169	9,4
8	183	10,1
8,5	197	10,9
9	212	11,8
9,5	226	12,6
10	240	13,4
11	269	14,9
12	298	16,5

La fréquence du dosage de l'HbA1c dépend du type de DS et de la stabilité du contrôle glycémique:

- Tous les 3-4 mois pour les patients atteints de diabète de type 1 sous traitement conventionnel
- Tous les 1-2 mois pour les patients atteints de diabète de type 1 sous traitement intensif
- Tous les 6 mois pour les patients atteints de diabète de type 2 avec un contrôle glycémique stable
- Tous les 1-2 mois pour les femmes enceintes diabétiques

Avantages de l'HbA1c par rapport au dosage de la glycémie

- Le jeûne n'est pas requis.
- Meilleure stabilité préanalytique.
- Variabilité biologique individuelle plus faible que la glycémie.
- Moins affectée par le stress et les maladies aiguës.

Inconvénients de l'HbA1c par rapport au dosage de la glycémie

- Coût plus élevé par test.
- Disponibilité limitée dans certains laboratoires.
- Absence de corrélation avec la glycémie moyenne chez certains individus (par ex. obésité, hypothyroïdie, anémie hémolytique, néoplasies).
- Non fiable chez les patients présentant un renouvellement anormal des globules rouges (par ex. anémies hémolytiques ou ferriprives); dans ces cas, le diagnostic du diabète doit reposer uniquement sur la glycémie.

Interprétation des résultats

- Une HbA1c élevée indique une hyperglycémie au cours des 2-3 derniers mois.
- Des taux élevés sont retrouvés chez les patients dont le diabète est mal contrôlé ou nouvellement diagnostiqué.
- Le diabète est considéré comme bien contrôlé lorsque l'HbA1c est inférieure à 7 %.
- En cas de mauvais contrôle glycémique, l'HbA1c peut atteindre 20 %.
- L'HbA1c diminue progressivement sur plusieurs mois, à mesure que les globules rouges âgés sont remplacés par de nouveaux globules rouges avec des taux normaux d'hémoglobine glyquée.

Méthodes de dosage de l'HbA1c

- Chromatographie: chromatographie sur colonne échangeuse d'ions, chromatographie d'affinité
- Chromatographie liquide haute performance (HPLC)
- Méthodes électrophorétiques
- Méthodes photométriques (basées sur une réaction colorée avec l'acide thiobarbiturique)
- Méthodes immunologiques
- Méthodes enzymatiques

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage de l'HbA1c - Méthode enzymatique

Principe

Le sang hémolysé est préparé en ajoutant le réactif d'hémolyse (R3) à l'échantillon de sang. Les protéases présentes dans le réactif R1 hydrolysent les protéines de l'échantillon de sang lysé et libèrent ainsi des acides aminés tels que la valine glyquée des chaînes bêta-globine. L'enzyme fructosyl-valine oxydase (R2) agit sur les extrémités N-terminales des valines glyquées et génère du peroxyde d'hydrogène. Celui-ci réagit avec une substance chromogène correspondante en présence de peroxydase de raifort, générant un composé coloré.

Réactifs

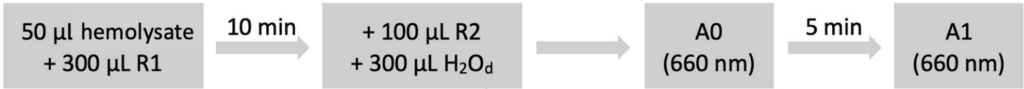
- R1 (tampon) = solution tampon pH = 7; protéases; Triton X-100 (détergent); agents redox.
- R2 (enzyme/chromogène) = fructosyl-valine oxydase (FVO); peroxydase de raifort (POD); substance chromogène.
- R3 (réactif d'hémolyse) = acide cyclohexane-2-aminoéthane sulfonique; Triton X-100; dodécylsulfate de sodium (SDS); agents redox
- R4 (étalons) = C1 (N), %HbA1c = 4,6; C2 (H), %HbA1c = 10,87
- Eau distillée
- Sang prélevé sur EDTA

Matériel et consommables

- Sang hémolysé - 50 µL dans un tube Eppendorf de 0,2 mL
- Réactifs nécessaires - 300 µL R1 et 100 µL R2 dans des tubes Eppendorf de 0,5 mL
- Eau distillée
- Cuvettes spectrophotométriques
- Pipettes automatiques et embouts de pipette

Procédure

1. Préparation du sang hémolysé (déjà préparé !)
 - ajouter 20 µL de sang et 500 µL de R3 dans un tube Eppendorf et bien mélanger en pipetant « de haut en bas »
 - incubé 5 minutes à température ambiante
2. Préparation de l'échantillon test
 - travailler directement dans la cuvette spectrophotométrique
 - ajouter 300 µL de R1 et 50 µL d'hémolysat et bien mélanger en pipetant de haut en bas
 - incubé à température ambiante pendant 10 minutes
 - ajouter 100 µL de R2 et 300 µL d'eau distillée et bien mélanger en pipetant de haut en bas
3. Lecture des absorbances
 - régler le spectrophotomètre à la longueur d'onde $\lambda = 660 \text{ nm}$
 - régler l'absorbance à 0 à l'aide de la solution blanc
 - lire immédiatement l'absorbance initiale de l'échantillon (A0)
 - après 5 minutes, lire l'absorbance finale (A1)

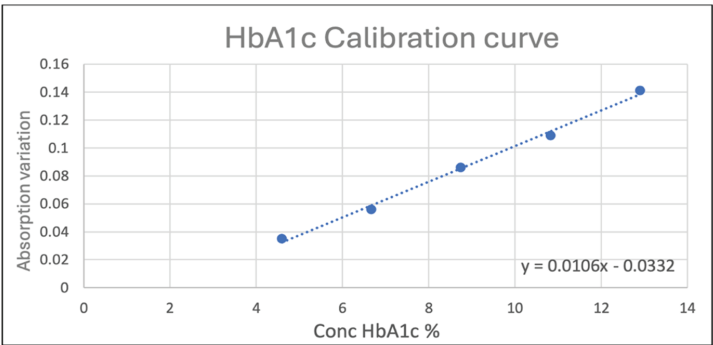


Réactifs (µL)	Échantillon	Blanc
Sang hémolysé	50	-
Eau distillée	-	50
R1	300	300
Bien mélanger et incuber à température ambiante pendant 10 minutes		
R2	100	100
Eau distillée	300	300

Calcul

- calculer la variation d'absorbance, $\Delta A = A1 - A0$
- déterminer la concentration d'HbA1c (%) par extrapolation, en connaissant l'équation de la courbe d'étalonnage tracée au préalable

$\text{Conc HbA1c (\%)} = 94,34 \times \Delta A + 3,13$



Les résultats obtenus avec la présente méthode peuvent être comparés à ceux obtenus par une méthode standardisée certifiée (NGSP) ou à la méthode standardisée de la « Fédération internationale de chimie clinique » (IFCC), à l'aide des formules ci-dessous:

$\% \text{HbA1c-NGSP} = (0,9148 \times \% \text{HbA1c-IFCC}) + 2,152$

$\% \text{HbA1c-NGSP} = (0,09148 \times \text{HbA1c-IFCC (mmol HbA1c/mol Hb)}) + 2,152$

Signification Clinique

	NGSP % (National Glycohemoglobin Standardization Program)	IFCC % (Fédération internationale de chimie clinique)
Normal (sujet sain, non diabétique)	4 - 6	2 – 4,2
Intolérance au glucose	6 – 6,5	4,2 – 4,8
Patients diabétiques avec traitement efficace	6,5 – 8	4,8 – 6,4
Patients diabétiques avec traitement inefficace	> 8	> 6,4

Questions

1. Complétez les espaces: dans la régulation de la glycémie, _____ joue le rôle central dans l'abaissement de la glycémie après un repas en favorisant la captation du glucose par les tissus insulino-dépendants tels que _____ et _____. Cette hormone stimule _____ dans le foie et le muscle et favorise _____ dans le tissu adipeux. À l'inverse, pendant le jeûne ou le stress, des hormones comme le glucagon et le cortisol stimulent des processus tels que _____ et _____ pour restaurer la glycémie.
2. Expliquez pourquoi le glycogène du muscle squelettique ne contribue pas directement au maintien de la glycémie.
3. Énumérez les principales hormones impliquées dans la régulation de la glycémie et classez-les en hypoglycémiantes ou hyperglycémiantes.
4. Quelles sont les adaptations hormonales et métaboliques qui ont lieu en phase postprandiale tardive (jeûne) ?
5. Quelle est la base physiopathologique de l'acidocétose dans le diabète sucré non contrôlé ?
6. Expliquez ce qu'est l'hémoglobine glyquée et comment elle se forme.
7. Donnez deux avantages et deux limites de l'utilisation de l'HbA1c pour surveiller le contrôle du diabète.
8. Un patient a une HbA1c de 9,5 %. Estimez sa glycémie moyenne (eAG) au cours des 2-3 derniers mois.
9. Quel est le rôle de la fructosyl-valine oxydase (FVO) dans le dosage enzymatique de l'HbA1c?
10. Lesquelles des affirmations suivantes concernant l'HbA1c sont VRAIES?
 - A. Elle reflète la glycémie des 2 à 3 derniers jours.
 - B. Elle n'est pas fiable chez les patients atteints d'anémie hémolytique.
 - C. Elle nécessite que le patient soit à jeun.
 - D. Elle se forme par une glycosylation enzymatique de l'hémoglobine.
 - E. Elle a une stabilité analytique élevée

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L4. MÉTABOLISME DES LIPIDES. DOSAGE DES TRIGLYCÉRIDES. IDENTIFICATION DES CORPS CÉTONIQUES DANS L'URINE

Les lipides constituent un groupe hétérogène de biomolécules jouant des rôles essentiels dans le stockage de l'énergie, l'organisation structurale des membranes biologiques et la signalisation cellulaire. En raison de leur densité énergétique élevée, les lipides représentent la forme de stockage d'énergie la plus efficace de l'organisme humain, fournissant environ 9 kcal/g lors de leur oxydation. Les principales classes de lipides d'intérêt biologique comprennent les triglycérides (triacylglycérols), les phospholipides, le cholestérol et les acides gras.

Dans un régime alimentaire typique, les lipides représentent environ 20 à 35 % de l'apport énergétique quotidien total, les triglycérides constituant la forme prédominante. Les lipides étant hydrophobes et insolubles en milieu aqueux, leur digestion et leur absorption nécessitent des mécanismes spécialisés impliquant l'émulsification et l'hydrolyse enzymatique. Ces processus assurent la conversion des molécules lipidiques complexes en unités absorbables pouvant être transportées à travers l'épithélium intestinal.

Digestion et absorption

En raison de leur nature hydrophobe, les lipides alimentaires nécessitent une émulsification et une hydrolyse enzymatique avant leur absorption. La digestion des lipides débute dans l'estomac, où la lipase gastrique amorce l'hydrolyse des triglycérides, bien que cette contribution soit relativement limitée. La phase majeure de la digestion des lipides a lieu dans l'intestin grêle, où les sels biliaires, synthétisés par le foie et stockés dans la vésicule biliaire, émulsifient les grosses gouttelettes lipidiques en particules plus petites, augmentant ainsi la surface accessible aux enzymes digestives.

La lipase pancréatique, avec son cofacteur la colipase, joue un rôle central dans la digestion des triglycérides en hydrolysant les liaisons ester en positions 1 et 3, aboutissant à la formation d'acides gras libres et de 2-monoacylglycérols. D'autres enzymes, dont la phospholipase A₂ et la cholestérol estérase, contribuent respectivement à la digestion des phospholipides et des esters de cholestérol.

Les produits de la digestion des lipides sont incorporés dans des micelles mixtes formées par les sels biliaires, qui facilitent leur transport à travers le milieu aqueux de la lumière intestinale jusqu'à la bordure en brosse des entérocytes. Après absorption, les acides gras et les monoacylglycérols sont réestérifiés dans les entérocytes pour former des triglycérides. Ceux-ci sont ensuite conditionnés avec le cholestérol, les phospholipides et les apolipoprotéines en chylomicrons, sécrétés dans la circulation lymphatique et rejoignant finalement la circulation sanguine, assurant ainsi le transport des lipides alimentaires vers les tissus périphériques.

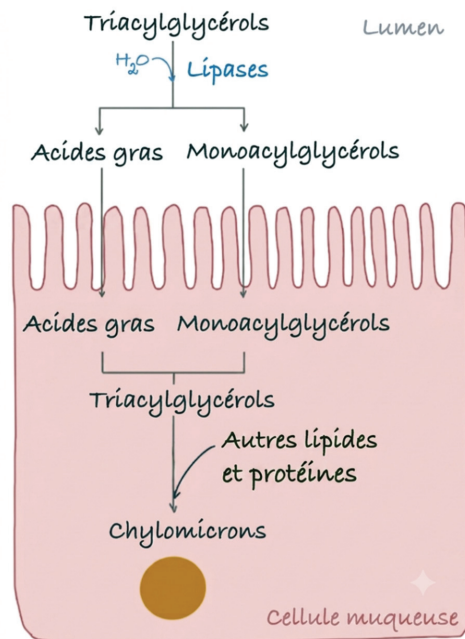


Figure 1. Digestion et absorption des triglycérides

Une fois dans la circulation, les triglycérides contenus dans les chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase située à la surface endothéliale des capillaires, en particulier dans le tissu adipeux et le muscle. Ce processus libère des acides gras libres, captés par les cellules et soit oxydés pour produire de l'énergie, soit réestérifiés et stockés sous forme de triglycérides. Les résidus de chylomicrons sont ensuite captés par le foie.

Le métabolisme lipidique se caractérise par un équilibre dynamique entre le stockage et la mobilisation des lipides, principalement représenté par la lipogenèse et la lipolyse, régulées selon le statut nutritionnel et hormonal de l'organisme.

La lipogenèse représente la voie anabolique par laquelle l'excès d'énergie, principalement issu des glucides, est converti en acides gras puis en triglycérides. Ce processus se déroule principalement dans le foie et le tissu adipeux et est stimulé par l'insuline en période postprandiale. Les acides gras synthétisés sont estérifiés avec du glycérol pour former des triglycérides, stockés dans le tissu adipeux comme réserve énergétique.

À l'inverse, la lipolyse est le processus catabolique par lequel les triglycérides stockés sont hydrolysés en acides gras libres et en glycérol. Ce processus est activé pendant le jeûne, l'activité physique ou le stress, et est stimulé par des hormones telles que le glucagon et les catécholamines, tout en étant inhibé par l'insuline. Les acides gras libres libérés dans la circulation sont transportés liés à l'albumine et utilisés par les tissus périphériques par β -oxydation, tandis que le glycérol est transporté vers le foie, où il participe à la néoglucogenèse ou à la glycolyse.

L'équilibre entre lipogenèse et lipolyse assure le maintien de l'homéostasie énergétique, permettant à l'organisme de s'adapter efficacement aux variations de l'apport et de la demande énergétiques.

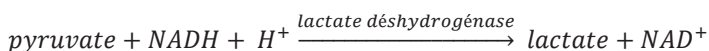
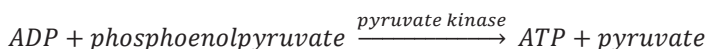
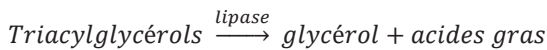
L'interaction dynamique entre l'absorption, le transport, le stockage et la mobilisation des lipides se reflète dans la concentration des lipides circulants, en particulier des triglycérides. Dans des conditions physiologiques, les taux plasmatiques de triglycérides varient selon le statut nutritionnel, la régulation hormonale et les besoins métaboliques. Des altérations de ces processus peuvent entraîner des modifications des concentrations de triglycérides et la production d'intermédiaires métaboliques tels que les corps cétoniques.

L'évaluation de ces paramètres fournit des informations importantes sur le métabolisme lipidique et ses troubles. Ainsi, le dosage des triglycérides plasmatiques et l'identification des corps cétoniques dans les liquides biologiques constituent des méthodes de laboratoire essentielles pour l'évaluation de la fonction métabolique normale et des états pathologiques.

Dosage des triacylglycérols sériques

Le dosage de la concentration sérique ou plasmatique des triacylglycérols est utilisé pour évaluer et diagnostiquer de manière différentielle les hyperlipidémies primaires ou secondaires, et pour évaluer les facteurs de risque de pancréatite aiguë. Les méthodes actuellement utilisées dosent le glycérol issu de la molécule de triacylglycérol, dosage pouvant être réalisé par des méthodes chimiques ou enzymatiques.

La technique à la pyruvate kinase, avec une mesure finale en ultraviolet à 340 nm, comporte la séquence de réactions suivante:



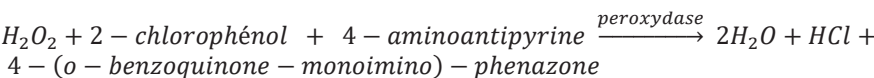
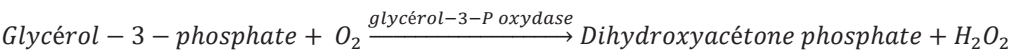
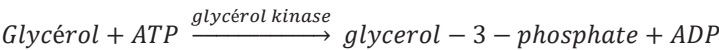
La technique à la glycérol phosphate oxydase est utilisée et détaillée dans la partie expérimentale ci-dessous.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage des triacylglycérols sériques par la méthode enzymatique

Principe

Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement en glycérol et en acides gras libres en présence de lipases spécifiques. Le glycérol réagit ensuite selon le schéma réactionnel suivant:



Procédure

Réactifs (µl)	Échantillon	Étalon	Blanc (Témoin)
Sérum	100	-	-
Étalon (200 mg/dl)	-	100	-
Eau distillée	-	-	100
Mélange réactionnel	1000	1000	1000

Mélanger et incuber 10 minutes à température ambiante. Lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 546 nm, en mettant le spectrophotomètre à zéro sur le blanc.

Calcul

Pour calculer la concentration sérique de triglycérides, utiliser la formule:

$$\text{Triacylglycérol (mg/dl)} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \cdot c_{\text{étalon}} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \cdot 200$$

La linéarité extinction-concentration est observée pour des concentrations allant jusqu'à 800 mg de triglycérides/dl. Pour des concentrations plus élevées, le sérum est dilué de manière appropriée avec de l'eau distillée.

Valeurs normales

Femmes: 40-140 mg%

Hommes: 60-165 mg%

Valeurs pathologiques

- **Augmentation** des taux de triglycérides observée dans les hyperlipoprotéïnémies primaires (sauf le type IIa), le diabète sucré de type 2 (DT2), l'obésité, l'hypothyroïdie, les maladies hépatiques, l'ictère obstructif, le syndrome néphrotique, la pancréatite aiguë, la grossesse, et pendant un traitement par corticostéroïdes ou œstrogènes.
- **Diminution** des valeurs observée dans la malnutrition, les syndromes de malabsorption, l'hyperthyroïdie, la maladie hépatique obstructive chronique, l'anémie sévère et les maladies cachectisantes chroniques. De faibles valeurs peuvent également survenir chez les patients suivant un régime pauvre en graisses ou un traitement hypolipémiant (tel que les fibrates).

Corps cétoniques

La cétonogénèse est un processus métabolique se déroulant dans le foie, où les acides gras et certains acides aminés cétoogènes sont dégradés pour produire des corps cétoniques. Ce processus fournit une source d'énergie alternative, en particulier pendant le jeûne, l'exercice prolongé, la famine ou le déficit en insuline, lorsque la disponibilité en glucose est faible.

Les trois principaux corps cétoniques sont:

- **l'acide acétoacétique (acétoacétate)** - le principal corps cétonique produit dans le foie
- **l'acide β -hydroxybutyrique (β -hydroxybutyrate)** - formé par la réduction de l'acétoacétate
- **l'acétone** - un sous-produit volatil exhalé par les poumons. Sa présence peut donner à l'haleine une odeur sucrée et fruitée, souvent observée dans l'acidocétose diabétique

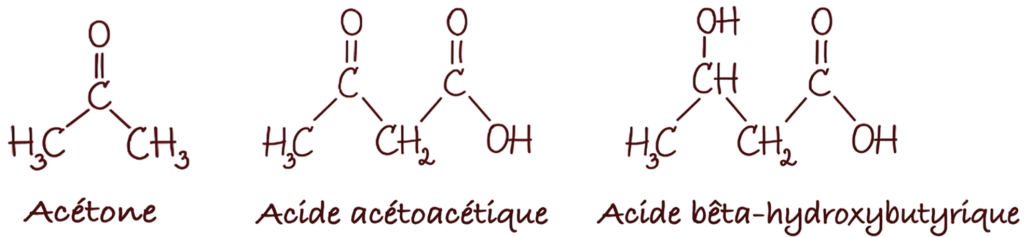


Figure 2. Les corps cétoniques: acétoacétate, β -hydroxybutyrate et acétone

Site de production

La cétonogénèse a lieu exclusivement dans le foie, au sein des mitochondries des hépatocytes, l'acide acétoacétique étant le produit principal. Pour le foie, l'acétoacétate est un métabolite inerte qui ne peut être catabolisé, le foie étant dépourvu de la machinerie enzymatique nécessaire pour activer l'acétoacétate (spécifiquement, la succinyl-CoA-acétoacétate-CoA transférase).

À l'inverse, les tissus extrahépatiques, tels que le muscle squelettique, le cœur, les reins et, lors d'un jeûne prolongé, le cerveau, peuvent convertir l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate en énergie.

Rôle physiologique

Dans des conditions normales, la production de corps cétoniques est faible, et leur excrétion urinaire est minimale (le test urinaire des corps cétoniques est négatif). Lorsque la disponibilité en glucose diminue, la synthèse des corps cétoniques augmente en tant que réponse adaptative pour fournir un carburant aux tissus et épargner le glucose pour ceux qui en dépendent strictement (tels que les globules rouges et certaines parties du cerveau).

Cétonogénèse pathologique

La cétonogénèse pathologique survient lorsque la production de corps cétoniques dans le foie dépasse la capacité des tissus périphériques à les utiliser comme source d'énergie. Cela entraîne une accumulation de corps cétoniques dans le sang (cétonémie) et leur apparition dans l'urine (cétonurie). Cette situation représente un déséquilibre métabolique souvent associé à un déficit en insuline ou à une utilisation du glucose sévèrement altérée.

Dans des conditions normales, l'insuline supprime la lipolyse (la dégradation des graisses/triglycérides stockés) dans le tissu adipeux. Cependant, lorsque les taux d'insuline sont faibles, comme dans le diabète sucré de type 1 non contrôlé, ou, dans une moindre mesure, pendant la famine ou un jeûne prolongé, cette inhibition est perdue. Les processus suivants se produisent alors:

1. **Lipolyse accrue** - les triglycérides du tissu adipeux sont dégradés en acides gras libres (AGL) et en glycérol.

2. **Transport vers le foie** - les AGL pénètrent dans le foie et sont convertis en acétyl-CoA par β -oxydation dans les mitochondries.
3. **Accumulation d'acétyl-CoA** - Lorsque le métabolisme glucidique est altéré (faible insuline $\rightarrow$ faible captation du glucose $\rightarrow$ faibles niveaux d'oxaloacétate), le cycle de Krebs ralentit et ne peut traiter tout l'acétyl-CoA, entraînant son accumulation.
4. **Bascule vers la cétogenèse** - L'excès d'acétyl-CoA est dérivé vers la voie cétogène, entraînant la formation de corps cétoniques (acétoacétate, β -hydroxybutyrate et acétone).

Par conséquent, les corps cétoniques s'accumulent dans le sang car leur production dépasse leur vitesse d'utilisation par les tissus extrahépatiques (**cétonémie**). Une fois les concentrations sanguines supérieures au seuil rénal, les corps cétoniques sont excrétés dans l'urine (**cétonurie**). Les corps cétoniques étant des acides, leur accumulation abaisse le pH sanguin, entraînant une **acidocétose métabolique**. L'organisme tente de compenser par l'hyperventilation (respiration de Kussmaul) pour expulser le CO_2 et rétablir l'équilibre du pH. L'excrétion urinaire des sels cétoniques épuise le sodium, le potassium et le bicarbonate (réserve alcaline), aggravant la déshydratation et l'acidose.

La cétogenèse pathologique s'observe le plus souvent dans:

- Le diabète sucré non contrôlé (en particulier le type 1) $\rightarrow$ l'acidocétose diabétique (ACD)
- La famine ou le jeûne prolongé
- Les régimes pauvres en glucides (« cétogènes ») (généralement légers et physiologiques, mais pouvant simuler une cétose précoce)
- L'acidocétose alcoolique (due au métabolisme de l'éthanol et à une mauvaise nutrition)

Les patients présentant une cétogenèse pathologique, en particulier une acidocétose diabétique, peuvent présenter:

- Nausées, vomissements
- Déshydratation et soif excessive
- Respiration rapide et profonde (respiration de Kussmaul)
- Odeur fruitée (acétone) de l'haleine
- Altération de la conscience (dans les cas sévères)

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Identification des corps cétoniques dans l'urine par le test de Rothera

Principe

La réaction au nitroprussiate de sodium est utilisée pour détecter l'**acétone** et l'**acétoacétate** dans les échantillons biologiques, mais elle ne réagit **pas avec le β -hydroxybutyrate**. Le test est généralement exempt d'interférence de la plupart des médicaments ou produits métaboliques.

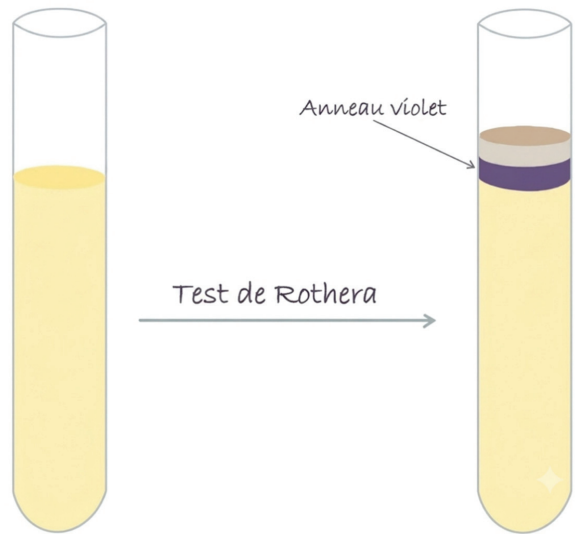
Dans le test de Rothera (du nom de son inventeur), 1 g de sulfate d'ammonium est ajouté à 5 ml d'urine et agité jusqu'à dissolution complète. Ensuite, environ trois gouttes d'une solution de nitroprussiate de sodium fraîchement préparée sont ajoutées et bien mélangées. Puis, 1 à 2 ml d'une solution saturée d'hydroxyde d'ammonium sont délicatement superposés, le long de la paroi du tube à essai, sur l'échantillon. Après 2 minutes, l'apparition d'un anneau violet à l'interface indique la présence de corps cétoniques; l'intensité de la couleur est graduée de 1+ à 4+.

Procédure

Réactifs	
Urine	5,0 ml
Sulfate d'ammonium	1 g
Nitroprussiate de sodium, gouttes	3-4 gouttes
Hydroxyde d'ammonium	1-2 ml

La réaction au nitroprussiate peut détecter 1-2 mg/dL d'acétoacétate ou 10 mg/dL d'acétone.

Une urine normale ne formera pas l'anneau violet.



Questions

1. Expliquez ce qu'il advient des monoacylglycérols et des acides gras libres après leur absorption par les cellules épithéliales intestinales.
2. Expliquez le rôle des sels biliaires dans la digestion des triglycérides.
3. Quel est le principe de la méthode à la pyruvate kinase pour le dosage des triglycérides, et comment le résultat est-il détecté par spectrophotométrie ?
4. Nommez les trois corps cétoniques. Où sont-ils formés et à partir de quel précurseur ?
5. Quand la cétoxygénase se produit-elle ?
6. Quelle est l'enzyme limitante de la cétoxygénase ?
7. Un homme de 52 ans présentant les symptômes suivants: polyurie, polydipsie et nausées, se présente aux urgences. À l'examen, il est déshydraté, tachycarde, et présente une respiration profonde et rapide (respiration de Kussmaul). Son haleine a une odeur fruitée.
Les analyses de laboratoire révèlent:
Glycémie: 450 mg/dL
pH artériel: 7,30 (↓)
Test de Legal-Imbert positif pour les corps cétoniques dans l'urine.
 - Quel est le diagnostic le plus probable ? Expliquez.
8. Une femme de 44 ans suit un régime riche en graisses et est physiquement inactive. Son échantillon de sérum à jeun apparaît lipémique et le taux de triglycérides est de 390 mg/dL. Comment interprétez-vous l'élévation des triglycérides, et qu'est-ce qui pourrait expliquer ce résultat ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L5. MÉTABOLISME DES LIPIDES. LIPOPROTÉINES PLASMATIQUES. DOSAGE DU CHOLESTÉROL TOTAL ET DU CHOLESTÉROL HDL DES LIPOPROTÉINES PLASMATIQUES

Le cholestérol, un lipide stéroïdien ($C_{27}H_{46}O$), est un constituant majeur des membranes cellulaires des cellules animales. Il se caractérise par un noyau stérol rigide composé de quatre cycles hydrocarbonés fusionnés, une chaîne hydrocarbonée et un seul groupe hydroxyle libre.

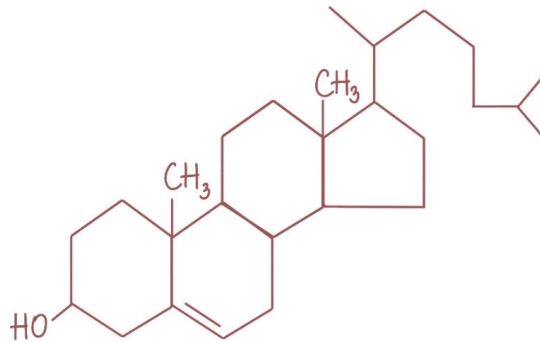


Figure 1. Structure du cholestérol

L'organisme nécessite environ 1 gramme de cholestérol par jour, apporté à la fois par la **synthèse endogène** et l'**apport alimentaire**. La contribution relative de ces deux sources varie selon les habitudes alimentaires et les besoins physiologiques. L'apport exogène est variable, proche de 1 gramme de cholestérol par jour. Lors de la digestion, en présence de sels biliaires, seule la moitié est absorbée au niveau intestinal. La majeure partie du cholestérol absorbé est convertie en esters de cholestérol par l'enzyme microsomale acyl-CoA-cholestérol acyltransférase (ACAT) dans la muqueuse intestinale. Avec les triacylglycérols, une partie du cholestérol libre et d'autres lipides alimentaires, les esters de cholestérol sont incorporés dans les chylomicrons et transportés vers les tissus périphériques.

Biosynthèse du cholestérol

Le cholestérol est synthétisé dans l'organisme à raison d'environ 0,5 à 1 gramme par jour, selon l'apport alimentaire. Bien que toutes les cellules nucléées puissent produire du cholestérol, le foie est le principal site de synthèse, contribuant à environ la moitié de la quantité totale formée dans l'organisme. La synthèse du cholestérol débute avec l'acétyl-CoA, utilisé pour synthétiser le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Toutes les étapes en aval du HMG-CoA se déroulent dans le réticulum endoplasmique lisse. La *HMG-CoA réductase* réduit le HMG-CoA en mévalonate; cette enzyme constitue la principale cible de régulation de l'ensemble de la voie. Le mévalonate est converti en divers intermédiaires isopréniques. Le squalène est cyclisé pour former le premier intermédiaire stéroïdique. Cette molécule, le lanostérol, est ensuite convertie en cholestérol par plusieurs modifications successives. Le dernier précurseur biosynthétique du cholestérol, le 7-déhydrocholestérol, est également le précurseur de la vitamine D3 (cholécalférol).

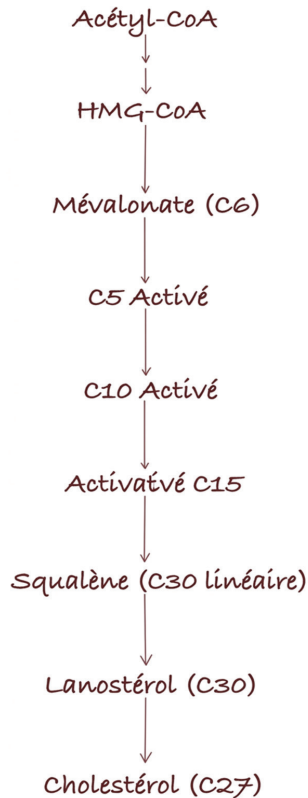


Figure 2. Synthèse du cholestérol

Biosynthèse du cholestérol - régulation

La biosynthèse du cholestérol est directement régulée par les taux de cholestérol existants, bien que les mécanismes homéostatiques impliqués ne soient que partiellement compris. La quantité de cholestérol synthétisée dans le foie est étroitement régulée par les taux de cholestérol alimentaire. Lorsque l'apport alimentaire en cholestérol est élevé, la synthèse diminue, et lorsqu'il est faible, la synthèse augmente. La synthèse du cholestérol endogène est contrôlée par la *HMG-CoA réductase*.

Cholestérol - utilisation et élimination

Le cholestérol est le précurseur de la synthèse des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires primaires et de la vitamine D. Le système cyclique stéroïdique du cholestérol ne peut pas être dégradé dans l'organisme humain. L'excrétion du cholestérol se fait donc par le système biliaire, sous forme d'acides biliaires.

Lipoprotéines

Les lipoprotéines plasmatiques sont des complexes macromoléculaires responsables du transport des lipides (insolubles dans l'eau) dans la circulation sanguine entre les différents organes et tissus. Ces structures sont constituées de:

- un composant lipidique: principalement des triacylglycérols, du cholestérol et des phospholipides
- un composant protéique appelé apolipoprotéines.

Leur structure est adaptée à l'environnement aqueux du sang: les groupes polaires des phospholipides et des apolipoprotéines sont orientés vers la surface, formant une enveloppe hydrophile, tandis que les lipides non polaires se trouvent dans le noyau hydrophobe. Cette organisation assure la solubilité des lipides et un transport efficace.

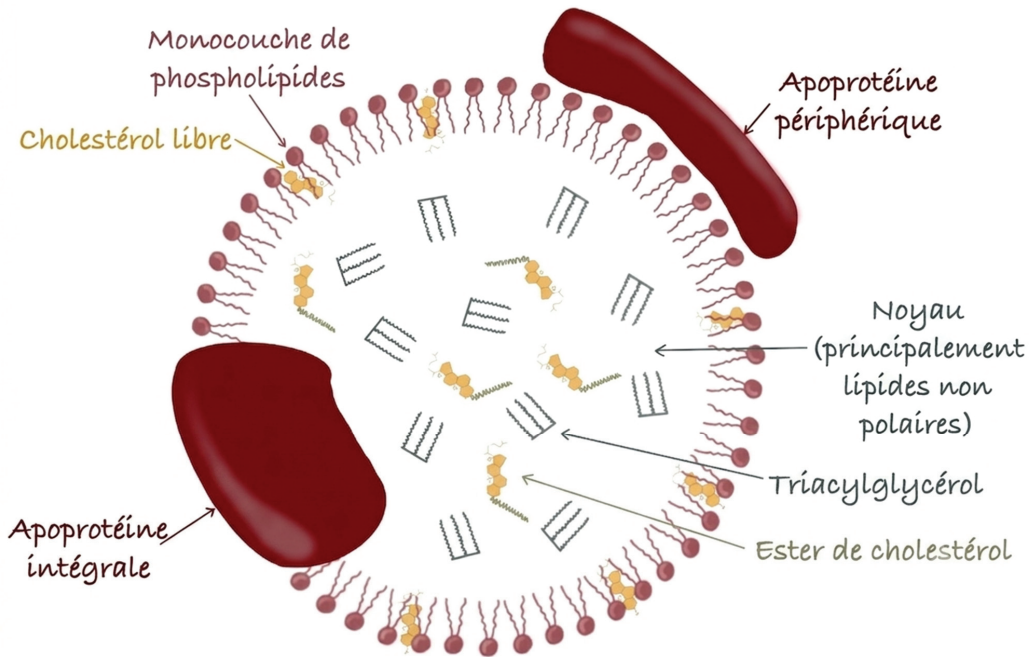


Figure 3. Structure générale d'une lipoprotéine

Les lipoprotéines sont classées selon leur densité, qui reflète la proportion relative de lipides et de protéines. Par ordre de densité croissante, on distingue: les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Un rapport protéines/lipides plus élevé correspond à une densité plus importante.

Les chylomicrons sont les lipoprotéines les moins denses et sont responsables du transport des lipides exogènes (alimentaires) de l'intestin vers les tissus périphériques. Ils contiennent l'apolipoprotéine B-48 et acquièrent les apolipoprotéines C et E des HDL dans la circulation. Structuellement, ils sont constitués d'une enveloppe phospholipide-apolipoprotéine entourant un noyau riche en triglycérides. Après avoir délivré les triglycérides aux tissus, les résidus de chylomicrons riches en cholestérol sont captés par le foie.

Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) sont synthétisées dans le foie et transportent les triglycérides endogènes vers les tissus extrahépatiques. Dans la circulation, les particules de VLDL sont progressivement métabolisées en lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) puis en lipoprotéines de basse densité (LDL).

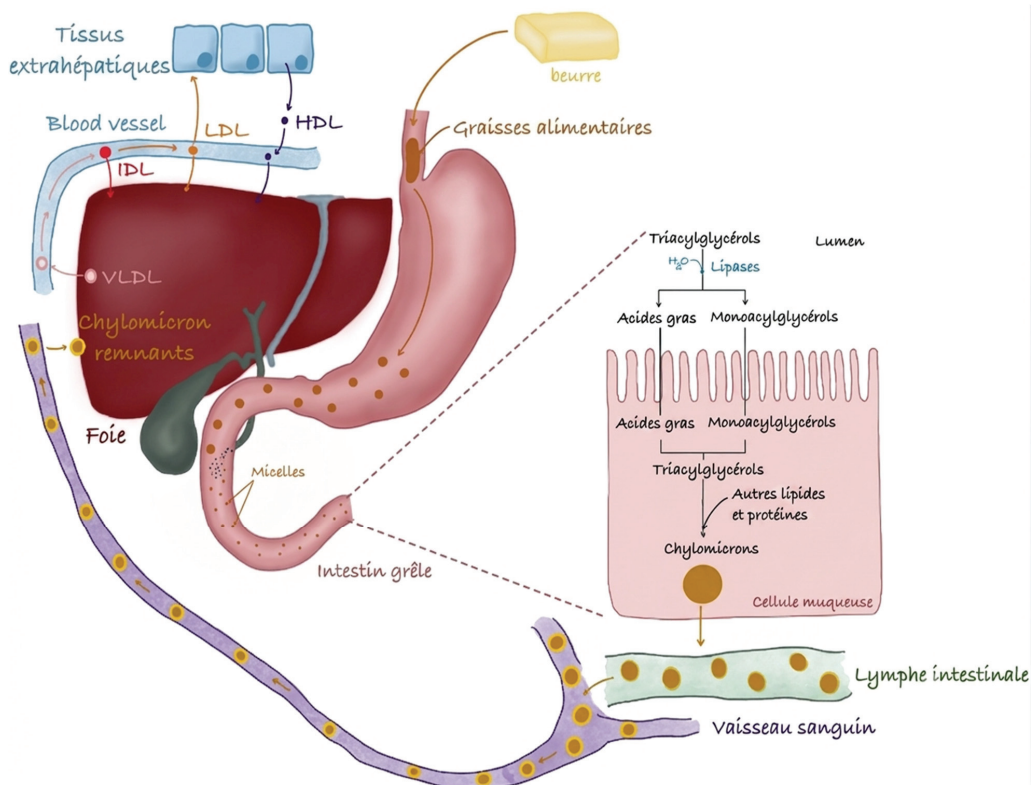


Figure 4. Transport des triacylglycérols et du cholestérol plasmatiques chez l'humain.

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont les principaux transporteurs de cholestérol dans le sang et sont souvent désignées comme le « mauvais » cholestérol. Elles acheminent le cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Les particules de LDL contiennent une seule molécule d'apolipoprotéine B-100, reconnue par des récepteurs LDL spécifiques à la surface cellulaire. L'expression de ces récepteurs est régulée par les taux intracellulaires de cholestérol via les protéines de liaison à l'élément régulateur des stérols (SREBP). Un taux intracellulaire élevé de cholestérol supprime la synthèse des récepteurs, tandis qu'un faible taux stimule leur expression.

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol, ramenant l'excès de cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son excrétion ou sa réutilisation. Les particules de HDL servent également de réservoir d'apolipoprotéines pour les autres lipoprotéines. Des taux élevés de HDL sont associés à un risque réduit d'athérosclérose, tandis que des taux faibles sont liés à un risque cardiovasculaire accru; c'est pourquoi les HDL sont désignées comme le « bon » cholestérol.

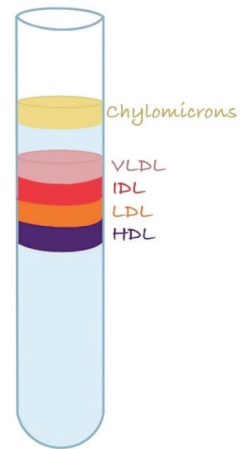
Méthodes de séparation des fractions de lipoprotéines plasmatiques

Les lipoprotéines plasmatiques peuvent être séparées selon différentes méthodes:

1. Méthodes physicochimiques:

L'ultracentrifugation repose sur la différence de densité des lipoprotéines plasmatiques selon leur teneur en lipides et en protéines. En utilisant des champs de gravité élevés (environ 100000g) et selon la densité du milieu, les lipoprotéines sédimentent (si leur densité est supérieure à celle du milieu) ou flottent (si leur densité est inférieure). Avec cette méthode, dans un tampon de densité 1,063 g/cm³, quatre fractions peuvent être séparées:

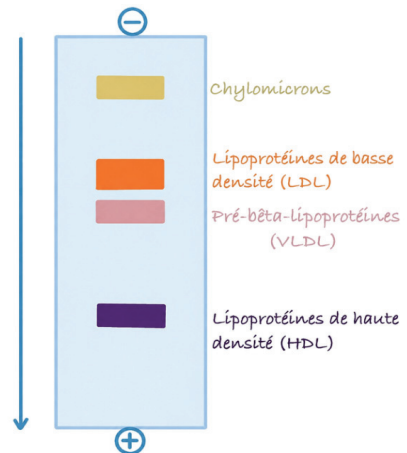
- chylomicrons $d \leq 0,96$ g/cm³
- VLDL (lipoprotéines de très basse densité) $d = 0,96-1,006$ g/cm³
- LDL (lipoprotéines de basse densité) $d = 1,006-1,063$ g/cm³
- HDL (lipoprotéines de haute densité) $d = 1,063-1,21$ g/cm³



L'électrophorèse - les lipoprotéines plasmatiques migrent dans un champ électrique car les protéines et les phospholipides portent des charges électriques. La séparation s'effectue à pH = 8,6 et les fractions sont visualisées à l'aide de colorants spécifiques. Les fractions séparées sont:

- chylomicrons - ne migrent pratiquement pas en raison de leur faible teneur en protéines et phospholipides
- β -lipoprotéines - correspondent aux LDL
- pré- β -lipoprotéines - correspondent aux VLDL
- α -lipoprotéines - correspondent aux HDL

Dans un sérum normal, prélevé après 8 à 10 heures de jeûne, les chylomicrons n'apparaissent pas, et les VLDL (pré- β) n'apparaissent qu'à l'état de traces.



La chromatographie d'exclusion stérique - sépare les particules selon leur taille lors de leur passage à travers une résine de gel poreuse; les particules plus grosses sont exclues des pores et éluent en premier, tandis que les particules plus petites pénètrent dans les pores et éluent plus tard. Elle sépare les lipoprotéines, isolant généralement les grosses particules comme les chylomicrons (les plus grosses) et les VLDL des plus petites (LDL, HDL). Bien qu'utile pour séparer de très grosses particules, la SEC seule offre souvent une séparation médiocre entre les petites lipoprotéines ou par rapport aux vésicules extracellulaires (VE) de taille similaire.

2. Méthodes chimiques

La séparation des fractions de lipoprotéines peut être réalisée à l'aide de cations (2⁺), de polyanions ou de substances tensioactives. Le cholestérol des fractions séparées peut être dosé selon la même méthode que pour le cholestérol total. La fraction HDL est séparée par précipitation avec un réactif phosphotungstique, et les fractions HDL + LDL sont précipitées avec du dodécylsulfate de sodium.

Métabolisme lipidique et risque cardiovasculaire: indicateurs cliniques et paracliniques

Le dysfonctionnement du métabolisme lipidique a un impact significatif sur le développement de maladies dégénératives telles que les dyslipidémies. Dans la plupart des cas, de mauvaises habitudes alimentaires aggravent une prédisposition génétique préexistante.

Les troubles métaboliques peuvent être identifiés relativement facilement par la corrélation des **indices anthropométriques (indice de masse corporelle - IMC, tour de taille et rapport tour de taille/tour de hanches)** avec les **indicateurs paracliniques** évaluant le métabolisme lipidique (**triglycérides, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL**). Ces mesures permettent d'évaluer la sévérité du dysfonctionnement métabolique et d'estimer le risque individuel de développer un diabète, une dyslipidémie ou une maladie cardiovasculaire.

INDICATEURS ANTHROPOMÉTRIQUES

A. Indice de masse corporelle (IMC)

- Reflète l'adiposité corporelle globale et est associé au risque cardiovasculaire et à la mortalité.
- Peut être calculé rapidement.
- Défini comme le rapport entre le poids corporel (kg) et la taille au carré (m²):

$$BMI = \frac{poids(kg)}{taille^2(m^2)}$$

Interprétation:

- IMC < 18,5 kg/m² – maigreur (possible malnutrition ou trouble du comportement alimentaire)
- IMC: 18,5–24,9 kg/m² – poids normal
- IMC ≥ 25 kg/m² – surpoids
- IMC ≥ 30 kg/m² – obésité

B. Tour de taille et rapport tour de taille/tour de hanches

- Indicateurs de l'obésité abdominale
- Le tour de taille est mesuré à mi-distance entre le rebord costal inférieur et la crête iliaque
- La graisse viscérale est un facteur de risque majeur de maladie cardiovasculaire, de diabète de type 2, d'hypertension, d'apnée du sommeil et de certains cancers

Interprétation:

- Un tour de taille > 94 cm chez l'homme et > 80 cm chez la femme indique une obésité abdominale
- Des valeurs supérieures à 102 cm (hommes) ou 88 cm (femmes) sont associées à un risque cardiovasculaire significativement accru
- Rapport tour de taille/tour de hanches:
 - < 0,95 chez l'homme (normal)
 - < 0,80 chez la femme (normal)
 - > 1,0 chez l'homme et > 0,85 chez la femme associé à un risque cardiovasculaire élevé

C. Formule de Broca et métabolisme basal (MB)

a. Formule de Broca

- Elle est utilisée pour calculer le **poids corporel idéal**.
- Calcul: soustraire 100 de la taille en centimètres, puis soustraire 10 % du résultat.

- Exemple: pour une personne mesurant 175 cm:
 - Poids normal = $175 - 100 = 75$ kg
 - Poids idéal = $75 - 10\% = 75 - 7,5 = 67,5$ kg

b. Métabolisme basal (MB)

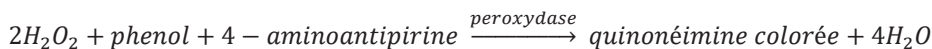
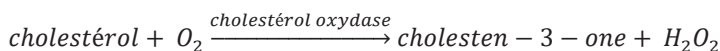
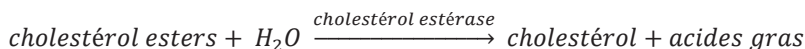
- Il est utilisé pour calculer le nombre de **kilocalories nécessaires par 24 heures**.
- Calcul:
 - Pour les hommes:
 $BMR (kcal / 24h) = 66,47 + 13,7 \times poids(kg) + 5 \times taille(cm) - 6,8 \times \text{âge}(années)$
 - Pour les femmes:
 $BMR (kcal / 24h) = 655,1 + 9,6 \times poids(kg) + 1,8 \times taille(cm) - 4,7 \times \text{âge}(années)$

INDICATEURS PARACLINIQUES

A. Dosage du cholestérol total

Principe

Le cholestérol et ses esters sont libérés des lipoprotéines par l'action d'agents tensioactifs. La cholestérol estérase hydrolyse les esters et la cholestérol oxydase oxyde le substrat, produisant du peroxyde d'hydrogène.



Procédure

Pipeter selon le tableau:

Réactifs, μ l	Échantillon	Étalon	Blanc
Étalon	-	100	-
Sérum	100	-	-
Eau distillée	-	-	100
Réactif de travail	1000	1000	1000

Mélanger vigoureusement puis incuber 5 minutes à 37°C. Mesurer les extinctions de l'échantillon et de l'étalon à 546 nm, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec le blanc (la couleur est stable 60 minutes).

Calcul

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \times 200$$

Valeurs normales: 140 - 220 mg%

Valeurs pathologiques

L'hypercholestérolémie survient dans l'hypercholestérolémie familiale, le diabète sucré, le syndrome néphrotique, l'alcoolisme, la grossesse.

Des valeurs basses sont retrouvées dans la cirrhose hépatique, l'hyperthyroïdie.

B. Dosage du cholestérol HDL

Méthode enzymatique directe

Dans la première étape, les fractions chylomicrons, LDL et VLDL sont éliminées par une réaction spécifique. Dans la seconde étape, les réactions sont identiques à celles du dosage du cholestérol total.

Procédure

Pipeter selon le tableau:

Réactifs, µl	Échantillon	Étalon	Blanc
Étalon	-	120	-
Sérum	120	-	-
Eau distillée	-	-	120
Réactif R1	600	600	600
Mélanger et incuber 5 min à 37°C, puis ajouter:			
Réactif R2	200	200	200

Incuber à 37°C pendant 5 minutes.

Lire l'extinction de l'échantillon et de l'étalon à 600 nm contre le blanc. Calculer:

Calcul

$$\text{HDL Cholestérol (mg/dl)} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \times 50.5$$

Valeurs normales

Hommes: 35-55 mg de cholestérol HDL/100 ml de sérum

Femmes: 45-65 mg de cholestérol HDL/100 ml de sérum

Risque athérogène	Hommes	Femmes
faible	> 55 mg/100 ml	> 65 mg/100 ml
élevé	< 35 mg/100 ml	< 45 mg/100 ml

Le **risque athérogène** peut également être apprécié par le calcul du **rapport C_T/C_{HDL}**.

- C_T C_{HDL} = 3,5 - 5 rapport normal
- C_T C_{HDL} 3,5 risque athérogène faible
- C_T C_{HDL} 5 risque athérogène élevé

C. Calcul du cholestérol LDL (équation de Friedewald):

$$\text{LDL cholestérol (mg/dl) sérum} = \text{Total cholestérol} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{LDL cholestérol (mg/dl) sérum} = \text{Total cholestérol} - \left(\text{HDL} + \frac{\text{Triglycérides}}{5} \right)$$

Valeurs normales

- < 150 mg LDL/100 ml: aucun traitement médical nécessaire
- 150-190 mg LDL/100 ml: risque d'athérosclérose moyen
- > 190 mg LDL/100 ml: risque d'athérosclérose élevé - traitement nécessaire

Troubles primaires et secondaires du métabolisme lipidique

1. Dyslipidémies primaires

Troubles héréditaires ou familiaux causés par des anomalies génétiques du métabolisme des lipoprotéines.

Type	Type I	Type IIa	Type IIb	Type III	Type IV	Type V
	Hyperchylomicronémie	Hypercholestérolémie isolée	Hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie combinées	Dysbétalipoprotéïnémie (« maladie du bêta large »)	Hyper-prébétalipoprotéïnémie	Hyperlipidémie mixte familiale
Lipoprotéine	↑ Chylomicrons	↑ LDL	↑ LDL + ↑ VLDL	↑ IDL	↑ VLDL	↑ VLDL + Chylomicrons
Cholestérol total	N ou ↑	↑	↑	↑	N ou ↑	N ou ↑
TG	↑↑	N	↑	↑	↑	↑↑
Cholestérol LDL	N ou ↓	↑	↑	N ou ↓	N	N
Cholestérol HDL	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓

2. Dyslipidémies secondaires

Troubles lipidiques acquis dus à des maladies sous-jacentes, des médicaments ou des états physiologiques.

Cholestérol augmenté	Triglycérides augmentés
Alimentation	Obésité
Hypothyroïdie	Hépatite aiguë sévère
Maladies hépatiques cholestatiques	Diabète sucré, pancréatite
Syndrome néphrotique	Alcoolisme
Grossesse	Syndrome néphrotique
Corticothérapie	Insulinorésistance
Diurétiques thiazidiques	Grossesse
	Œstrogènes, corticostéroïdes, diurétiques thiazidiques, bêta-bloquants

Dyslipidémies courantes

Athérosclérose

L'hypercholestérolémie, associée à certaines anomalies génétiques ou à un régime riche en cholestérol, contribue au développement de l'athérosclérose.

L'athérosclérose est une maladie chronique qui se développe progressivement et implique l'accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL), communément appelées « mauvais cholestérol », dans les parois des grandes artères, en particulier les artères coronaires. Le processus semble débiter par l'association des lipoprotéines, notamment les LDL, avec les protéoglycanes de la paroi vasculaire. Cette interaction entraîne la rétention des particules de LDL dans l'intima artérielle, où elles s'oxydent progressivement.

Les LDL oxydées activent ensuite les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins, les incitant à exprimer des molécules d'adhésion qui attirent les monocytes. Ces monocytes migrent dans la paroi vasculaire et se transforment en macrophages, qui phagocytent les LDL oxydées et deviennent des cellules spumeuses. Les cellules spumeuses libèrent des molécules inflammatoires qui attirent d'autres cellules immunitaires, entraînant la formation d'une plaque lipidique composée de cholestérol, de débris cellulaires et de cellules musculaires lisses. Avec le temps, cette plaque peut se durcir, entraînant une rigidification des artères.

Bien qu'une plaque étendue puisse occlure la lumière de l'artère (Figure 5), le flux sanguin n'est généralement pas complètement bloqué à moins que la plaque ne se rompe. Cette rupture de plaque déclenche la formation d'un caillot sanguin pouvant empêcher la circulation vers le cœur (provoquant un infarctus du myocarde) ou le cerveau (provoquant un accident vasculaire cérébral) et déclencher d'autres affections cardiovasculaires graves.

Des taux élevés de LDL circulants sont fortement liés au développement de l'athérosclérose. Le risque augmente avec une mauvaise alimentation, le tabagisme, les infections et la prédisposition génétique. Le tabagisme, par exemple, favorise l'oxydation des LDL, les rendant plus susceptibles d'être captées par les macrophages.

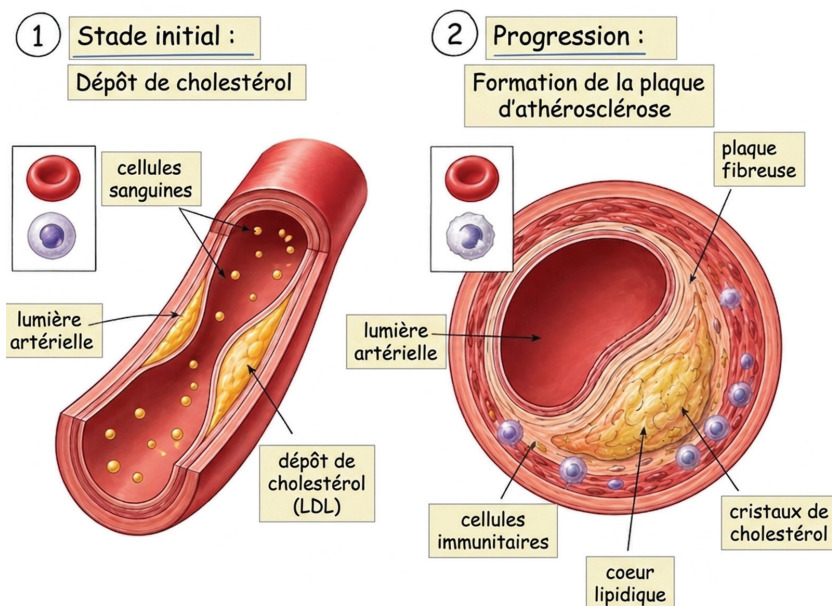


Figure 5. Les effets de l'excès de cholestérol.

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur de la maladie athéroscléreuse par les mécanismes suivants:

a. Cholestérol total élevé

Le risque de développer une maladie athéroscléreuse et le taux de mortalité par maladie coronarienne augmentent lorsque les taux de cholestérol dépassent 160 mg/dL.

Une réduction de 10 % de la concentration de cholestérol total est associée à une réduction de 50 % du risque.

b. Cholestérol LDL élevé

Le risque coronarien commence à augmenter lorsque le cholestérol LDL dépasse 150 mg/dL.

La « règle des 2:1:1 » stipule qu'une diminution de 2 % du cholestérol LDL entraîne une réduction de 1 % du risque de maladie coronarienne et une régression de 1 % des lésions existantes.

c. Cholestérol HDL réduit

Un faible taux de cholestérol HDL est un prédicteur indépendant et significatif du risque coronarien, en particulier lorsqu'il est associé à une hypertriglycéridémie.

L'indice athérogène (cholestérol total / cholestérol HDL) est prédictif du risque cardiovasculaire lorsque les valeurs dépassent 5.

L'indice athérogène affiné (cholestérol LDL / cholestérol HDL) est prédictif lorsque les valeurs dépassent 3,5 chez l'homme et 2,5 chez la femme.

Évaluation du risque cardiovasculaire global

La Société Européenne d'Athérosclérose recommande l'utilisation de la grille EURO Score pour quantifier le risque cardiovasculaire global.

Cette grille intègre les facteurs de risque principaux et additionnels suivants: sexe, âge, statut tabagique, cholestérol total, pression artérielle systolique, diabète sucré, taux de cholestérol HDL, antécédents familiaux, obésité et hypertriglycéridémie.

Le risque cardiovasculaire individuel est déterminé en localisant la cellule appropriée de la grille selon le profil de l'individu, suivi d'un ajustement selon la présence de facteurs de risque additionnels.

Obésité

L'obésité est un type de dyslipidémie secondaire résultant d'un déséquilibre à long terme entre l'apport et la dépense énergétiques, l'excès d'énergie étant stocké sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Même un léger surplus calorique quotidien, comme 1 %, peut entraîner une prise de poids significative avec le temps, contribuant à une augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC).

Selon les recommandations 2024 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'obésité est diagnostiquée cliniquement lorsque l'indice de masse corporelle (IMC) d'une personne est ≥ 30 kg/m². Pour mieux évaluer le risque pour la santé, en particulier lié à la graisse abdominale (viscérale), les indicateurs additionnels suivants sont recommandés: le tour de taille et le rapport tour de taille/tour de hanches. Bien que l'IMC soit utilisé pour le diagnostic, ces mesures additionnelles aident à stratifier la sévérité et le risque des complications liées à l'obésité, telles que le diabète de type 2, la dyslipidémie et les maladies cardiovasculaires.

Questions

1. Comment la biosynthèse du cholestérol est-elle régulée en réponse à l'apport alimentaire, et quel est le rôle de la HMG-CoA réductase dans ce processus ?
2. Pourquoi le cholestérol ne peut-il pas être directement catabolisé, et quels sont ses principaux devenir métaboliques ?
3. Décrivez les différences entre chylomicrons, VLDL, LDL et HDL en termes de densité, de taille, de contenu et de rôle.
4. Décrivez le processus par lequel les LDL contribuent à la formation des plaques d'athérosclérose.
5. Une femme de 52 ans se présente pour une évaluation du risque cardiovasculaire. Son bilan lipidique montre les valeurs suivantes:
Cholestérol total: 260 mg/dL
Cholestérol HDL: 50 mg/dL
Triglycérides: 150 mg/dL
 - Calculez son cholestérol LDL à l'aide de l'équation de Friedewald.
 - Calculez son risque athérogène
6. Un homme sédentaire de 23 ans aux habitudes alimentaires irrégulières pèse 90 kg et mesure 172 cm. Pour évaluer son statut métabolique, calculez son IMC et interprétez le résultat. Déterminez ensuite son métabolisme basal (MB) à l'aide de la formule standard. Que suggère le MB concernant ses besoins énergétiques ? Sur la base de son profil, comment évalueriez-vous son risque pour la santé, et quelles recommandations de mode de vie feriez-vous ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L6. MÉTABOLISME DES PROTÉINES. DOSAGE DES TRANSAMINASES

Introduction. Digestion et absorption des protéines

Les protéines alimentaires sont une source essentielle d'acides aminés. Les protéines ingérées sont digérées en acides aminés ou en petits peptides pouvant être absorbés par l'intestin et transportés dans le sang. Une autre source d'acides aminés est la dégradation des protéines cellulaires défectueuses ou inutiles.

La digestion des protéines débute dans l'estomac, où le milieu acide favorise la dénaturation des protéines. Les protéines dénaturées sont des substrats plus accessibles à la protéolyse que les protéines natives. L'enzyme protéolytique principale de l'estomac est la **pepsine**, une protéase non spécifique synthétisée sous forme de pepsinogène (proenzyme/zymogène). Elle est activée en pepsine à pH acide et est maximale à $\text{pH} = 2$. C'est pourquoi la pepsine peut être active dans le milieu fortement acide de l'estomac, alors même que d'autres protéines y subissent une dénaturation.

La dégradation des protéines se poursuit dans la lumière intestinale grâce à l'action d'enzymes protéolytiques sécrétées par le pancréas (**trypsine**, **chymotrypsine**, **élastase**, et les **carboxypeptidases**). Ces enzymes sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs puis converties en enzymes actives. Ces enzymes présentent une large gamme de spécificités, de sorte que les substrats sont dégradés en acides aminés libres ainsi qu'en di- et tripeptides. La digestion est encore renforcée par des protéases, telles que l'**aminopeptidase N**, la **dipeptidase**, situées dans la membrane plasmique des cellules intestinales. Les aminopeptidases digèrent les protéines à partir de l'extrémité amino-terminale. Les acides aminés simples, ainsi que les di- et tripeptides, sont transportés dans les cellules intestinales à partir de la lumière puis dans la veine porte, le foie et la circulation systémique. Depuis le milieu extracellulaire, les acides aminés pénètrent dans les cellules par transport actif, contre le gradient de concentration.

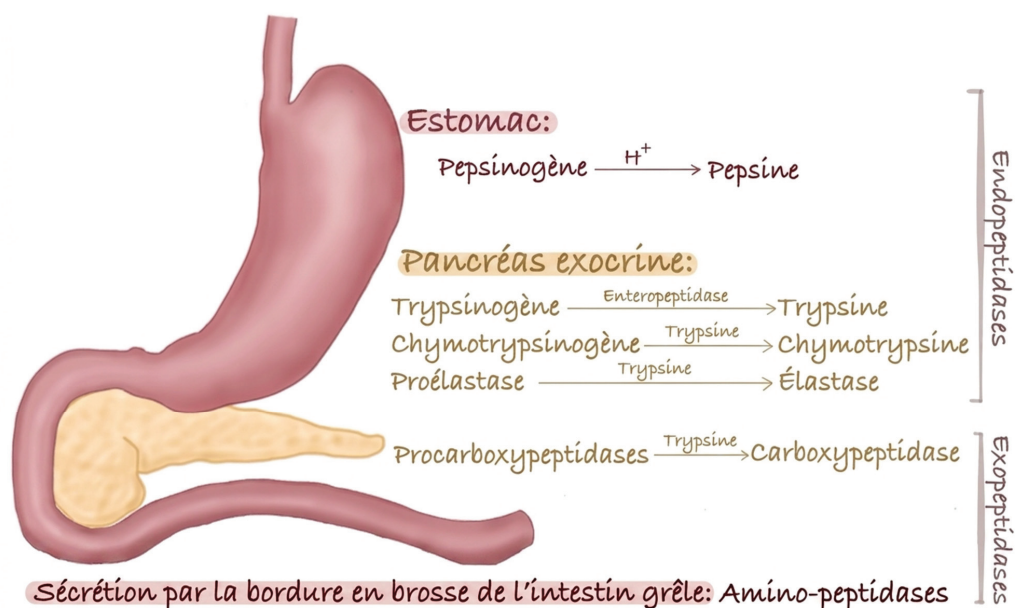
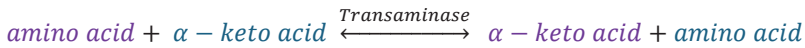


Figure 1. Digestion des protéines

Réactions de transamination

La transamination est le principal processus d'élimination de l'azote des acides aminés. La plupart des acides aminés subissent des réactions de transamination, à l'exception de quelques-uns, dont la lysine, la thréonine, la proline et l'hydroxyproline. Les enzymes catalysant ces réactions sont appelées **transaminases** ou **aminotransférases**. Ces enzymes ont le phosphate de pyridoxal comme cofacteur. Dans la plupart des cas, l'azote, sous forme de groupe amine, est transféré de l'acide aminé d'origine à l' α -cétoglutarate, formant du glutamate, tandis que l'acide aminé d'origine est converti en son α -cétos-acide correspondant.

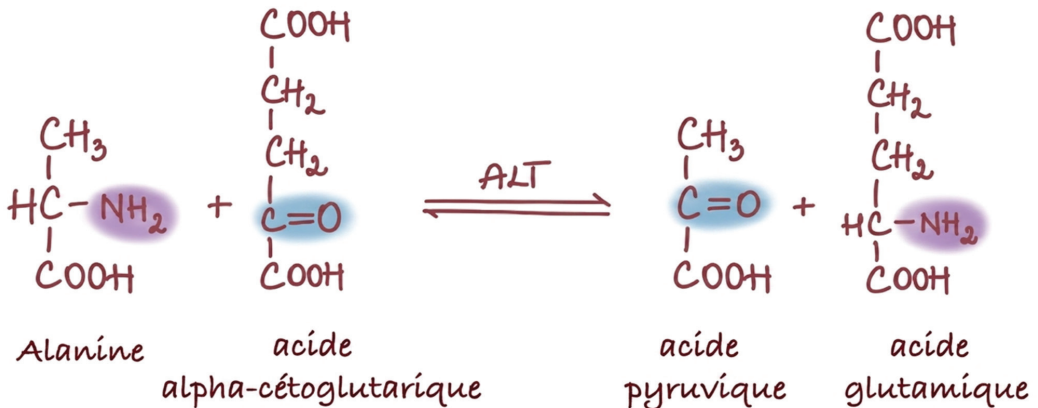


Globalement, dans une réaction de transamination, un groupe amine d'un acide aminé devient le groupe amine d'un second acide aminé. Ces réactions étant facilement réversibles, elles peuvent servir à éliminer l'azote des acides aminés ou à transférer l'azote vers des α -cétos-acides pour former des acides aminés. Elles interviennent ainsi à la fois dans la dégradation et dans la synthèse des acides aminés.

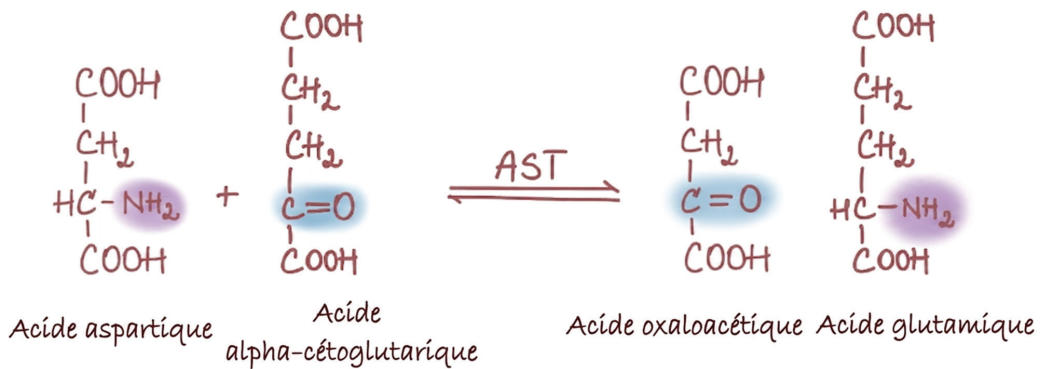
Deux enzymes transaminases importantes sont l'**alanine transaminase/alanine aminotransférase (ALT/ALAT)** ou **transaminase glutamate-pyruvate sérique (SGPT/GPT)** et l'**aspartate transaminase/aspartate aminotransférase (AST/ASAT)**, également connue sous le nom de **transaminase glutamate-oxaloacétate sérique (SGOT/GOT)**.

Bien que la mesure de leur activité soit couramment utilisée comme test de lésion hépatocellulaire, ces enzymes présentent une large distribution tissulaire.

L'**alanine aminotransférase** catalyse le transfert d'un groupe amine de la L-alanine vers l' α -cétoglutarate, les produits de cette réaction de transamination réversible étant le pyruvate et le L-glutamate. L'ALT est couramment mesurée en clinique dans le cadre des tests de la fonction hépatique. En diagnostic, elle est presque toujours mesurée en unités internationales par litre (UI/L) ou en μkat .



L'**aspartate aminotransférase** catalyse l'interconversion de l'aspartate et de l' α -cétoglutarate en oxaloacétate et glutamate.



L'AST est similaire à l'ALT en ce que les deux enzymes sont associées aux cellules parenchymateuses hépatiques. La différence est que l'ALT se trouve principalement dans le foie, avec des quantités cliniquement négligeables dans les reins, le cœur et le muscle squelettique, tandis que l'AST se trouve dans le foie, le cœur (muscle cardiaque), le muscle squelettique, ainsi que les reins, le cerveau et les globules rouges. Par conséquent, l'ALT est un indicateur plus spécifique de l'inflammation hépatique que l'AST, car l'AST peut également être élevée dans des maladies affectant d'autres organes, telles que l'infarctus du myocarde, les maladies musculosquelettiques, et la pancréatite aiguë, l'anémie hémolytique aiguë, la maladie rénale aiguë.

L'AST est couramment mesurée en clinique dans le cadre des tests diagnostiques de la fonction hépatique (avec l'ALT). Il est cependant important de garder à l'esprit que la source de l'AST (et, dans une moindre mesure, de l'ALT) dans les analyses sanguines peut refléter une pathologie touchant d'autres organes que le foie.

Différentes isoenzymes de transaminases se trouvent dans le cytoplasme et les mitochondries des cellules. L'AST est bilocalisée, présente à la fois dans les mitochondries et le cytoplasme, tandis que l'ALT est présente uniquement dans le cytoplasme. Par exemple, dans le cas d'une lésion légère du tissu hépatique, l'isoenzyme qui apparaît dans le sérum provient du cytoplasme cellulaire, bien qu'une petite quantité de l'isoenzyme mitochondriale soit également présente. En cas de lésion tissulaire sévère, l'isoenzyme mitochondriale est libérée en quantités importantes.

Le dosage de l'activité des transaminases sériques peut être réalisé par plusieurs méthodes, dont la méthode de réaction colorée et le test optique, présenté ci-dessous.

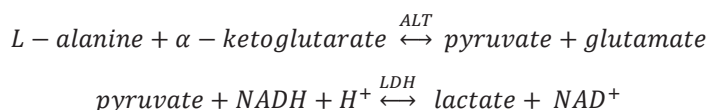
PARTIE EXPÉRIMENTALE

Test optique - Principe

Il n'est pas possible de suivre directement les réactions de transamination par le test optique, car leur coenzyme, le phosphate de pyridoxal, ne produit pas de signal détectable. Cependant, les avantages des dosages à suivi continu peuvent être obtenus en couplant les réactions de transamination à des réactions spécifiques de déshydrogénase. Les céto-acides produits lors de la réaction de transamination sont mesurés indirectement par leur réduction enzymatique en hydroxy-acides correspondants, accompagnée de l'oxydation du NADH en NAD⁺. Cette variation de la concentration en NADH est suivie par spectrophotométrie à 340 nm. Les réactions couplées pour les deux enzymes sont les suivantes:

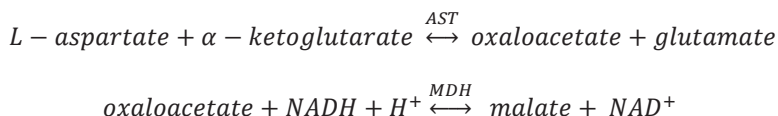
Pour l'ALT (GPT):

Le pyruvate, formé lors de la réaction de l'ALT, est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH):



Pour l'AST (GOT):

L'oxaloacétate, formé lors de la réaction de l'AST, est réduit en malate en présence de malate déshydrogénase (MDH):



Le substrat, le NADH, et les enzymes auxiliaires, LDH et MDH, doivent être présents en quantité suffisante afin que la vitesse de réaction soit limitée uniquement par les concentrations de GOT et GPT, respectivement. Au fur et à mesure que les réactions se déroulent, le NADH est oxydé en NAD⁺. La diminution du NADH est suivie en mesurant la baisse d'absorbance à 340 nm, soit en continu, soit à intervalles fréquents sur plusieurs minutes. La variation de l'absorbance par minute (A/min) est directement proportionnelle aux micromoles de NADH oxydées, et donc aux micromoles de substrat transformé par minute, exprimées en unités internationales (UI).

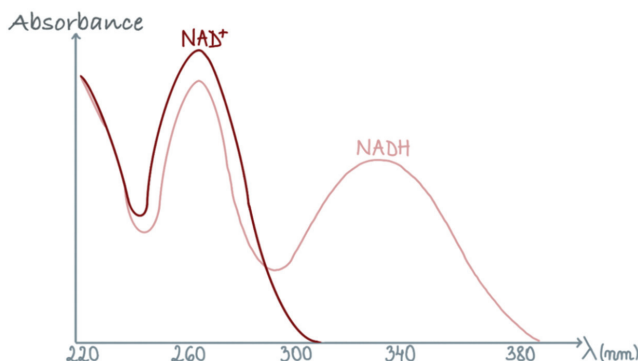


Figure 2. Les spectres d'absorption du NAD⁺ et du NADH

Procédure de dosage de l'ALT (GPT):

Dans une cuvette, pipeter 1000 µl de réactif de travail et 100 µl de sérum. Homogénéiser en pipetant de haut en bas, incuber 1 minute à température ambiante, puis lire l'absorbance contre l'air à 340 nm, après 1, 2 et 3 minutes. Calculer A/minute.

$$ALT \text{ (activité enzymatique)} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 1746$$

Valeurs normales: - hommes: <50 U/L
- femmes: <35 U/L

Procédure de dosage de l'AST (GOT):

Dans une cuvette, pipeter 1000 µl de réactif de travail et 100 µl de sérum. Homogénéiser en pipetant de haut en bas, incuber 1 minute à température ambiante, puis lire l'absorbance contre l'air à 340 nm, après 1, 2 et 3 minutes. Calculer A/minute.

$$AST \text{ (activité enzymatique)} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 1750$$

Valeurs normales: - hommes: <55 U/L
- femmes: <35 U/L

Signification clinique

Les transaminases sont largement distribuées dans les tissus humains. L'AST et l'ALT sont normalement présentes dans le plasma humain, la bile, le liquide céphalorachidien et la salive, mais aucune n'est retrouvée dans l'urine sauf en cas de lésion rénale. Voici les principales pathologies associées à une augmentation des transaminases:

- **Pathologies hépatiques**

- Dans l'*hépatite virale* et d'autres maladies hépatiques impliquant une nécrose hépatique, l'ALT et l'AST sériques sont élevées avant même l'apparition des signes et symptômes cliniques (tels que l'ictère). L'activité des deux enzymes peut atteindre jusqu'à 100 fois la limite supérieure de référence, bien qu'une élévation de 20 à 50 fois soit la plus fréquemment observée.
- Des élévations modérées de l'activité de l'AST et de l'ALT peuvent également survenir dans la *cholestase extrahépatique*.
- Dans la *cirrhose*, les taux enzymatiques varient selon le stade et la sévérité de la maladie. Généralement, les valeurs vont de la limite supérieure normale à quatre ou cinq fois la valeur normale, l'activité de l'AST étant supérieure à celle de l'ALT.
- Dans le *cancer du foie primitif ou métastatique*, des élévations de cinq à dix fois pour les deux enzymes peuvent être observées, l'AST dépassant généralement l'ALT. Cependant, les taux enzymatiques peuvent rester normaux aux stades précoces de l'infiltration maligne.

Bien que les deux enzymes augmentent en cas de lésion des cellules hépatiques, l'ALT est plus spécifique du foie. Des taux élevés d'ALT sont rarement observés en dehors des maladies hépatiques parenchymateuses et tendent à persister plus longtemps que les élévations de l'AST.

- **Consommation d'alcool**

- Des augmentations légères à modérées de l'activité de l'AST et de l'ALT peuvent survenir après une *consommation d'alcool*.

- **Prise de médicaments**

- Des élévations enzymatiques peuvent être observées après *l'administration de certains médicaments*, notamment les opiacés, les salicylates, l'ampicilline, le paracétamol et la plupart des neuroleptiques.
- *Surdosage en paracétamol*: le paracétamol devient un toxique hépatique significatif lorsque plus de 10 grammes sont ingérés, en raison de la formation d'un intermédiaire réactif, la N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), qui s'accumule lorsque les voies métaboliques normales sont dépassées.

À noter:

- **ALT > AST** - Évoque une hépatite virale ou une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)
- **AST > ALT (généralement rapport >2:1)** - Évoque une maladie hépatique alcoolique
- **Élévations légères (1–3× normale)** - Souvent observées dans les affections chroniques ou les lésions médicamenteuses
- **Élévations sévères (>10×)** - Indique généralement une lésion hépatique aiguë

Le rapport AST/ALT (rapport de De Ritis) est utile en clinique:

- AST/ALT > 5 - cause extrahépatique
- AST/ALT > 2 - évoque fortement une hépatite alcoolique
- AST/ALT < 1 - fréquent dans l'hépatite virale à un stade avancé
- AST/ALT ~1 - peut s'observer dans la cirrhose ou une maladie hépatique avancée

- **Pathologies cardiaques**

- Dans *l'infarctus du myocarde*, l'activité de l'AST augmente significativement dans le sérum. Les taux d'ALT restent généralement dans les limites normales ou ne sont que légèrement élevés, le muscle cardiaque contenant des niveaux relativement faibles d'ALT par rapport à l'AST.
- Les taux d'AST peuvent également augmenter en cas de lésion hépatique secondaire à une insuffisance cardiaque.

- **Pathologies musculaires**

- Une activité élevée de l'AST est observée dans la *dystrophie musculaire* progressive et la *dermatomyosite*, atteignant parfois jusqu'à 8 fois la valeur normale.
- À l'inverse, les *maladies musculaires neurogènes* ne montrent généralement pas d'élévation des transaminases.

- **Autres pathologies**

- *L'embolie pulmonaire* peut provoquer une élévation de l'AST de 2 à 3 fois la normale
- Des élévations légères à modérées (2 à 5 fois la normale) peuvent également survenir dans des affections telles que:
 - *la pancréatite aiguë*
 - *les lésions musculaires par écrasement*
 - *la gangrène*
 - *la maladie hémolytique.*

Questions

1. Pepsine, trypsine, chymotrypsine, élastase, carboxypeptidase, aminopeptidase, dipeptidase.
Pour chacune des catégories suivantes, indiquez les enzymes correspondantes:
 - a. Endopeptidase:
 - b. Exopeptidase:
 - c. Enzyme gastrique (estomac):
 - d. Enzyme pancréatique:
 - e. Enzyme intestinale:
2. Expliquez la réaction générale de transamination.
3. Présentez brièvement la localisation tissulaire et intracellulaire des transaminases.
4. Quelle méthode est utilisée pour doser les transaminases sériques en laboratoire ? Expliquez le principe du dosage de la GPT et de la GOT.
5. Expliquez pourquoi l'absorbance est mesurée à 340 nm et non à 260 nm.
6. Quelle est l'utilité clinique du dosage des transaminases sériques ?
7. Que pourrait indiquer une valeur de 200 UI/L de GOT ? Expliquez.
8. Que pourrait indiquer une valeur de 2000 UI/L de GOT et de GPT ? Quels autres marqueurs pensez-vous seraient modifiés ?
9. Quels médicaments peuvent influencer les valeurs sériques des transaminases ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L7. MÉTABOLISME DES PROTÉINES. MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS. IDENTIFICATION DES TROUBLES DU MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS

Chez l'organisme humain sain, la principale source d'acides aminés pour les protéines endogènes est constituée par les protéines alimentaires. Ces protéines sont hydrolysées enzymatiquement dans le tube digestif et les acides aminés résultants passent dans le sang, puis sont captés par le foie et d'autres organes. Ils sont utilisés notamment pour synthétiser les protéines endogènes.

Le catabolisme des acides aminés a lieu principalement au niveau du foie et du rein par la réaction de transamination, couplée à la réaction de désamination. Les composés résultants sont l'ammoniac et les céto-acides. L'ammoniac est converti en urée et est éliminé principalement par l'urine. Les céto-acides sont dégradés dans le cycle de Krebs ou par des réactions spécifiques.

La concentration plasmatique des acides aminés varie au cours de la journée d'environ 30 %, étant plus élevée après le repas. Les acides aminés du sang sont filtrés à travers la membrane glomérulaire mais sont ensuite réabsorbés dans les tubules rénaux par transport actif. L'élimination accrue d'acides aminés dans l'urine est appelée **aminoacidurie**. Il existe deux types d'aminoacidurie:

Aminoacidurie primaire

Elle est due à des mutations héréditaires au niveau de l'ADN codant des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés ou dans leur système de réabsorption rénale. Ces mutations produisent des enzymes défectueuses qui bloquent les voies métaboliques normales de leurs propres substrats, entraînant une accumulation de ces substrats (acides aminés) ou d'intermédiaires métaboliques. Dans certains cas, ce blocage du métabolisme normal dirige les acides aminés vers d'autres voies métaboliques, produisant des produits de dégradation pathologiques. Le diagnostic peut être établi à trois niveaux:

- a) la mise en évidence des modifications de l'ADN
- b) la mise en évidence des enzymes défectueuses
- c) la mise en évidence des perturbations métaboliques produites

Tableau 1. Les principales erreurs du métabolisme des acides aminés

Aminoacidurie	Incidence	Enzyme déficitaire	Excès sanguin	Excès urinaire	Symptômes cliniques	Traitement
Hyperphénylalaninémie, Phénylcétonurie	1:10 000	Phe hydroxylase	Phe	Phe, acides phénylpyruvique, phénylacétique, etc.	Retard mental, eczéma	Régime restrictif en Phe
Tyrosinose	1:100 000	Phénylacéto-acétate hydroxylase	Tyr, Met	Tyr et métabolites	Cirrhose hépatique, troubles rénaux	Régime restrictif en Phe, Tyr, Met
Alcaptonurie	1:250 000	Homo-gentisate oxydase	Acide homo-gentisique	Acide homo-gentisique	Arthrite dégénérative, pigmentation du cartilage	
Homo-cystinurie	1:200 000	Cystathionine β-synthase	h-Cys, Met	h-Cystine, Met	Troubles oculaires, vasculaires, osseux	Pyridoxine, régime pauvre en Met, supplémentation en Cys
Cétoacidurie à chaîne ramifiée (leucinose)	1:250 000	Décarboxylase des céto-acides ramifiés	Leu, Ile, Val	Leu, Ile, Val et les céto-acides correspondants	Acidose, vomissements, blocage respiratoire, évolution létale	Régime restrictif en Leu, Ile, Val

Le diagnostic clinique repose sur la mise en évidence des perturbations métaboliques. Les symptômes et le pronostic de l'acidoacidurie primaire peuvent varier de formes bénignes comme l'*alcaptonurie* à des formes létales comme la *leucino*se. Les accumulations de céto-acides (dans la leucinose, ou de phénylalanine, dans la *phénylcéto*urie) sont des exemples d'accumulation de substrat ou d'intermédiaire à effet toxique. Les principales acidoacidurie primaires sont résumées dans le Tableau 1.

Aminoacidurie secondaire

Elle affecte simultanément plusieurs acides aminés et est provoquée par des atteintes d'organes actifs dans le métabolisme des acides aminés, tels que le foie et le rein, ainsi que par une famine avancée. Sont utilisés pour l'identification et le traitement de l'acidoacidurie secondaire:

- le diagnostic du nourrisson ou de l'enfant malade
- les tests de routine chez le nouveau-né
- le diagnostic prénatal

Le diagnostic précoce de ces maladies est une condition indispensable à l'efficacité du traitement. Ces affections sont suspectées lorsque l'enfant vomit fréquemment, présente des troubles neurologiques ou hépatiques, et que ces troubles s'accroissent avec l'augmentation de l'apport protéique.

Les méthodes d'investigation utilisées sont cliniques ou microbiologiques, qualitatives ou semi-qualitatives. Ces méthodes mettent en évidence des acides aminés individuels ou des métabolites intermédiaires spécifiques. Les méthodes quantitatives sont utilisées pour le dosage exact de l'acide aminé ou du métabolite inconnu dans des centres médicaux spécialisés. Ces méthodes utilisent des techniques modernes de spectrométrie de masse, de spectrophotométrie IR, de chromatographie liquide haute performance, etc.

Le métabolisme de la tyrosine et de la phénylalanine, du tryptophane et des acides aminés à chaîne ramifiée (valine, leucine, isoleucine) est présenté ci-dessous.

Métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine

La phénylalanine est un acide aminé essentiel de nature mixte (à la fois glucoformateur et cétogène). La tyrosine, en revanche, est classée comme non essentielle car elle peut être synthétisée de manière endogène, mais sa formation dépend entièrement de la phénylalanine. C'est pourquoi, en cas de déficit en phénylalanine, la tyrosine devient elle-même essentielle. Au-delà de leur rôle en tant que constituants protéiques, la phénylalanine et la tyrosine sont au cœur de la synthèse de plusieurs composés biologiquement importants, et les perturbations de leur métabolisme sont à l'origine de certains des troubles des acides aminés les plus significatifs sur le plan clinique.

Formation de la tyrosine

La tyrosine provient soit de l'apport alimentaire en protéines, soit de l'hydroxylation de la phénylalanine. Cette réaction est catalysée par la phénylalanine hydroxylase, qui nécessite la tétrahydrobioptérine (BH₄), l'oxygène moléculaire et le NADPH comme cofacteurs. Des anomalies à cette étape sont à l'origine du trouble héréditaire le plus fréquent du métabolisme des acides aminés: la phénylcétourie (PCU).

Catabolisme de la tyrosine

La dégradation de la tyrosine suit une voie définie qui aboutit finalement au fumarate (un intermédiaire glucoformateur) et à l'acétoacétate (un intermédiaire cétogène). Le processus débute par une transamination en p-hydroxyphénylpyruvate, qui est ensuite converti en homogentisate. L'homogentisate est oxydé en maléylacétoacétate, qui est ensuite isomérisé en fumarylacétoacétate. Le clivage final du fumarylacétoacétate produit le fumarate et l'acétoacétate. Chacune de ces étapes est catalysée par des enzymes spécifiques, et des anomalies génétiques à différents niveaux entraînent des maladies métaboliques distinctes.

Rôles biosynthétiques de la tyrosine

Au-delà de son devenir catabolique, la tyrosine sert de précurseur à plusieurs biomolécules essentielles:

- **Catécholamines:** la tyrosine est hydroxylée pour former la lévodopa ou L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), qui subit une décarboxylation puis une hydroxylation successives pour produire la dopamine, la noradrénaline, et enfin l'adrénaline. Ces catécholamines jouent des rôles majeurs dans la neurotransmission, la régulation cardiovasculaire et la réponse au stress.
- **Mélanine:** par l'action de la tyrosinase, la tyrosine est convertie en dopaquinone puis en pigments de mélanine, responsables de la coloration de la peau, des cheveux et des yeux.
- **Hormones thyroïdiennes:** au sein de la glande thyroïde, les résidus de tyrosine de la thyroglobuline subissent une iodation pour former la triiodothyronine (T₃) et la thyroxine (T₄).

Signification clinique: pathologie du métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine

Les troubles du métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine comptent parmi les pathologies les plus importantes du métabolisme des acides aminés, en raison de leur incidence relativement élevée et des manifestations neurologiques et systémiques sévères qui peuvent en résulter.

- **Phénylcétonurie:** le trouble congénital le plus important du métabolisme des acides aminés, généralement causé par un déficit en phénylalanine hydroxylase. Les patients atteints accumulent des taux élevés de phénylalanine et de ses métabolites anormaux tels que l'acide phénylpyruvique. L'excès de phénylalanine perturbe la synthèse de la myéline et la production de sérotonine, entraînant une déficience intellectuelle profonde historiquement appelée «idiotie phénylpyruvique». L'hypopigmentation résulte d'une disponibilité réduite en tyrosine pour la synthèse de la mélanine. Cliniquement, l'urine développe une couleur vert-bleuté à l'ajout de chlorure ferrique en raison de l'acide phénylpyruvique. Un diagnostic précoce et une restriction alimentaire en phénylalanine (avec supplémentation en tyrosine) peuvent prévenir les lésions neurologiques.
- **Alcaptonurie:** ce trouble héréditaire rare résulte d'un déficit en homogentisate oxydase. L'acide homogentisique s'accumule et est excrété dans l'urine, qui fonce au contact de l'air en raison de l'oxydation. Avec le temps, une ochronose se développe, avec dépôt de pigment dans le cartilage et les articulations, entraînant une arthrite.
- **Albinisme:** un groupe hétérogène de syndromes causés par un déficit en tyrosinase, entraînant une absence de synthèse de mélanine. Les personnes atteintes présentent une hypopigmentation de la peau, des cheveux et des yeux, avec des conséquences cliniques telles que la photophobie et un risque accru de cancer de la peau.
- **Tyrosinémies:** des troubles rares causés par différentes anomalies enzymatiques au sein de la voie catabolique de la tyrosine (fumarylacétoacétase, tyrosine aminotransférase, homogentisate oxygénase) entraînant des manifestations neurologiques ou une accumulation d'intermédiaires toxiques aux effets hépatotoxiques, néphrotoxiques et cancérigènes.

Métabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée (valine, leucine, isoleucine)

La valine, la leucine et l'isoleucine sont les trois acides aminés à chaîne ramifiée (AACR). Ce sont des acides aminés essentiels, obtenus exclusivement par l'alimentation. Du point de vue de leurs produits métaboliques finaux, la valine est glucoformatrice, la leucine est cétogène, et l'isoleucine est à la fois glucoformatrice et cétogène. Contrairement à la plupart des acides aminés, le métabolisme des AACR n'a pas lieu principalement dans le foie. Il se déroule plutôt dans les tissus extrahépatiques tels que le muscle squelettique, le rein et le cerveau, car l'aminotransférase des acides aminés à chaîne ramifiée a une activité plus faible dans le foie. Cela fait des AACR des substrats importants pour la production d'énergie, en particulier dans le muscle pendant le jeûne et l'exercice.

Dégradation des AACR

Voie commune initiale

Les premières étapes du catabolisme sont partagées par les trois AACR:

1. **Transamination:** chaque acide aminé subit une transamination, catalysée par l'aminotransférase des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAT), avec le phosphate de pyridoxal (vitamine B₆) comme cofacteur. Cela produit les α -céto-acides à chaîne ramifiée (BCKA) correspondants.
2. **Décarboxylation oxydative:** les BCKA sont ensuite décarboxylés par le complexe α -céto-acide déshydrogénase des acides aminés à chaîne ramifiée (BCKD), qui produit les dérivés acyl-CoA respectifs. Un déficit génétique en BCKD provoque la leucinose.
3. **Déshydrogénation et réactions ultérieures:** à partir de ce point, les voies divergent, chaque AACR donnant naissance à différents intermédiaires métaboliques.

Voies cataboliques divergentes

- **Valine (glucoformatrice):** la valine est finalement dégradée en succinyl-CoA, un intermédiaire du cycle de Krebs. La voie passe par des intermédiaires tels que l' α -cétoisovalérate, l'isobutyryl-CoA et le propionyl-CoA avant de donner le succinyl-CoA. Le produit final étant un substrat gluconéogénique, la valine est classée comme glucoformatrice.
- **Leucine (cétogène):** la leucine est dégradée en acétyl-CoA et acétoacétate, via des intermédiaires incluant l' α -cétoisocaproate, l'isovaléryl-CoA et le HMG-CoA. Cela rend la leucine exclusivement cétoène, contribuant à la synthèse des corps cétoniques et du cholestérol, mais pas à la néoglucogenèse.
- **Isoleucine (mixte):** l'isoleucine produit à la fois de l'acétyl-CoA et du succinyl-CoA. Par conséquent, l'isoleucine est considérée comme à la fois glucoformatrice et cétoène, contribuant à la fois à la formation de glucose et de corps cétoniques.

Signification clinique: pathologie du métabolisme des AACR

Le trouble héréditaire le plus important du métabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée est la **leucinose (maladie des urines à odeur de sirop d'érable, MSUD)**, également appelée cétoacidurie à chaîne ramifiée. Cette affection est causée par un déficit du complexe α -céto-acide déshydrogénase à chaîne ramifiée (BCKD), entraînant l'accumulation des AACR et de leurs céto-acides correspondants dans le sang et l'urine. Cliniquement, les nourrissons atteints présentent des difficultés alimentaires, des vomissements, un retard de développement, un dysfonctionnement neurologique et, en l'absence de traitement, le décès au cours de la première année de vie. Une caractéristique typique est l'odeur sucrée caractéristique, rappelant le sirop d'érable, de l'urine, due aux céto-acides excrétés. Une reconnaissance précoce et une prise en charge diététique (restriction des AACR) sont essentielles à la survie et au devenir neurodéveloppemental.

Un autre lien clinique pertinent est l'**acidémie méthylmalonique**, qui peut affecter le métabolisme des AACR au stade où le propionyl-CoA est converti en succinyl-CoA. Cette réaction nécessite la vitamine B₁₂; un déficit en B₁₂ peut donc également altérer la dégradation de la valine et de l'isoleucine, entraînant une accumulation d'acide méthylmalonique avec acidose métabolique et manifestations neurologiques.

Métabolisme du tryptophane

Le tryptophane est un acide aminé essentiel devant être apporté par l'alimentation. D'un point de vue métabolique, il est classé comme un acide aminé mixte, car il donne naissance à la fois à des produits glucoformateurs (alanine $\rightarrow$ pyruvate) et à des produits cétogènes (acétyl-CoA et acétoacétate). Au-delà de son rôle dans la synthèse protéique, le tryptophane est un précurseur de plusieurs composés biologiquement importants, notamment la sérotonine, la mélatonine, la tryptamine et le NAD⁺. En raison de son importance dans la formation de la niacine et du NAD⁺, le tryptophane est parfois considéré comme une provitamine de la vitamine PP (niacine). Chez l'adulte, la conversion du tryptophane en NAD⁺ suffit à couvrir les besoins de l'organisme, ce qui explique pourquoi le nicotinamide n'est pas toujours considéré comme une vitamine alimentaire essentielle.

Catabolisme du tryptophane

La voie catabolique principale du tryptophane est la voie de la kynurénine. Le processus débute par l'oxydation du tryptophane en N-formylkynurénine par la tryptophane dioxygénase. Celle-ci est ensuite convertie en kynurénine, qui subit d'autres transformations pour donner de l'alanine et de l'acétoacétyl-CoA. L'alanine peut être transaminée en pyruvate et entrer dans la néoglucogenèse, tandis que l'acétoacétyl-CoA donne de l'acétyl-CoA et de l'acétoacétate, alimentant le métabolisme des corps cétoniques et le cycle de Krebs. Ainsi, le tryptophane est à la fois glucoformateur et cétogène.

Voies biosynthétiques à partir du tryptophane

- **Sérotonine et mélatonine:** le tryptophane peut être hydroxylé par la tryptophane hydroxylase (dépendante de la tétrahydrobioptérine/BH₄) pour former le 5-hydroxytryptophane, qui est ensuite décarboxylé par une décarboxylase dépendante du PLP pour donner la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT). La sérotonine agit comme neurotransmetteur régulant l'humeur, l'appétit et la motilité intestinale. Dans la glande pinéale, la sérotonine subit une acétylation puis une méthylation pour former la mélatonine, qui régule le rythme circadien et le sommeil. Ce lien biochimique explique pourquoi les aliments riches en tryptophane peuvent favoriser la somnolence. Fait intéressant, les repas riches en protéines peuvent inhiber la synthèse de sérotonine en raison de la compétition entre acides aminés pour le transport, tandis que les repas riches en glucides augmentent la captation du tryptophane par le cerveau (via l'élimination insulino-médiée des acides aminés compétiteurs), favorisant ainsi la production de sérotonine.
- **Niacine et NAD⁺/NADP⁺:** par la voie de la kynurénine, le tryptophane peut également être converti en acide quinolinique, précurseur de la niacine (vitamine B₃), elle-même utilisée pour la synthèse du NAD⁺ et du NADP⁺. Environ 60 mg de tryptophane peuvent produire 1 mg de niacine, un processus nécessitant la vitamine B₆. Cette voie est cliniquement importante car des anomalies du métabolisme du tryptophane ou un déficit en vitamine B₆ peuvent entraîner des symptômes pseudo-pellagres.
- **Dérivés indoliques:** les bactéries intestinales métabolisent le tryptophane en composés indoliques. Ceux-ci peuvent être absorbés, modifiés dans le foie et excrétés dans l'urine, faisant partie des produits d'excrétion normaux du catabolisme du tryptophane.

Signification clinique: pathologie du métabolisme du tryptophane

- **Déficit en vitamine B₆:** l'enzyme kynuréninase, nécessaire dans la voie de la kynurénine, dépend de la vitamine B₆. En cas de déficit, des métabolites anormaux tels que la kynurénine et l'acide xanthurénique s'accumulent et apparaissent dans l'urine, lui conférant une couleur jaune-verdâtre caractéristique. Cette observation peut être utilisée à des fins diagnostiques pour indiquer un déficit en vitamine B₆.

- **Maladie de Hartnup:** ce trouble héréditaire résulte d'une absorption intestinale et d'une réabsorption rénale défectueuses des acides aminés neutres, dont le tryptophane. La conséquence est une disponibilité réduite du tryptophane pour la synthèse du NAD^+ et une excrétion urinaire accrue de métabolites tels que l'indican. Cliniquement, cela se manifeste par des symptômes pseudo-pellagreux (dermatite, diarrhée, démence) dus à un déficit secondaire en niacine.
- **Syndrome carcinoïde:** dans les tumeurs des cellules entérochromaffines, de grandes quantités de tryptophane sont dérivées vers la synthèse de sérotonine au détriment de la formation de niacine, la sérotonine étant ensuite transformée en acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) par désamination oxydative. Les patients présentent des bouffées vasomotrices, une diarrhée, un bronchospasme et une atteinte cardiaque. Une élévation du 5-HIAA urinaire est diagnostique.
- **Pellagre:** une affection classique causée par un déficit en niacine, pouvant être d'origine alimentaire ou secondaire à une altération du métabolisme du tryptophane. La triade clinique comprend dermatite, diarrhée et démence (à laquelle peut s'ajouter le décès en l'absence de traitement).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Identification de l'hyperphénylalaninémie par le test de l'acide phénylpyruvique urinaire

L'hyperphénylalaninémie regroupe un ensemble d'affections dues à une altération du mécanisme de conversion de la Phe en Tyr. Dans ces conditions, le catabolisme de la Phe suit une voie métabolique secondaire, dont le produit principal est l'acide phénylpyruvique. Celui-ci apparaît en quantités accrues dans le plasma et l'urine, phénomène appelé *phénylcétonurie*. L'identification précoce de la maladie est essentielle pour prévenir le retard mental. Le traitement consiste en un régime restrictif en Phe, afin de maintenir le taux plasmatique de Phe à 3 - 8 mg%. Le test de l'acide phénylpyruvique urinaire a pour rôle d'identifier l'affection et de surveiller le régime en Phe.

Principe

L'acide phénylpyruvique réagit avec le chlorure ferrique pour donner un composé de couleur bleu-vert (couleur persistant 2-4 minutes). Une couleur transitoire similaire est également donnée par l'acide homogentisique ou l'acide p-hydroxyphénylpyruvique.

Réactifs

1. Solution de FeCl_3 : 10 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sont dissous et amenés à 100 ml avec de l'eau distillée.
2. Agent précipitant pour le phosphate: 2,2 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g de NH_4Cl et 2 ml de NH_3 sont dissous et dilués à 100 ml avec de l'eau distillée.
3. HCl concentré

Procédure

2 ml d'urine et 0,5 ml d'agent précipitant sont mélangés dans un tube à essai. La suspension est filtrée et le filtrat est acidifié avec 2-3 gouttes de HCl concentré et mélangé. 2-3 gouttes de solution de FeCl_3 sont ajoutées. Le test est considéré positif si une couleur bleu-vert, persistant pendant 2-4 minutes, apparaît. La sensibilité de la méthode est de 10 mg%. La concentration urinaire d'acide phénylpyruvique atteint 50 - 100 mg% chez les enfants atteints, et 2 g d'acide phénylpyruvique par gramme de créatinine sont excrétés.

2. Test de la leucinose (maladie des urines à odeur de sirop d'érable)

Cette affection est due au catabolisme défectueux des acides aminés à chaîne ramifiée: leucine, isoleucine et valine. Le catabolisme normal suppose une transamination en céto-acides, suivie d'une décarboxylation oxydative pour donner des dérivés acyl-CoA.

L'anomalie génétique de l'étape de décarboxylation produit une accumulation dans l'urine et le sang de ces acides aminés et de leurs dérivés céto-acides. Les enfants atteints paraissent normaux à la naissance, mais rapidement, à mesure que l'apport protéique augmente, une acidocétose aiguë s'installe, provoquant vomissements, léthargie, faiblesse, coma et, chez les survivants, un retard mental. Les analyses sanguines mettent en évidence un excès d'acides aminés ramifiés, et dans l'urine, des quantités élevées de céto-acides dérivés, qui donnent à l'urine l'odeur spécifique de sirop d'érable.

Réactifs

1. Solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine 0,4 g / 100 ml dans HCl 1M (DNPH)

Procédure

1 ml d'urine filtrée est mélangé avec 1 ml de DNPH dans un tube à essai. Le mélange est laissé reposer 10 minutes à température ambiante. L'apparition d'un précipité jaune indique la présence d'un excès de céto-acides. L'interférence possible de l'acétone est éliminée en faisant préalablement bouillir l'urine.

3. Dosage quantitatif de l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA)

Le 5-HIAA est formé par la désamination oxydative de la sérotonine (5-hydroxytryptamine), étant son produit d'excrétion urinaire. La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane au niveau des cellules argentaffines du tube digestif et de l'hypothalamus. C'est une amine biogène ayant des effets vasoconstricteurs sur le muscle lisse et un rôle de neurotransmetteur dans le cerveau. La concentration plasmatique de sérotonine étant très faible, le dosage urinaire du 5-HIAA reste la méthode la plus utilisée pour évaluer le métabolisme de la sérotonine.

Principe

Le test est basé sur la formation d'un dérivé diazo violet à partir du 5-HIAA, du 1-nitroso-2-naphtol et de l'acide nitreux (HNO_2).

Réactifs

1. Solution de 1-nitroso-2-naphtol 1% dans l'éthanol à 95%
2. Solution d'acide nitreux: 0,2 ml de solution de nitrite de sodium à 2,5% est mélangé à 5 ml d'acide sulfurique 2N. La solution doit être fraîchement préparée.
3. Dichloroéthane
4. Étalon 5-HIAA: 8 mg de 5-HIAA sont dissous et dilués à 100 ml avec de l'eau distillée.

Procédure

Pipeter les réactifs dans 3 tubes à centrifuger comme suit:

Réactifs, ml	Échantillon	Étalon	Blanc
Urine	0,4	-	-
Étalon	-	0,4	-
Eau dist.	1,6	1,6	2
1-nitroso-2-naphtol	0,5	0,5	0,5
Sol. d'acide nitreux	0,5	0,5	0,5
Mélanger, laisser reposer 10 minutes à température ambiante			
Dichloroéthane	5	5	5

Agiter fortement les tubes pendant 15 secondes et centrifuger pendant 10 minutes à 3000 tr/min. Lire l'absorbance du surnageant à 540 nm, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec le blanc.

Calcul

$$5\text{HIAA (mg/24heures)} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \times 8 \times \frac{1}{100} \times V$$

Où V représente le volume d'urine (en ml) excrété en 24 heures.

En l'absence d'étalon, le calcul se fait à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{HIAA (mg/24 heures)} = A(\text{échantillon}) \times F \times V$$

Où F = 0,32

Valeurs normales: 2 - 9 mg de 5-HIAA / 24 heures

Pathologie

La sérotonine et, par conséquent, le 5-HIAA sont produits en excès en cas de tumeurs carcinoïdes des cellules argentaffines, où le 5-HIAA urinaire excrété peut atteindre 100 - 220 mg / 24 h.

Questions

1. Quelle est la différence entre l'aminocidurie primaire et secondaire ?

2. Choisissez le précurseur correct pour chacun des composés suivants:

Mélatonine	Tyrosine
Mélanine	
Hormones thyroïdiennes	
Adrénaline	Leucine
Niacine	
Noradrénaline	
Sérotonine	
Dérivés indoliques	Tryptophane

3. Pour chacune des pathologies suivantes, indiquez le métabolisme d'acide aminé défectueux correspondant:

Tyrosinémies: _____
Déficit en vitamine B₆: _____
Leucinose: _____
Phénylcétonurie: _____
Alcaptonurie: _____
Maladie de Hartnup: _____
Syndrome carcinoïde: _____
Acidémie méthylmalonique: _____
Pellagre: _____
Albinisme: _____

4. Décrivez brièvement 3 des pathologies listées à l'exercice n°3.

5. Décrivez le test de la leucinose, abordé dans la partie pratique.

6. Comment peut-on identifier l'acide phénylpyruvique dans l'urine ?

7. Expliquez le principe du dosage de l'acide 5-hydroxyindolacétique.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L8. MÉTABOLISME DES PROTÉINES. DOSAGE DE L'URÉE

Métabolisme de l'ammoniac

L'ammoniac est produit dans tous les tissus de l'organisme lors du métabolisme des composés azotés, en particulier des acides aminés. L'ammoniac (NH_3) est une base relativement faible et, aux valeurs de pH physiologiques, il est principalement présent sous forme d'ion ammonium NH_4^+ .

Les principales sources d'ammoniac comprennent la transamination suivie de la désamination oxydative des acides aminés, le catabolisme des amines biogènes, la dégradation des bases azotées puriques et pyrimidiques, et l'activité bactérienne intestinale, où l'uréase convertit l'urée en ammoniac.

NH_3 et NH_4^+ sont toxiques et, à des concentrations plus élevées, provoquent divers problèmes, notamment des lésions cérébrales. Les raisons des effets neurotoxiques de l'ammoniac n'ont pas encore été élucidées. Il pourrait perturber le métabolisme du glutamate et de son précurseur, la glutamine, dans le cerveau. Les taux sanguins d'ammoniac doivent donc rester très bas; il doit être efficacement inactivé et excrété. Ceci est réalisé principalement par la conversion de l'ammoniac en urée dans le foie, qui est ensuite excrétée dans l'urine.

Les acides aminés participent donc à des réactions de transamination, qui transfèrent leur groupe amine à l' α -cétoglutarate, formant du glutamate. Le glutamate subit ensuite une désamination oxydative, libérant de l'ammoniac libre pour la synthèse de l'urée. L'ammoniac libre étant toxique, les tissus périphériques le convertissent en formes de transport plus sûres, principalement l'alanine et la glutamine.

Dans le cycle glucose-alanine, le pyruvate (produit par la glycolyse dans le muscle) est transaminé en alanine, qui passe dans la circulation sanguine et est captée par le foie. Là, l'alanine est reconvertie en pyruvate, et son groupe amine est utilisé pour la formation d'urée.

Par ailleurs, la glutamine sert de transporteur non toxique d'ammoniac dans tout l'organisme. Dans les tissus périphériques, la glutamine synthétase catalyse la combinaison du glutamate et de l'ammoniac pour former la glutamine. Une fois transportée vers des organes comme le rein et l'intestin, la glutaminase dégrade la glutamine, libérant de l'ammoniac et régénérant le glutamate. Ce processus se produit également dans le foie, mais dans une moindre mesure, et est notamment stimulé par l'acidose, l'ammoniac libéré pouvant contribuer à tamponner l'excès de protons.

Ensemble, ces voies assurent une gestion et une élimination sûres des déchets azotés, avec un risque minimal d'accumulation d'ammoniac dans la circulation sanguine.

Cycle de l'urée

Le cycle de l'urée se déroule uniquement dans le foie. Il débute par l'incorporation de l'ammoniac dans le carbamoyl phosphate par la synthétase correspondante. Cette réaction se déroule en trois étapes successives. La première étape utilise de l'ATP pour activer le bicarbonate en carbamoyl phosphate, qui capture ensuite l'ammoniac libre pour former le carbamate. Une autre étape ATP-dépendante active cet intermédiaire en carbamoyl phosphate. Le groupe carbamoyl se retrouvera dans l'urée produite par le cycle de l'urée.

Les réactions suivantes du cycle de l'urée sont les suivantes:

- Le groupe carbamoyl est transféré du carbamoyl phosphate au groupe δ -amine de l'ornithine, un acide aminé non standard homologue de la lysine, par l'ornithine transcarbamylase. Cette réaction produit la citrulline.
- La citrulline et l'aspartate forment l'argininosuccinate, réaction catalysée par l'argininosuccinate synthétase. Cette réaction nécessite également de l'ATP, converti en AMP au cours du processus.

- L'argininosuccinate est clivé en fumarate et arginine par l'argininosuccinase.
- L'urée est libérée de l'arginine par l'arginase, qui régénère l'ornithine et referme le cycle.

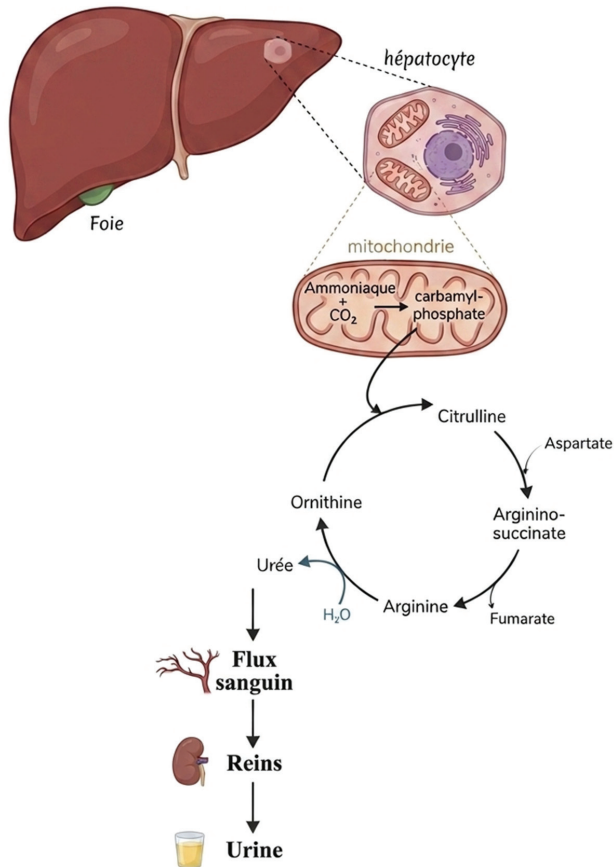


Figure 1. Cycle de l'urée

Après sa synthèse, l'urée est sécrétée dans le plasma et transportée vers les reins, où elle est éliminée. D'autres voies mineures d'élimination existent par l'intestin et les glandes sudoripares. Ces voies sont accentuées dans les situations pathologiques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

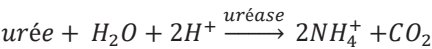
Dosage de l'urée sanguine et urinaire par la méthode enzymatique à l'uréase (test optique)

Principe

Après déprotéinisation du plasma, de nombreux composés azotés non protéiques subsistent dans le sang. Ils sont collectivement désignés sous le terme d'azote non protéique (NPN) ou azote résiduel. Les substances de cette catégorie comprennent l'urée (15-50 mg %), l'acide urique (2-8 mg %), la créatinine (0,7-1,2 mg %), la créatine, les acides aminés, la choline, les polypeptides, l'ammoniac, le glutathion, l'histamine, etc.

Les composés d'importance clinique majeure sont l'urée, la créatinine et l'acide urique, dont la concentration dans le sang et l'urine doit être déterminée.

L'urée est hydrolysée en ammoniac et en dioxyde de carbone, en présence de l'enzyme uréase. L'ammoniac résultant réagit ensuite avec l' α -cétoglutarate et le NADH, H^+ pour former du glutamate et du NAD^+ , en présence de la glutamate déshydrogénase (GLDH). La réaction est suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 340 nm, correspondant à l'oxydation du NADH en NAD^+ . Cette diminution de l'absorbance par unité de temps est directement proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon.



Réactifs

1. Réactif 1 (tampon): contient Tris, 80 mmol/l, pH 8,0; α -cétoglutarate 5 mmol/l.
2. Réactif 2 (enzymatique): contient uréase >100U/ml; GLDH 6000 U/l; NADH 0,32 mmol/l.
3. Réactif 4 (étalon): urée 50 mg/l (8,325 mmol/l).
4. Réactif de travail: préparer en ajoutant 1 flacon de Réactif 2 à un flacon de Réactif 1 (solution tampon), puis agiter doucement pendant 30 minutes.

Échantillons biologiques

- sérum, plasma (prélevé sur anticoagulant-héparine; les anticoagulants contenant du fluorure ne sont pas utilisés - inhibe l'activité de l'uréase, ni les ions ammonium - interfèrent avec le dosage);
- urine (recueillie sur 24 heures).

Procédure

Pipeter les réactifs dans 2 cuvettes comme suit:

Réactifs, μ l	Étalon	Échantillon
Réactif de travail	1000	1000
Étalon	100	
Échantillon (sérum, urine diluée)		100

La méthode cinétique est utilisée. Après mélange des réactifs, l'absorbance est mesurée à 30 secondes puis à 2 minutes et 30 secondes, à 340 nm, dans des cuvettes de 1 cm. L'échantillon et l'étalon sont lus dans les mêmes conditions, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec de l'eau distillée.

Calcul

La concentration d'urée dans l'échantillon de sérum est calculée comme suit:

$$\text{sérum urée (mg/dl)} = \frac{\Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{étalon}}} \times c_{\text{étalon}} = \frac{\Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{étalon}}} \times 50$$

où: $\Delta A_{\text{échantillon}}$ = variation d'absorbance de l'échantillon

$\Delta A_{\text{étalon}}$ = variation d'absorbance de l'étalon

$C_{\text{étalon}} = 50 \text{ mg/dl}$

La concentration d'urée dans l'échantillon d'urine est calculée comme suit:

$$\begin{aligned} \text{urine urée (g urea/24h urine)} &= \frac{\frac{\Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{étalon}}} \times c_{\text{étalon}} \frac{V_{\text{urine (L)}}}{V_{\text{échantillon (L)}} \times 50}{1000} \\ &= \left(\frac{\Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{étalon}}} \times c_{\text{étalon}} \times V_{\text{urine (L)}} \times 50 \right) \div (V_{\text{échantillon (L)}} \times 1000) \end{aligned}$$

où: $\Delta A_{\text{échantillon}}$ = variation d'absorbance de l'échantillon

$\Delta A_{\text{étalon}}$ = variation d'absorbance de l'étalon

$C_{\text{étalon}} = 50 \text{ mg/dl} = 500 \text{ mg/L}$

$V_{\text{urine (L)}}$ = volume total d'urine des 24 heures, en litres

50 - facteur de dilution de l'urine

1000 - conversion de mg en grammes si l'étalon est exprimé en mg

Valeurs normales

Sérum: 15 – 45 mg/dl (1,7 – 7,5 mmol/l) d'urée

Urine (urine des 24 h): 20 – 36 g (333 – 600 mmol) d'urée

Signification clinique

L'azote uréique sanguin (BUN) a été le premier composé endogène utilisé pour évaluer la fonction rénale par analyse sérique ou plasmatique. C'est un déchet clé du métabolisme protéique, environ 90 % de l'urée étant excrétée par les reins. L'urée est librement filtrée par les glomérules mais n'est pas sécrétée activement par les tubules rénaux. Cependant, une proportion importante - environ 40 à 70 % - est réabsorbée passivement dans les tubules. En raison de cette réabsorption, les taux de BUN peuvent sous-estimer le débit de filtration glomérulaire (DFG) réel, en particulier dans les conditions de perfusion rénale réduite, où davantage d'urée est réabsorbée vers la circulation sanguine.

De plus, les concentrations d'urée peuvent être influencées par l'apport protéique alimentaire, la fonction hépatique et divers états pathologiques, ce qui en fait un marqueur moins spécifique lorsqu'il est utilisé isolément.

La valeur de l'urée sérique et urinaire dépend de l'apport protéique (alimentaire), du volume d'urine excrétée et de l'état fonctionnel du rein.

Modifications sanguines

- Variation physiologique sanguine

La variation de l'urée sanguine en fonction de l'apport protéique est illustrée dans le tableau suivant:

Apport protéique (g/kg de poids corporel / jour)	Valeur normale d'urée (mg d'urée/ 100 ml de sérum)
0,5	13 - 25
1,5	24 - 52
2,5	31 - 59

- **Variation pathologique sanguine**

Des valeurs augmentées sont retrouvées dans:

- Insuffisance rénale aiguë et chronique (dans ce cas, l'urée urinaire est diminuée)
- Causes extrarénales d'anurie: insuffisance cardiaque, maladies infectieuses aiguës, hémorragie gastro-intestinale, diabète sucré, maladie d'Addison, déshydratation par vomissements et diarrhées massifs, etc.

Des valeurs diminuées sont retrouvées dans:

- Stades avancés d'insuffisance hépatique décompensée (par ex., coma hépatique), où la fonction hépatique est sévèrement altérée en raison de lésions étendues du parenchyme hépatique

Modifications urinaires

- **Variation physiologique urinaire**

L'excrétion urinaire d'urée varie considérablement selon l'alimentation. Considérée isolément, sa valeur a une signification clinique limitée. L'élimination urinaire de l'urée est de 20 à 35 grammes/jour pour une alimentation normale (mixte), et de seulement 10 grammes/jour pour une alimentation sans protéines.

Valeurs augmentées - régime riche en protéines

Valeurs diminuées - régime végétarien ou pauvre en protéines

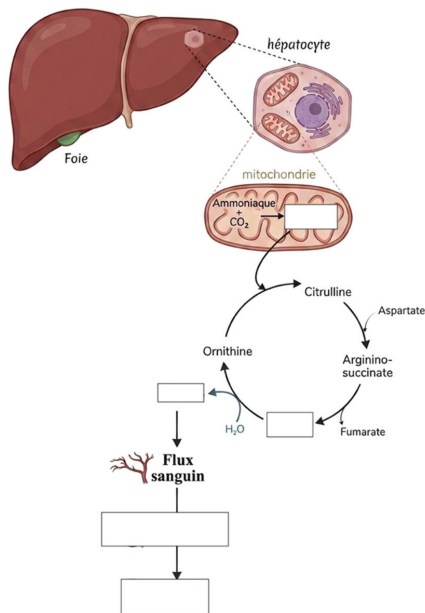
- **Variation pathologique urinaire**

Des valeurs augmentées sont retrouvées en cas d'hypercatabolisme protéique (par ex., en cas de fièvre, traumatisme, brûlures ou hyperthyroïdie)

Des valeurs diminuées sont retrouvées dans l'insuffisance rénale chronique et aiguë et dans l'insuffisance hépatique sévère (insuffisance hépatique décompensée)

Questions

1. Quelles sont les principales sources d'ammoniac dans l'organisme humain ?
2. Expliquez l'effet de l'acidose sur le taux d'ammoniac.
3. Expliquez le rôle de la glutamine.
4. Complétez les composés correspondants dans la figure ci-dessous:



5. Quels sont les principaux facteurs pouvant influencer le taux d'urée sérique ?
6. Pourquoi l'absorbance est-elle lue à 340 nm dans le cas du dosage de l'urée sérique par la méthode enzymatique à l'uréase ?
7. Quelle pourrait être la signification clinique d'une valeur de 159 mg/dl d'urée ?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L9. MÉTABOLISME DES PROTÉINES. DOSAGE DE LA CRÉATININE SÉRIQUE ET URINAIRE

La créatine est synthétisée dans le foie et les reins à partir des acides aminés arginine, glycine et S-adénosyl-méthionine, puis transportée vers les muscles squelettiques et le cerveau, où elle est convertie en composé à haute énergie, la créatine phosphate.

Chaque jour, une petite proportion (1-2%) de la créatine phosphate musculaire subit une déshydratation spontanée, non enzymatique, pour former la créatinine. La production quotidienne de créatinine est proportionnelle à la masse musculaire de l'individu.

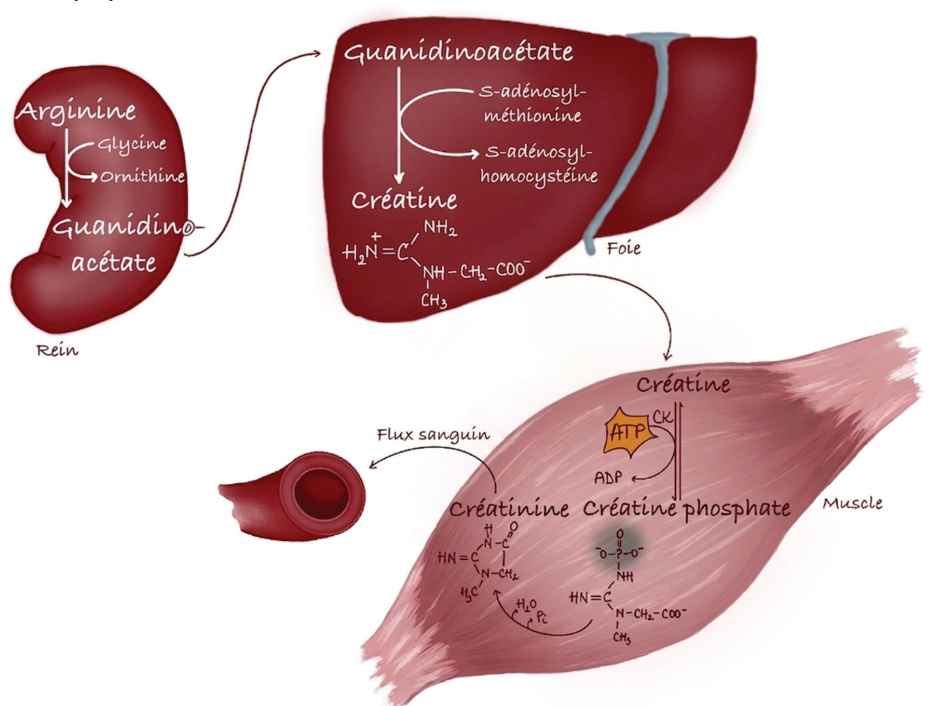


Figure 1. Synthèse de la créatine

Dans la circulation sanguine, la créatinine circule non liée aux protéines plasmatiques, est librement filtrée par les glomérules et excrétée dans l'urine avec une réabsorption tubulaire minimale. Une petite fraction (moins de 10%) de la créatinine urinaire peut être sécrétée par les tubules rénaux. Une diminution de la clairance rénale entraîne une augmentation de la créatinine sanguine.

La principale limite de l'utilisation de la créatinine sérique comme marqueur de la filtration glomérulaire (FG) est sa forte dépendance à la masse musculaire. La production de créatinine varie considérablement d'un individu à l'autre - par exemple, un bodybuilder produira naturellement plus de créatinine qu'un patient cachectique. De plus, la masse musculaire diminue avec l'âge, et les femmes ont généralement moins de masse musculaire que les hommes, autant de facteurs affectant les taux de créatinine sérique. Une consommation élevée de viande peut provoquer des faibles augmentations temporaires de la créatinine sérique en raison de l'absorption de la créatinine issue de la viande ingérée. De même, un exercice physique intense peut entraîner des élévations légères et transitoires des taux de créatinine sérique.

Par conséquent, l'estimation de la FG à partir de la créatinine sérique chez des individus dont la masse musculaire s'écarte de la moyenne peut conduire à des imprécisions.

Il existe deux approches principales pour estimer la FG à partir de la créatinine sérique:

- Interprétation directe de la concentration de créatinine sérique: cette méthode est problématique car l'intervalle de référence varie selon l'âge et le sexe, ce qui rend difficile pour les cliniciens d'évaluer précisément la fonction rénale sur la seule base des taux de créatinine.
- Estimation par calcul: des estimations plus précises de la FG sont obtenues en utilisant des formules intégrant la créatinine sérique ainsi que l'âge, le sexe et parfois l'origine ethnique (par ex., les personnes afro-américaines ont généralement une masse musculaire plus importante). Ces calculs fournissent des résultats en unités standardisées de FG (par ex., mL/s), facilitant une interprétation clinique plus claire. Un exemple largement utilisé est l'équation MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), en particulier la version à quatre variables incluant la créatinine sérique, l'âge, le sexe et l'origine ethnique. L'équation MDRD est recommandée pour le dépistage populationnel d'une FG réduite. Cependant, elle n'est pas applicable aux enfants ni aux femmes enceintes.

Une autre question importante concerne la méthode utilisée pour mesurer la créatinine. La méthode conventionnelle de Jaffé, qui implique une réaction avec l'acide picrique en milieu alcalin, est sensible aux interférences de plusieurs substances (telles que l'acétoacétate, les protéines et le glucose) pouvant entraîner des résultats faussement élevés. Diverses modifications de la méthode visent à réduire ces interférences. Une méthode enzymatique de dosage de la créatinine a également été développée, offrant l'avantage de moins d'interférences. Bien que cette méthode tende à donner des valeurs systématiquement inférieures à celles de la méthode de Jaffé, la signification clinique de cette différence reste débattue.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage de la créatinine sérique et urinaire - méthode de Jaffé (variante Popper - Mandel - Mayer)

Principe

La créatinine du liquide biologique réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin, formant un composé rouge-orangé. L'absorbance de ce complexe à 520 nm est directement proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon. Cependant, plusieurs substances couramment présentes dans le sérum (telles que l'acide ascorbique, l'acétone, l'acide pyruvique, l'acide acétoacétique, le glucose, l'acide urique, les protéines et certains antibiotiques) peuvent interférer avec cette réaction, entraînant des résultats inexacts. Pour résoudre ce problème, diverses versions modifiées de la méthode ont été développées afin de minimiser les interférences. La méthode décrite ci-dessous utilise l'acide picrique à la fois comme agent déprotéinisant et comme réactif colorant.

Procédure

Réactifs, ml	Sérum	Urine	Étalon	Blanc
Surnageant sérique	0,2	-	-	-
Surnageant urinaire	-	0,2	-	-
Créatinine étalon	-	-	0,2	-
Eau distillée	-	-	-	0,2
Acide picrique	0,6	0,6	0,6	0,6
NaOH	0,1	0,1	0,1	0,1

Les tubes sont mélangés, laissés reposer 20 minutes à température ambiante. Les absorbances du sérum, de l'urine et de l'étalon sont mesurées à 530 nm, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec le blanc.

Calcul

Les concentrations de créatinine dans le sérum et l'urine sont calculées avec les formules:

$$\text{sérum créatinine (mg/dl)} = \frac{A_{\text{sérum}}}{A_{\text{étalon}}} \times c_{\text{étalon}} = \frac{A_{\text{sérum}}}{A_{\text{étalon}}} \times 2$$

$$\text{créatinine urinaire (g/l)} = \frac{A_{\text{urine}}}{A_{\text{étalon}}} \times c_{\text{étalon}} = \frac{A_{\text{urine}}}{A_{\text{étalon}}} \times 2$$

Valeurs normales

Sérum: 0,4 - 1,5 mg/dl (45 - 95 µmol/litre)

Urine: 1 - 1,8 g / 24 heures (8,8 - 13,3 mmol / 24 heures)

Valeurs pathologiques

Des valeurs supérieures à la normale apparaissent dans des maladies telles que la néphropathie aiguë et chronique, les maladies affectant le muscle (dystrophie musculaire progressive, myasthénie grave).

Clairance de la créatinine endogène

La quantité de créatinine dépendant de la masse musculaire et de l'élimination rénale par filtration glomérulaire, le dosage de la créatinine et le calcul de la clairance de la créatinine constituent également des méthodes d'investigation de la fonction rénale.

La clairance de la créatinine représente le volume de plasma (en millilitres) épuré de créatinine par les reins par minute. Le résultat est souvent ajusté à une surface corporelle standard à l'aide du poids et de la taille du patient. Ce test est fréquemment utilisé pour estimer le débit de filtration glomérulaire (DFG), en particulier chez les personnes présentant des symptômes ou des antécédents de maladie rénale, ainsi que chez les patients à risque de toxicité rénale due à des médicaments tels que certains antibiotiques.

Pour réaliser ce test avec précision, un recueil d'urine de 24 heures est nécessaire.

Calcul de la clairance de la créatinine

$$C_{cr}(ml/min) = \frac{U \times V}{P \times 1440}$$

où: U = concentration de créatinine dans l'urine (mg / ml)

V = volume d'urine (ml en 24 heures)

P = concentration de créatinine dans le sérum (ou le plasma) (mg / ml)

1440 = minutes en 24 heures

Valeurs normales: 95 - 150 ml / min

Valeurs pathologiques

Dans les néphropathies aiguës et chroniques, la clairance de la créatinine endogène diminue avant que la créatinine sérique n'augmente.

Questions

1. Complétez les espaces: la créatine est produite dans le _____ et le _____ à partir des acides aminés: _____, _____ et _____, puis transportée vers le _____ et le _____, où elle est convertie en composé à haute énergie appelé _____, qui subit une déshydratation spontanée, non enzymatique, pour former la _____.

2. Expliquez la différence entre la créatine et la créatinine.

3. Quels facteurs peuvent influencer le taux de créatinine sérique ?

4. Que représente la formule suivante ? Fournissez une explication pour chaque terme.

$$C_{cr}(ml/min) = \frac{U \times V}{P \times 1440}$$

U = _____
V = _____

P = _____
1440 = _____

5. Décrivez le principe du dosage de la créatinine par la méthode de Jaffé.

6. Parmi les marqueurs biochimiques que vous avez étudiés, lesquels sont utilisés pour explorer la fonction rénale ? Lequel est le meilleur et pourquoi ?

7. Indiquez si les affirmations suivantes sont vraies ou fausses

- Le taux de créatinine sérique est plus élevé chez une personne âgée que chez un jeune adulte.
- La clairance de la créatinine est basse chez un patient présentant un dysfonctionnement rénal.
- Le taux de créatinine sérique est plus élevé chez un adulte fréquentant régulièrement la salle de sport que chez un individu sédentaire.

8. Un patient de 70 ans se présente avec des mictions fréquentes, notamment nocturnes, en petites quantités, et une dysurie. Les analyses de laboratoire indiquent les résultats suivants: glycémie à jeun = 80 mg/dL (75-115 mg/dL), HbA1c = 5% (4-6%), créatinine sérique = 2,5 mg/dL (F<0,9 mg/dL; H<1,1 mg/dL), ALAT = 15 U/L (10-29 U/L), ASAT = 17 U/L (10-25 U/L).

Quel organe pourrait être atteint et pourquoi?

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L10. MÉTABOLISME DES PROTÉINES. DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE ET DE LA BILIRUBINE

L'hème est constitué d'un cycle *porphyrine* renfermant un ion fer central.

Fonctions de l'hème:

Chimie redox

- transport d'électrons: cytochromes de la chaîne respiratoire
- catalyse enzymatique: cytochrome P450, cyclooxygénase, autres

Liaison réversible des gaz

- O₂: hémoglobine et myoglobine (80-90% de tout l'hème)
- NO: guanylate cyclase

Dans l'hémoglobine et la myoglobine, le fer de l'hème reste à l'état *ferreux* ou Fe²⁺ tout au long du cycle de liaison et de libération de l'oxygène. Dans les enzymes redox-actives et dans la chaîne respiratoire, l'hème oscille régulièrement entre les états ferreux et *ferrique* ou Fe³⁺.

Biosynthèse de l'hème

L'hème contenu dans les aliments est absorbé au niveau intestinal, mais cela n'est pertinent qu'en raison du fer qu'il contient. Le cycle porphyrine organique est en grande partie synthétisé de novo. La voie de synthèse est répartie entre deux compartiments; les étapes initiale et finale ont lieu dans les mitochondries, tandis que les étapes intermédiaires se déroulent dans le cytosol. L'hème exerce une inhibition rétroactive sur la première étape de la voie.

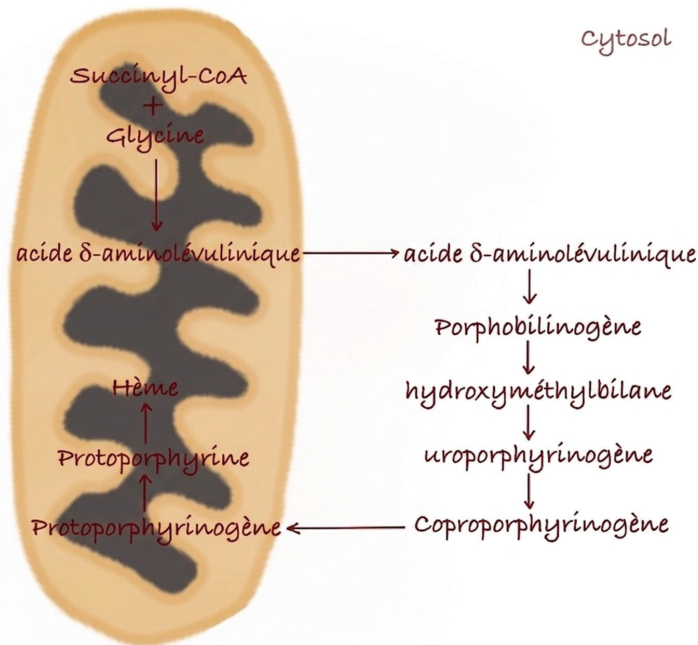


Figure 1. Biosynthèse de l'hème

La première réaction de la voie de synthèse des porphyrines a lieu dans les mitochondries. La glycine forme une base de Schiff avec le phosphate de pyridoxal (PLP) au niveau de l'enzyme aminolévulinate synthase. La réaction de l'aminolévulinate synthase constitue l'étape engagée de la synthèse de l'hème et est soumise à une inhibition rétroactive par l'hème, le produit final de la voie. Le produit de la réaction, l'acide δ -aminolévulinique (ALA), est transporté vers le cytosol, où se déroulent les quatre réactions suivantes. La synthèse de l'hème s'achève par l'insertion du fer, catalysée par la ferrochélatase.

Perturbations de la synthèse de l'hème:

- anomalies enzymatiques héréditaires (porphyries)
- déplétion en fer
- déficit en vitamine B₆ - inhibition de l'aminolévulinate synthase
- intoxication au plomb - inhibition de la porphobilinogène synthase

Des déficits héréditaires sont connus pour chacune des enzymes de la voie de synthèse. Les symptômes cliniques résultent à la fois du manque d'hème et de l'accumulation d'intermédiaires biosynthétiques. L'hème exerce une inhibition rétroactive sur la première enzyme de la voie de synthèse, à savoir l' δ -ALA synthase. Un manque d'hème lève donc l'inhibition de cette enzyme et amplifie l'accumulation d'intermédiaires en amont de l'anomalie enzymatique en cause. Les intermédiaires synthétiques accumulés subissent souvent une conversion spontanée en produits aberrants.

L'inhibition de la synthèse de l'hème peut également résulter de causes autres que des anomalies enzymatiques. La cause la plus fréquente est la déplétion en fer; une autre est le déficit en vitamine B₆, pouvant résulter d'une malnutrition ou, dans les maladies intestinales inflammatoires, d'une malabsorption. La vitamine B₆ (pyridoxine) est le précurseur du phosphate de pyridoxal, la coenzyme de l'aminolévulinate synthase. L'intoxication au plomb provoque une inhibition de la porphobilinogène synthase.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage de l'hémoglobine sous forme de cyanméthémoglobine

Le dosage de l'hémoglobine (Hb) est utilisé pour aider au diagnostic de l'anémie, des hémorragies et d'autres troubles hématologiques. Il fournit des informations plus précieuses que la numération des globules rouges (GR) pour l'évaluation de l'anémie. Normalement, des taux d'Hb inférieurs à 12 g/dL chez l'homme et 10 g/dL chez la femme indiquent une anémie. Une Hb basse peut également survenir dans les hémoglobinopathies, où des types anormaux d'Hb (tels que l'Hb S dans la drépanocytose) remplacent les types normaux (Hb A, A₂, et F). Dans l'anémie ferriprive, les taux d'Hb sont réduits, et les GR apparaissent hypochromes (plus pâles) et microcytaires (plus petits). Pendant la grossesse, la concentration d'Hb diminue naturellement en raison de l'expansion du volume plasmatique, une condition connue sous le nom d'anémie physiologique de la grossesse.

Principe

La méthode à la cyanméthémoglobine est la technique privilégiée pour mesurer l'hémoglobine car elle offre un étalon stable, est facile d'utilisation, et est compatible avec les analyseurs automatisés. Dans cette méthode, le sang du patient est dilué avec une solution contenant du ferricyanure de potassium et du cyanure de potassium, qui réagissent avec l'hémoglobine pour former de la cyanméthémoglobine. L'absorbance de ce composé est ensuite mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et comparée à un étalon pour déterminer la concentration d'hémoglobine.

Procédure

20 µl de sang sont pipetés directement dans **5 mL de solution de Drabkin**. Les échantillons sont mélangés et laissés reposer 20 minutes à température ambiante. L'absorbance de l'échantillon est lue à 540 nm, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec la solution de Drabkin.

Calcul

En l'absence d'un étalon de cyanméthémoglobine, la concentration d'Hb est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$Hb(g/dl) = \frac{A_{\text{échantillon}} \times 16144}{11000 \times 1} \times 10^{-1} \times \frac{5,02}{0,02} = A_{\text{échantillon}} \times 36,8$$

Où:

- 11000 = le coefficient d'extinction molaire de l'Hb ($l \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)
- 16144 = la masse moléculaire de l'Hb (g/mol)
- 5,02 = volume total ajouté (ml)
- 0,02 = volume d'échantillon ajouté (ml)
- 1 = longueur du trajet optique en cm
- 10^{-1} = conversion de l en dl

Valeurs normales: Hommes: 14 - 16 g/dL; Femmes: 12 - 14 g/dL

Signification clinique

- **L'hémoglobine diminue** dans des affections telles que l'anémie, la maladie de Crohn, l'insuffisance rénale chronique, la glomérulonéphrite chronique, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, l'hyperhydratation, et en cas d'infiltration ou de suppression de la moelle osseuse.
- **L'hémoglobine augmente** dans la déshydratation, la polyglobulie (y compris la polyglobulie de Vaquez), et la polyglobulie secondaire associée à une hypoxie chronique, une encéphalite ou certaines tumeurs (par ex., tumeurs cérébrales, ou affections provoquant une production accrue d'érythropoïétine).

Dégradation de l'hème

L'hème est un cycle porphyrine composé de quatre sous-unités pyrrole reliées par des ponts méthine, avec un atome de fer central. La bilirubine est produite par un processus de dégradation enzymatique en deux étapes ayant lieu principalement dans les cellules du système réticulo-endothélial, notamment dans la rate, ainsi que dans les cellules de Kupffer hépatiques et les phagocytes. Ces cellules internalisent l'hème, sur lequel agit d'abord l'hème oxygénase, qui constitue l'étape limitante de la formation de bilirubine. Cette enzyme catalyse le clivage oxydatif du pont α -méthène, libérant le fer chélaté et générant du monoxyde de carbone en quantité équimolaire, ensuite exhalé par les poumons. La réaction produit également de la biliverdine, un pigment vert, qui est ensuite réduite en bilirubine, un pigment jaune-orangé, par l'enzyme NADPH-dépendante biliverdine réductase. La molécule de bilirubine résultante présente une conformation compacte, stabilisée par liaisons hydrogène, la rendant pratiquement insoluble dans les solutions aqueuses à pH neutre.

Dans la circulation, la bilirubine est transportée liée de manière non covalente mais réversible à l'albumine sérique, facilitant sa solubilité et sa distribution systémique, tout en empêchant sa diffusion dans les tissus ou sa filtration par les reins.

À son arrivée au foie, le complexe albumine-bilirubine est exposé à la microcirculation hépatique hautement perméable, ce qui facilite son contact avec la surface sinusoïdale des hépatocytes. À cette interface, la bilirubine se dissocie de l'albumine et pénètre dans les hépatocytes par deux mécanismes principaux: la diffusion passive et l'endocytose médiée par récepteurs. Ce processus de captation permet un transfert efficace de la bilirubine de la circulation sanguine vers les cellules hépatiques pour un traitement ultérieur.

La conjugaison est essentielle pour rendre la bilirubine hydrosoluble, permettant son transport à travers la membrane canaliculaire et son excrétion ultérieure dans la bile. Au sein des hépatocytes, la bilirubine est conjuguée à l'acide glucuronique par des enzymes de la famille des uridine diphosphate-glucuronosyltransférases (UDP-glucuronosyltransférase/UDPGT). Ce processus de glucuronidation, une voie de détoxification importante, aboutit généralement à la formation de bilirubine diglucuronide par estérification de deux résidus d'acide glucuronique sur les chaînes latérales d'acide propionique de la bilirubine. Dans des conditions normales, le diglucuronide est la forme prédominante; cependant, lorsque la production de bilirubine dépasse la capacité de conjugaison, les formes monoglucuronides peuvent prédominer.

Seule la bilirubine conjuguée peut être sécrétée dans la bile, qui est ensuite acheminée vers l'intestin grêle; en raison de son hydrophilie et de sa grande taille moléculaire, la bilirubine conjuguée ne peut pas être absorbée par la muqueuse intestinale. À son arrivée dans l'iléon distal et le côlon, la bilirubine conjuguée est déconjuguée par des β -glucuronidases bactériennes puis réabsorbée, entrant dans le *cycle entérohépatique*. La bilirubine peut également être réduite par le microbiote intestinal en métabolites incolores collectivement appelés urobilinoïdes, principalement l'urobilinogène et le stercobilinogène. La plupart de ces composés sont ensuite oxydés en urobiline et stercobiline, qui confèrent aux selles leur couleur caractéristique. Une partie de l'urobilinogène sera réabsorbée, entrera dans le *cycle entérohépatique*, et une petite partie, à partir du sang, sera excrétée dans l'urine où elle est convertie en une forme oxydée, l'urobiline, qui confère à l'urine sa couleur jaune caractéristique.

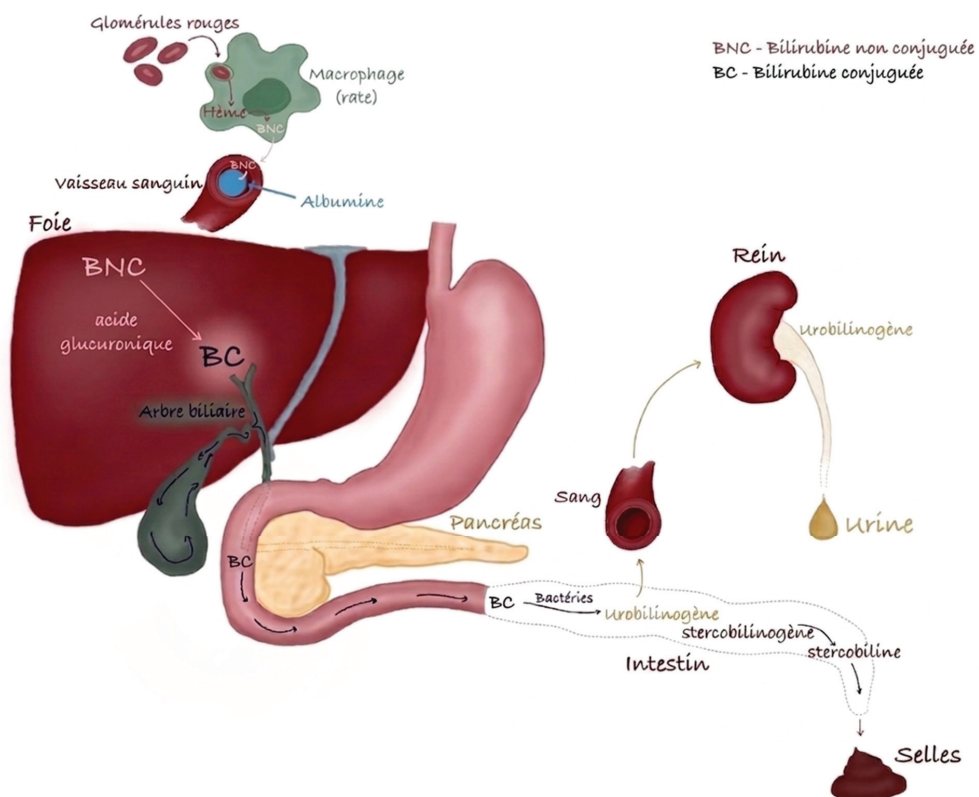


Figure 2. Circuit de la bilirubine

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage de la bilirubine

Principe

Les méthodes couramment utilisées pour le dosage de la bilirubine sérique reposent sur la réaction diazoïque d'Ehrlich. Dans cette réaction, la bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazoté pour former des composés de couleur rouge appelés azodipyrroles - un processus appelé réaction diazoïque. Van der Bergh et Mueller furent les premiers à utiliser cette réaction pour doser la bilirubine sérique, et de nombreuses modifications ont été apportées depuis.

La méthode la plus largement acceptée aujourd'hui est une modification de la méthode diazoïque de Jendrassik et Grof. Dans cette procédure, la bilirubine conjuguée (également appelée bilirubine directe) réagit directement avec l'acide sulfanilique diazoté. La bilirubine totale est mesurée après l'ajout d'un accélérateur en milieu alcalin, ce qui permet à la fois à la bilirubine conjuguée et non conjuguée de réagir.

La bilirubine non conjuguée (bilirubine indirecte) est ensuite calculée par soustraction de la bilirubine directe de la bilirubine totale.

Réactifs:

- R1 = acide sulfanilique 29 mmoles/l; HCl 0,17 moles/l;
- R2 = nitrite de sodium 25 mmoles/l;
- R3 = caféine 0,26 moles/l; benzoate de sodium 0,52 moles/l;
- R4 = tartrate 0,93 moles/l; NaOH 1,9 moles/l;
- NaCl 0,9 % (sérum physiologique);

Interférences:

- L'hémolyse entraîne de fausses valeurs basses car, dans de nombreux dosages, l'absorbance de l'échantillon témoin augmente.
- Les sérums lipémiques donnent de fausses valeurs élevées en raison de l'effet de turbidité.
- La bilirubine est détruite par la lumière et la chaleur, éléments à prendre en compte lors des dosages.

Procédure pour la bilirubine directe

Réactifs (µl)	Échantillon	Blanc
R1	200	200
R2	50	-
NaCl 0,9 %	2000	2000
Sérum	200	200

Incuber 5 minutes à température ambiante.

Mesurer l'extinction de l'échantillon contre le blanc à 540 nm.

Calcul

$$\text{bilirubine directe (mg/dl)} = A_p \times 13.7$$

Procédure pour la bilirubine totale

Réactifs (µl)	Échantillon	Blanc
R1	200	200
R2	50	-
R3	1000	1000
Sérum	200	200
Incuber 30 minutes à température ambiante		
R4	1000	1000
Incuber 5 minutes à température ambiante		

Mesurer l'extinction de l'échantillon contre le blanc à 578 nm.

Calcul:

$$\text{bilirubine totale (mg/dl)} = A_p \times 10.8$$

La bilirubine non conjuguée (bilirubine indirecte) est ensuite calculée par soustraction:

$$\text{Bilirubine indirecte} = \text{Bilirubine totale} - \text{Bilirubine directe}$$

Valeurs normales

Bilirubine directe: < 0,2 mg/dl

Bilirubine totale: < 1,0 mg/dl

Bilirubine indirecte: < 0,8 mg/dl

Signification clinique

La bilirubine est le produit final du catabolisme de l'hème. Brièvement, son métabolisme comprend trois étapes clés: production (à partir de la dégradation de l'hème), conjugaison dans le foie, et excrétion dans la bile. Une perturbation de l'une de ces étapes peut entraîner une hyperbilirubinémie, se manifestant cliniquement par un **ictère** (accumulation de bilirubine dans l'organisme). Le terme ictère, en français, dérive du latin *icterus*, tandis que « jaunisse » vient du mot français « jaune », signifiant « jaune ». Selon le mécanisme sous-jacent, l'ictère est habituellement classé en:

- ictère pré-hépatique
- ictère hépatique
- ictère post-hépatique

Une catégorie distincte est l'ictère du nouveau-né, qui présente des considérations physiologiques et pathologiques propres.

1. Ictère pré-hépatique (hémolytique)

Cette forme résulte d'une production accrue de bilirubine due à une dégradation excessive des globules rouges, dépassant la capacité de conjugaison du foie. Les causes comprennent les anémies hémolytiques (par ex., sphérocytose héréditaire, drépanocytose, déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase), l'hémolyse auto-immune et l'hémolyse secondaire à des infections ou des toxines. Les résultats de laboratoire montrent généralement une bilirubine non conjuguée (indirecte) élevée dans le plasma, une absence de bilirubine dans l'urine (la bilirubine non conjuguée étant fortement liée à l'albumine dans la circulation sanguine, elle ne peut pas traverser la barrière de filtration glomérulaire dans des conditions normales et n'est donc pas excrétée dans l'urine - par conséquent, même en présence de taux sériques élevés, la bilirubine non conjuguée est absente de l'urine). L'ictère

associé à une hyperbilirubinémie non conjuguée est appelé ictère acholurique en raison de l'absence de coloration de l'urine. Cependant, le foie conjugue autant de bilirubine que possible, mais la charge est si élevée que davantage de bilirubine conjuguée est produite et excrétée dans la bile. Dans l'intestin, les bactéries convertissent une grande partie de cette bilirubine en urobilinogène. Par conséquent, davantage d'urobilinogène est réabsorbé dans la circulation porte et dans l'urine, élevant les taux d'urobilinogène urinaire. Les selles conservent généralement une couleur normale.

2. Ictère hépatique (hépatocellulaire)

Celui-ci survient lorsque la capacité du foie à conjuguer ou excréter la bilirubine est altérée. Les causes comprennent l'hépatite virale, la maladie hépatique alcoolique, les lésions hépatiques médicamenteuses, la cirrhose. Selon l'anomalie prédominante, la bilirubine directe (conjuguée) et indirecte (non conjuguée) peuvent toutes deux être élevées. L'urine peut contenir de la bilirubine conjuguée (ce qui lui donnera une couleur foncée) et des taux variables (généralement élevés) d'urobilinogène. Les selles peuvent être normales ou pâles si l'excrétion est significativement altérée.

3. Ictère post-hépatique (obstructif)

Celui-ci résulte d'un blocage mécanique du flux biliaire après conjugaison, empêchant la bilirubine d'atteindre l'intestin. Les causes courantes comprennent les calculs biliaires, les tumeurs pancréatiques ou biliaires, et les sténoses biliaires. Les résultats de laboratoire montrent une augmentation marquée de la bilirubine directe dans le plasma, une bilirubinurie (urine foncée), et une absence (ou des taux très faibles) d'urobilinogène dans l'urine. Les selles sont généralement pâles ou décolorées en raison de l'absence de stercobiline.

4. Ictère néonatal

L'ictère néonatal désigne la manifestation clinique d'une élévation de la bilirubine sérique totale, une affection appelée hyperbilirubinémie néonatale, résultant du dépôt de bilirubine dans la peau et d'autres tissus. C'est l'affection médicale la plus fréquente observée au cours des deux premières semaines de vie; elle touche environ 60% des nouveau-nés à terme et jusqu'à 80% des prématurés au cours de la première semaine après la naissance. Dans la plupart des cas, l'ictère néonatal est léger, transitoire et spontanément résolutif, représentant un **ictère physiologique**. Ce type d'ictère est causé par une production accrue de bilirubine due à l'hémolyse des érythrocytes et à un système métabolique de la bilirubine immature. Cependant, il est essentiel de distinguer cette forme bénigne de l'ictère pathologique, qui nécessite une évaluation et un traitement rapides. L'hyperbilirubinémie néonatale est globalement classée en:

- Hyperbilirubinémie non conjuguée - le type le plus fréquent, généralement associé à un ictère physiologique, à l'ictère de l'allaitement, à l'hémolyse, ou à une conjugaison altérée.
- Hyperbilirubinémie conjuguée - toujours pathologique, indiquant une maladie hépatocellulaire sous-jacente ou une obstruction biliaire, et nécessitant une investigation urgente.

Lorsqu'un ictère est détecté, l'identification de la cause sous-jacente est cruciale. Bien que la majorité des nouveau-nés présentent une hyperbilirubinémie non conjuguée, l'hyperbilirubinémie conjuguée ne doit pas être négligée, car elle signale un trouble médical ou chirurgical tel que l'atrésie biliaire, l'hépatite néonatale ou une maladie métabolique. Le défaut de reconnaissance et de traitement de l'ictère pathologique, en particulier l'hyperbilirubinémie non conjuguée sévère, peut entraîner une encéphalopathie bilirubinique et ses séquelles neurologiques irréversibles, connues sous le nom d'ictère nucléaire (kernicterus). Une différenciation précoce entre ictère physiologique et pathologique, associée à une surveillance et une intervention appropriées, est essentielle pour prévenir les complications et assurer un devenir néonatal optimal.

5. Troubles génétiques provoquant un ictère

- **Syndrome de Gilbert**

Le syndrome de Gilbert est un trouble héréditaire courant du métabolisme hépatique de la bilirubine, transmis selon un mode autosomique récessif. Il entraîne une hyperbilirubinémie non conjuguée légère à modérée, se manifestant généralement par des épisodes intermittents d'ictère. Le pronostic global est excellent, l'affection n'évoluant pas vers une atteinte hépatique significative. Cependant, les personnes atteintes peuvent présenter une susceptibilité accrue à la toxicité médicamenteuse lors de l'exposition à des médicaments interférant avec la conjugaison ou la clairance de la bilirubine. Sur le plan biochimique, les patients atteints du syndrome de Gilbert présentent des élévations isolées de bilirubine non conjuguée, tandis que les autres paramètres de la fonction hépatique restent dans les limites normales. L'affection est généralement asymptomatique et ne nécessite pas d'intervention thérapeutique. Néanmoins, certains facteurs de stress physiologiques ou environnementaux, tels que le jeûne, une maladie intercurrente, la déshydratation ou les menstruations, peuvent précipiter un ictère visible.

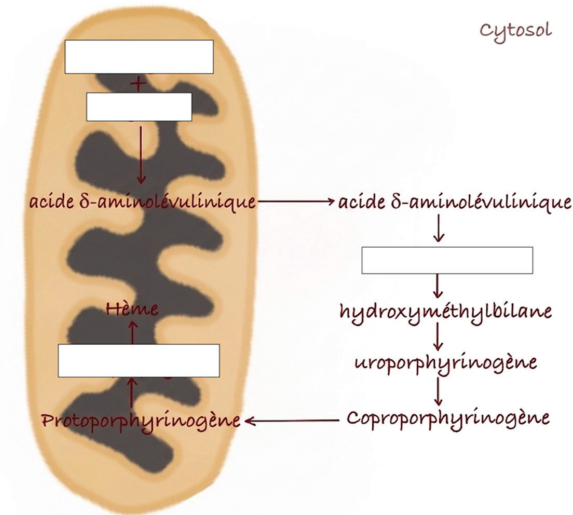
- **Syndrome de Crigler-Najjar**

Le syndrome de Crigler-Najjar est un trouble congénital rare, autosomique récessif, caractérisé par un ictère non hémolytique. L'affection résulte de mutations du gène UGT1A1, entraînant soit une absence complète de l'enzyme UDP-glucuronosyltransférase (type I), soit une activité enzymatique profondément réduite (type II). Cette enzyme étant essentielle à la conjugaison hépatique de la bilirubine, son déficit provoque une hyperbilirubinémie non conjuguée marquée, apparaissant généralement peu après la naissance. Dans sa forme sévère (type I), les taux de bilirubine peuvent atteindre des concentrations neurotoxiques, entraînant un risque élevé d'ictère nucléaire et de lésions neurologiques permanentes en l'absence de traitement. Une reconnaissance précoce et une intervention rapide sont essentielles pour prévenir des complications irréversibles.

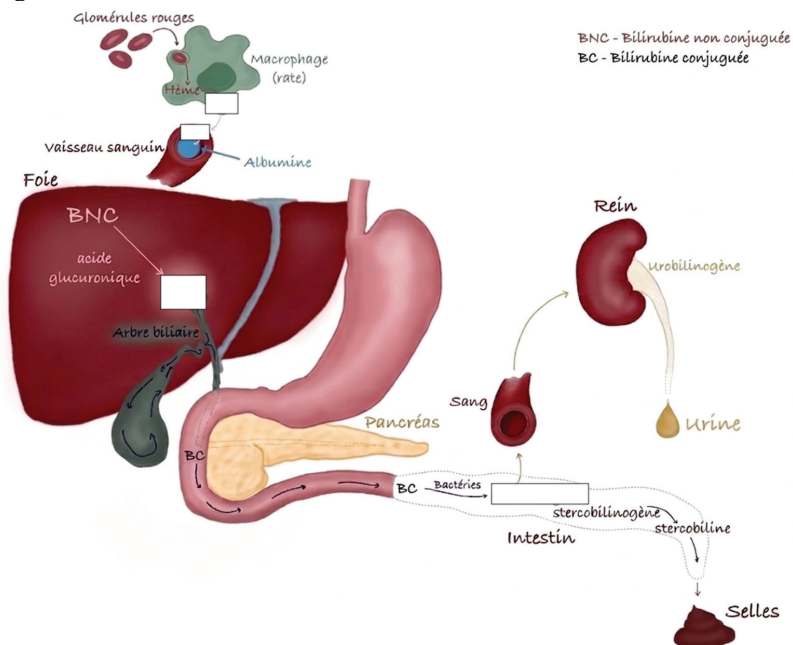
Questions

1. Fournissez les composés corrects pour compléter la figure ci-dessous:

Biosynthèse de l'hème:



Dégradation de l'hème:



2. Quelles méthodes ont été utilisées en laboratoire pour le dosage de l'hémoglobine et de la bilirubine, et quels sont les principes sous-jacents de ces méthodes ?

3. Pour chacune des pathologies suivantes, choisissez le type d'ictère associé:

Pathologie	Type d'ictère
Hépatite	Ictère pré-hépatique
Lésion hépatique médicamenteuse	
Calculs biliaires	
Anémie hémolytique	Ictère hépatique
Cancer du pancréas	
Déficit en glucuronyltransférase	
	Ictère post-hépatique

4. Complétez le tableau suivant avec les informations appropriées:

	PLASMA		URINE			SELLES	
	Bilirubine indirecte	Bilirubine directe	Urobilinogène	Bilirubine directe	Couleur	Stercobiline	Couleur
Ictère pré-hépatique						Normale	Normale
Ictère hépatique							
Ictère post-hépatique			ou absent		Foncée		

5. Quelles affections cliniques pourrait suggérer un taux d'hémoglobine de 7 g/dL chez un patient de 60 ans?
6. Que pourrait indiquer une concentration de bilirubine totale de 10 mg/dl chez un nouveau-né?
7. Dans quelles circonstances l'urobilinogène peut-il être absent de l'urine?
8. Quelle forme de bilirubine peut être détectée dans l'urine, et que suggère sa présence sur le plan clinique?
9. Quelles autres modifications de biomarqueurs pourraient être associées à un ictère préhépatique/hépatique/posthépatique?

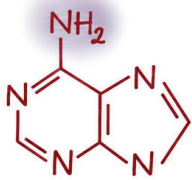
Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

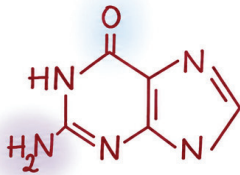
L11. MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES. DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE

Les acides nucléiques sont des composants fondamentaux et universels de tous les organismes vivants. En tant que macromolécules informationnelles, ils jouent un rôle central dans le stockage, la transmission et l'expression du patrimoine génétique nécessaire à la vie. Structuellement, les acides nucléiques sont des polymères de haut poids moléculaire appelés polynucléotides. Ils sont composés d'unités monomériques répétées appelées nucléotides, reliées de manière covalente par des liaisons phosphodiester 3'-5'. Chaque nucléotide comprend trois composants clés:

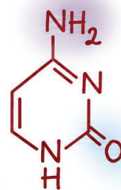
- **une base azotée** - un hétérocycle aromatique (purine: A, G et pyrimidine: C, T, U)
- **un pentose** (ribose ou désoxyribose)
- **un groupe phosphate**



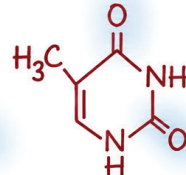
Adénine



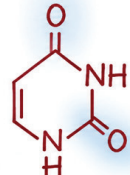
Guanine



Cytosine



Thymine



Uracil

Il existe deux principaux types d'acides nucléiques: l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN). Tous deux sont essentiels à la structure, au fonctionnement et à la régulation des cellules, mais diffèrent sur plusieurs aspects clés, notamment leur composition chimique, leur structure et leurs rôles biologiques.

L'ADN est le matériel héréditaire de la plupart des organismes vivants. Il stocke et préserve les instructions génétiques utilisées dans le développement, le fonctionnement et la reproduction de toutes les formes de vie connues et de nombreux virus. L'ADN se trouve principalement dans le noyau cellulaire (une partie se trouvant aussi dans les mitochondries et les chloroplastes) et est stable dans les conditions cellulaires, permettant ainsi le stockage à long terme de l'information génétique. Il est capable d'autoréplication, assurant sa transmission aux cellules filles.

La molécule d'ADN est généralement constituée de deux brins polynucléotidiques complémentaires. Ces brins sont maintenus ensemble par des liaisons hydrogène spécifiques entre les bases azotées appariées: l'adénine (A) s'apparie avec la thymine (T) via deux liaisons hydrogène, tandis que la guanine (G) s'apparie avec la cytosine (C) via trois liaisons hydrogène. Il est important de noter que les deux brins sont antiparallèles - l'un s'oriente dans la direction 5' vers 3', et l'autre dans la direction 3' vers 5', et ensemble ils forment une double hélice droite autour d'un axe central imaginaire.

L'ARN joue un rôle essentiel dans l'expression de l'information génétique. Il agit comme intermédiaire entre l'ADN et la synthèse protéique, mais joue également des rôles régulateurs, structuraux et catalytiques. L'ARN se trouve principalement dans le cytoplasme, bien qu'il soit également présent dans le noyau. L'ARN est moins stable que l'ADN, en raison du groupe 2'-OH réactif, et il est polyvalent dans sa fonction:

- **ARNm (ARN messenger):** transporte l'information génétique de l'ADN vers les ribosomes pour la synthèse protéique.

- ARNt (ARN de transfert): apporte les acides aminés au ribosome pendant la traduction.
- ARNr (ARN ribosomique): composant structurel et fonctionnel des ribosomes.
- ARN régulateurs: tels que les microARN (miARN) et les petits ARN interférents (siARN), impliqués dans le contrôle de l'expression génique.
- ARN catalytiques: également appelés ribozymes, capables d'activité enzymatique.

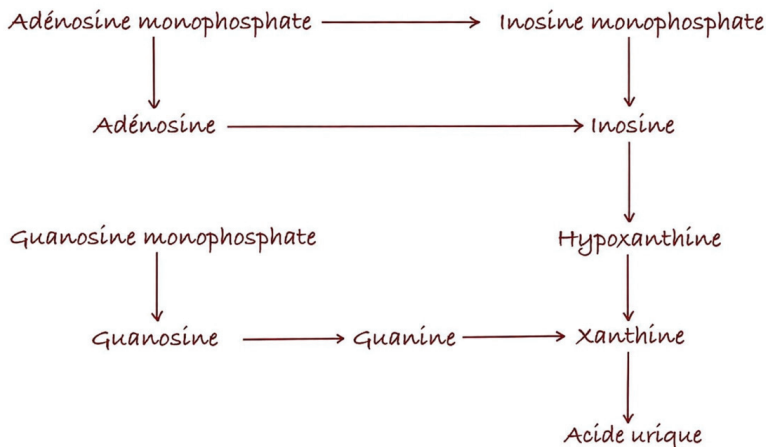
Catabolisme des acides nucléiques

Le catabolisme des acides nucléiques implique leur dégradation enzymatique en leurs éléments constitutifs: bases azotées, pentoses et acide phosphorique. Les principales étapes du catabolisme des acides nucléiques sont:

1. Hydrolyse des polynucléotides en nucléotides: **les désoxyribonucléases** (DNases) et les **ribonucléases** (RNases) dégradent l'ADN et l'ARN en mononucléotides.
2. Dégradation des nucléotides en nucléosides et phosphate libre: **les nucléotidases** éliminent les groupes phosphate, produisant des nucléosides.
3. Dégradation des nucléosides en bases azotées et sucres: **les nucléosidases** ou les **nucléoside phosphorylases** scindent ensuite les nucléosides en bases azotées libres et pentoses (ribose ou désoxyribose).
4. Catabolisme ultérieur des bases puriques et pyrimidiques en produits d'excrétion finaux.
 - Les pyrimidines sont dégradées en produits hydrosolubles et facilement excrétés: CO_2 , H_2O et NH_3 .
 - Les purines sont dégradées en acide urique (2,6,8-trihydroxypurine).

Catabolisme des purines

Initialement, le cycle purique subit une désamination, suivie d'une oxydation progressive en hypoxanthine, xanthine, et finalement en acide urique. Chez l'humain et les primates supérieurs, l'acide urique est le produit final du catabolisme des purines. Cependant, chez la plupart des mammifères, l'acide urique est encore dégradé en allantoiné (via l'enzyme uricase).



L'acide urique, produit principalement dans le foie à partir de purines endogènes et exogènes. La concentration normale d'acide urique dans le sérum se situe entre 1 et 7 mg/100 mL, correspondant à un pool total d'urate dans l'organisme d'environ 1 gramme. Environ les deux tiers de l'acide urique sont excrétés par les reins dans l'urine via sécrétion tubulaire, tandis que le tiers restant est éliminé par l'intestin.

L'acide urique est un acide faible ayant un pKa de 5,75 dans le sang et de 5,25 dans l'urine. Au pH physiologique de 7,4 du compartiment extracellulaire, environ 98% de l'acide urique circule sous sa forme ionisée, en tant qu'anion urate. En raison de la concentration élevée de Na⁺ dans le liquide extracellulaire, l'urate se trouve principalement sous forme d'urate monosodique, dont la limite de solubilité est de 6 mg/dL (360 µmol/L). Lorsque les concentrations d'urate dépassent ce seuil de solubilité, le risque de formation et de précipitation de cristaux d'urate monosodique augmente. Sur le plan pathologique, le pool d'urate peut augmenter jusqu'à 25-30 grammes en raison soit d'une excrétion rénale altérée (dans 70-80% des cas), soit d'une production accrue (20% des cas). Cela entraîne une élévation des taux sériques d'acide urique, et l'acide urique étant peu soluble, il peut se déposer dans les tissus mous, provoquant une maladie appelée goutte.

Pathologies

La goutte est une forme courante et douloureuse d'arthrite inflammatoire causée par le dépôt de cristaux d'urate monosodique dans les articulations et les tissus mous en raison d'une hyperuricémie. Une crise de goutte aiguë typique se caractérise par une douleur articulaire soudaine et sévère, souvent nocturne. La goutte est souvent monoarticulaire mais peut devenir polyarticulaire dans les cas chroniques. L'articulation classiquement atteinte est la première articulation métatarsophalangienne, mais dans certains cas d'autres articulations peuvent être touchées: chevilles, genoux, poignets, doigts. Un gonflement, une rougeur et une chaleur au niveau de l'articulation atteinte peuvent également être présents. La crise se résout généralement en 7 à 10 jours sans traitement. La goutte chronique se caractérise par des crises récurrentes, la formation de tophus (dépôts de cristaux d'urate sous la peau), et une déformation et des lésions articulaires. Elle peut également entraîner une maladie rénale chronique (néphropathie goutteuse). Le diagnostic est établi par:

- Ponction articulaire et microscopie: présence de cristaux d'urate monosodique en forme d'aiguilles, biréfringents négatifs sous lumière polarisée.
- Élévation des taux sériques d'acide urique

La goutte par enzymopathie héréditaire

Elle touche le gène de l'HGPRT (Hypoxanthine Guanine PhosphoRibosyl Transférase) ainsi, il s'agit d'une affection récessive touchant le garçon essentiellement. Elle est due à un déficit initial en HGPRT qui est une enzyme de recyclage des bases puriques, et qui sert à refaire des nucléotides à base purique. Elle est peu fréquente: touche 1/10000 personne.

Résultat: il y a des dépôts d'acide urique dans tous les tissus, et surtout au système nerveux central, car il est très dépendant de la voie de recyclage. On aura alors un retard psychomoteur et une affection neurologique possible. Le diagnostic est fait par le dosage de l'HGPRT dans les leucocytes.

Autres causes d'hyperuricémie

Elles sont plus fréquentes. Sont dues à des erreurs diététiques qu'il faut traquer, et notamment toute alimentation hyperprotéinée, source d'acide urique: excès d'abats, de charcuterie, de gibier. Peuvent être également dues à une insuffisance rénale, et dans ce cas, il y aura d'autres paramètres qui nous permettront de la suivre. Elles peuvent survenir suite à un hypercatabolisme cellulaire, notamment au cours des hémopathies.

Au cours d'hémopathies malignes, des polyglobulies, d'hyperleucocytose, il y aura production d'acide urique augmentée par turnover très important des érythrocytes, et même des érythroblastes. Les traitements cytolytiques (chimiothérapies) nécessitent une surveillance régulière de l'uricémie. En chimiothérapie, pour avoir un reflet de la lyse cellulaire, on effectue un dosage de l'acide urique, ce qui est un reflet de l'activité lytique des chimiothérapies.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage de l'acide urique sérique ou plasmatique - méthode colorimétrique

Principe

C'est une méthode basée sur le caractère réducteur de l'acide urique. L'acide urique réduit l'acide phosphotungstique, en milieu alcalin, formant un complexe de couleur bleue. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon analysé. L'acide ascorbique interfère avec la réaction, mais il est éliminé par le pH alcalin (10-11) du tampon.

Procédure

Réactifs, µl	Échantillon	Étalon	Blanc
Eau distillée	900	900	1000
Sérum	100	-	-
Étalon d'acide urique (5 mg/dl)	-	100	-
Solution tampon	250	250	250
Mélanger et laisser reposer 5 minutes à température ambiante, puis ajouter:			
Réactif phosphotungstique	100	100	100
Mélanger et incubé à température ambiante pendant 15 minutes. Lire les absorbances de l'échantillon et de l'étalon à 710 nm, en mettant le spectrophotomètre à zéro avec le blanc.			

Calcul

$$acide\ urique\ (mg/dL) = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \cdot c_{\text{étalon}} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \cdot 5$$

Valeurs normales

1 - 7 mg/100 ml de sérum.

Signification clinique

- **L'hyperuricémie** (taux sanguin élevé d'acide urique) est causée par diverses maladies ou affections. Celles-ci comprennent une synthèse accrue d'acide urique ou une excrétion diminuée d'acide urique. Le dépôt d'acide urique dans la synoviale sous forme d'urate monosodique entraîne la *goutte*.
 - Surproduction d'acide urique:
 - Régime riche en purines (viande rouge, abats, fruits de mer)
 - Consommation d'alcool (en particulier la bière)
 - Syndrome de lyse tumorale
 - Brûlures étendues
 - Troubles génétiques (par ex., syndrome de Lesch-Nyhan)
 - Sous-excrétion d'acide urique (la plus fréquente):
 - Maladie rénale
 - Certains médicaments (par ex., diurétiques, aspirine/salicylates)
 - Déshydratation
 - Toxicité au plomb
- **L'hypouricémie** (diminution du taux sanguin d'acide urique) est peu fréquente. Elle peut résulter d'une maladie hépatocellulaire sévère ou d'une réabsorption tubulaire rénale altérée de l'acide urique, en cas de déficit en xanthine oxydase. Occasionnellement, elle résulte d'un traitement de l'hyperuricémie.

Questions

1. Complétez les espaces: les acides nucléiques sont des macromolécules composées d'unités répétées appelées _____, chacune constituée d'une base azotée, d'un sucre _____ et d'un groupe phosphate. Le catabolisme des acides nucléiques implique leur dégradation enzymatique en _____, nucléosides et bases azotées. Alors que les pyrimidines sont dégradées en produits _____-solubles comme le CO_2 , le H_2O et le NH_3 , les purines sont finalement converties en _____, qui, chez l'humain, est le produit final du métabolisme des purines.
2. Associez chaque enzyme à son rôle:

Xanthine oxydase	Hydrolyse les nucléotides en nucléosides et phosphate
Uricase	Convertit la xanthine en acide urique
Nucléotidase	Scinde les nucléosides en bases libres et sucres
Nucléosidase	Oxyde l'acide urique en allantoinine
3. Quelle est la signification du seuil de solubilité de l'acide urique (~6 mg/dL)?
4. Quels facteurs contribuent à la sursaturation et à la cristallisation de l'acide urique dans les tissus mous?
5. Décrivez la pathogenèse d'une crise de goutte. Quels signes physiques sont généralement observés?
6. Quelles sont les principales causes de l'hypouricémie?
7. Quel est le principe de la méthode colorimétrique utilisée pour doser l'acide urique dans le sérum?
8. Lesquelles des affirmations suivantes concernant l'acide urique sont VRAIES ?
 - A. C'est le produit final du catabolisme des pyrimidines chez l'humain
 - B. Il circule principalement sous forme d'urate monosodique au pH physiologique
 - C. Il est très soluble dans le plasma à des concentrations supérieures à 10 mg/dL
 - D. Il est produit par la dégradation des purines via la xanthine
 - E. Il est principalement excrété par le rein

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L12. MÉTABOLISME MINÉRAL. DÉTERMINATION DU pH. CAPACITÉ TAMPON DU SÉRUM. DOSAGE DES IONS DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

I. DÉTERMINATION DU pH. CAPACITÉ TAMPON DU SÉRUM

Notion de pH

Le pH d'une solution est défini comme le logarithme décimal négatif de la concentration en ions hydrogène:

$$pH = -\log [H^+]$$

- **Les solutions neutres** ont une concentration en ions hydrogène égale à 10^{-7} et $pH = 7$.
- **Les solutions acides** ont une concentration en ions hydrogène supérieure à la concentration en ions hydroxyle, et supérieure à 10^{-7} , et $pH < 7$ (**pH acide**).
- **Les solutions alcalines** ont une concentration en ions hydrogène inférieure à la concentration en ions hydroxyle, et inférieure à 10^{-7} , et $pH > 7$ (**pH basique**).

L'échelonnement des valeurs de pH sur une échelle de 0 à 14 permet d'identifier la concentration en ions hydrogène des solutions.

L'échelle de pH comporte une zone avec excès d'ions hydrogène (zone acide $0 \leq pH < 7$), une zone neutre à $pH = 7$ et une zone avec excès d'ions hydroxyle (alcaline $7 < pH \leq 14$).

La mesure du pH sanguin est précieuse pour diagnostiquer diverses maladies et évaluer la fonction des organes. Le pH sanguin normal se situe entre 7,35 et 7,45.

Une diminution du pH en dessous de 7,35 indique une acidose, une condition pouvant survenir dans le diabète sucré non contrôlé.

Une augmentation du pH au-dessus de 7,45 indique une alcalose, pouvant résulter de vomissements prolongés ou d'une hyperventilation pulmonaire.

Mesure du pH

- Mesure du pH avec des indicateurs colorés et du papier indicateur de pH
- Mesure du pH avec le pH-mètre (électrométrique)

Solutions tampons

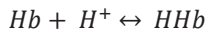
- Une solution tampon est un mélange chimique qui aide à maintenir une concentration constante en ions hydrogène (c'est-à-dire du pH) lors de l'ajout d'un acide ou d'une base.
- Un système tampon est formé d'un mélange (en solution) de deux substances aux actions complémentaires:
 - **un acide faible + le sel d'un acide faible avec une base forte** ou
 - **une base faible + le sel d'une base faible avec un acide fort**
- **Capacité tampon** = nombre d'équivalents H^+ (respectivement OH^-) nécessaires pour modifier le pH d'un volume donné de tampon d'une unité de pH.
- Les systèmes tampons les plus utilisés contiennent un acide et sa base conjuguée;
- Les systèmes tampons, majoritairement utilisés en biochimie, couvrent l'intervalle $pH = 6-8$;
- Pendant leur fonctionnement, les composants d'un système tampon passent d'une forme à l'autre (A^-/AH);

- lors de l'ajout d'un acide (H^+): $A^- + H^+ \leftrightarrow HA$
- lors de l'ajout d'une base (OH^-): $AH + OH^- \leftrightarrow A^- + H_2O$
- Dans l'organisme humain, les systèmes tampons, avec d'autres mécanismes régulateurs, assurent le maintien du pH proche de $7,4 \pm 0,5$.
- Les systèmes tampons les plus importants de l'organisme humain sont le système tampon bicarbonate/acide carbonique; le système tampon protéique; le système tampon phosphate; le système tampon de l'hémoglobine.

Système tampon de l'hémoglobine

Dans les érythrocytes, l'hémoglobine est le principal système tampon, agissant via les groupes imidazole des résidus histidine. De façon similaire à ce qui se produit dans le plasma, les érythrocytes neutralisent les ions H^+ générés à partir du CO_2 produit par le métabolisme cellulaire. L'hémoglobine tamponne cet excès de protons par deux mécanismes:

1. **Tamponnage direct via les groupes ionisables** au pH intracellulaire de 7,2. Ceux-ci comprennent les quatre groupes amino-terminaux des chaînes de globine et l'azote imidazole des chaînes latérales d'histidine:



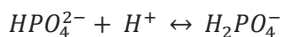
2. **L'effet Bohr**, dans lequel les ions H^+ produits par la réaction:

$CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$, sont captés par les érythrocytes et transportés sous forme de HHb^+ vers les poumons.

Là, la réaction inverse a lieu: $HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CO_2 + H_2O$, permettant l'exhalation du CO_2 par la respiration.

Système tampon phosphate ($HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$)

La réaction globale de ce système tampon est:



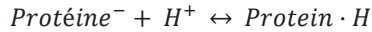
Pour maintenir un pH sanguin de 7,4, le rapport $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ doit être de **4:1** ($pK_a = 6,8$). Le liquide extracellulaire contenant des niveaux relativement faibles de phosphate, le système tampon phosphate fonctionne principalement **en intracellulaire**, où, avec les protéines, il constitue l'un des principaux systèmes tampons intracellulaires.

Dans les reins, ce système tampon contribue à la neutralisation des ions hydrogène (H^+) sécrétés activement dans le liquide tubulaire. Le phosphate se lie à ces protons, contribuant à limiter la chute du pH urinaire et permettant la poursuite de la sécrétion de H^+ .

Système tampon protéique

Le système tampon protéique est l'un des systèmes tampons les plus importants, avec le système bicarbonate. La capacité tampon des protéines est due à la présence de chaînes latérales acides et basiques au sein des résidus d'acides aminés de la chaîne polypeptidique, pouvant donner ou accepter des protons (H^+).

Les protéines agissent comme tampons principalement grâce aux **groupes amino- et carboxy-terminaux**, qui peuvent accepter ou donner des ions H^+ . Les protéines plasmatiques (en particulier l'albumine) agissent comme tampons au pH physiologique (7,4) principalement via les résidus histidine de leur structure. Ces résidus peuvent accepter un proton au niveau du groupe imidazole ($pK_a = 7,3$), selon la réaction suivante:



Dans le plasma, l'albumine peut neutraliser les ions H^+ , y compris ceux dérivés de l'acide carbonique.

Système tampon acide carbonique - bicarbonate

L'équilibre acido-basique implique le système tampon bicarbonate. En termes chimiques, le système tampon bicarbonate peut être considéré comme toute autre dissociation chimique. Normalement, le rapport des équivalents HCO_3^- et H_2CO_3 est de 20/1, par exemple 24 mEq de bicarbonate et 1,2 mEq d'acide carbonique. Plutôt que le rapport $[HCO_3^-]/[H_2CO_3]$, il est plus pratique d'utiliser le rapport $[HCO_3^-]/pCO_2$, où pCO_2 représente la pression partielle de dioxyde de carbone dans le sang. Une **diminution de ce rapport entraîne une acidose**, tandis qu'une **augmentation entraîne une alcalose**.

Le type de trouble acido-basique est déterminé par le facteur primaire responsable de l'altération de cet équilibre.

- **L'acidose ou l'alcalose métabolique** se développe lorsque la modification initiale concerne la **concentration en bicarbonate (HCO_3^-)**.
- **L'acidose ou l'alcalose respiratoire** se développe lorsque la modification initiale concerne les niveaux de la pression partielle de **dioxyde de carbone (pCO_2)**.

Selon les modifications du pH, une acidose ou une alcalose compensée ou non compensée se produira. Lorsque la valeur du pH n'est pas modifiée, on parle d'acidose ou d'alcalose compensée. Lorsque le pH descend en dessous de 7,35, une acidose non compensée s'installe; lorsque le pH augmente au-dessus de 7,45, on peut parler d'alcalose non compensée. Des valeurs de pH sanguin inférieures à 6,9 ou supérieures à 7,9 sont incompatibles avec la vie.

L'acidose respiratoire peut survenir dans des conditions associées à une hypoventilation ou à des échanges gazeux altérés, telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), entraînant une augmentation primaire de la pCO_2 . Cela entraîne une diminution du pH. La compensation se fait via le système rénal, qui augmente la réabsorption du bicarbonate, renforçant la capacité tampon et contribuant ainsi à la normalisation du pH.

L'alcalose respiratoire peut survenir dans des conditions associées à l'hyperventilation, telles que l'anxiété, la douleur, l'altitude élevée ou la fièvre, entraînant une diminution primaire de la pCO_2 . Cette perte de dioxyde de carbone provoque une augmentation du pH. Le système rénal compense en augmentant l'excrétion de bicarbonate, ce qui aide à rétablir des niveaux de pH normaux.

L'acidose métabolique peut survenir dans des conditions telles que l'acidocétose diabétique, l'insuffisance rénale chronique ou une diarrhée sévère, entraînant une diminution primaire de la concentration plasmatique de bicarbonate. Cela entraîne une diminution du pH. La compensation est réalisée par le système respiratoire, qui répond par une hyperventilation, abaissant ainsi la pression partielle de dioxyde de carbone (pCO_2), ce qui abaisse la concentration d'acide carbonique et élève le pH vers des valeurs normales.

L'alcalose métabolique peut survenir dans des conditions telles que des vomissements prolongés ou une administration excessive de bicarbonate, entraînant une augmentation primaire de la concentration plasmatique de bicarbonate. Il en résulte une augmentation du pH sanguin. Le système respiratoire compense par une hypoventilation, entraînant une augmentation de la $p\text{CO}_2$, ce qui élève la concentration d'acide carbonique et abaisse le pH vers des valeurs normales.

Tableau 1. Modifications caractéristiques du pH, de la $p\text{CO}_2$ et du $[\text{HCO}_3^-]$ dans les troubles acido-basiques

Trouble		pH	$p\text{CO}_2$	$[\text{HCO}_3^-]$
Acidose respiratoire	Non compensée	↓	↑	N
	Compensée	N (légèrement ↓)	↑	↑
Alcalose respiratoire	Non compensée	↑	↓	N
	Compensée	N (légèrement ↑)	↓	↓
Acidose métabolique	Non compensée	↓	N	↓
	Compensée	N (légèrement ↓)	↓	↓
Alcalose métabolique	Non compensée	↑	N	↑
	Compensée	N (légèrement ↑)	↑	↑

La **réserve alcaline** contient l'ensemble des bases que le sang utilise comme systèmes tampons pour neutraliser les acides présents dans la circulation, maintenant ainsi un pH sanguin constant dans les limites physiologiques. Actuellement, on ne parle que de la quantité de bicarbonates dans le sang (bicarbonates plasmatiques).

En pratique, les bicarbonates ne sont pas dosés en tant que tels, mais la quantité de CO_2 des bicarbonates (méthode de Van Slyke). Van Slyke et Cullen ont défini la réserve alcaline comme la quantité de CO_2 (en millilitres) pour 100 millilitres de plasma, à 0°C et 760 mm Hg.

Le dosage des bicarbonates n'est qu'une méthode informative, qui ne peut être interprétée qu'en tenant compte du reste des données cliniques.

L'introduction de la micro-méthode Astrup pour évaluer l'équilibre acido-basique a représenté une avancée significative dans ce domaine. La méthode Astrup prend également en compte l'effet tampon de l'hémoglobine ainsi que le rôle de l'anhydrase carbonique dans les érythrocytes. Elle repose sur la relation inverse entre la pression partielle de dioxyde de carbone ($p\text{CO}_2$) et les valeurs de pH sanguin. Il est à noter que cette technique ne nécessite que quelques gouttes de sang pour déterminer le pH, la $p\text{CO}_2$, l'excès de base et la concentration réelle de bicarbonate.

II. DOSAGE DES ÉLECTROLYTES DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Plusieurs substances chimiques sont dissoutes dans les liquides biologiques humains:

- des composés organiques de faible poids moléculaire (glucose, urée, acides aminés, acide urique, acides gras, triacylglycérols, cholestérol, etc.)
- des composés organiques macromoléculaires (protéines)
- des électrolytes ayant un rôle dans la distribution et la rétention d'eau, la pression osmotique, le pH.

Le métabolisme minéral joue un rôle très important dans le maintien de l'intégrité morphofonctionnelle de l'organisme. Les éléments minéraux se trouvent sous forme d'ions, ayant des fonctions importantes telles que:

- rôle du Na^+ et du K^+ dans la régulation de l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique.
- rôle du Ca^{2+} dans la coagulation sanguine et l'excitabilité neuromusculaire.
- rôle dans l'activation enzymatique: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , etc.

Généralement, toute affection pathologique sévère s'accompagne de perturbations hydro-électrolytiques, soulignant l'importance pour les cliniciens de bien connaître les principaux ions, leurs interactions avec le métabolisme général, et les taux sériques normaux des principaux électrolytes.

La quantité d'électrolytes peut être exprimée en milliosmoles/litre:

$$\frac{mOsm}{l} = \frac{mg/l}{masse\ atomique}$$

ou en milliéquivalents/litre:

$$\frac{mEq}{l} = \frac{mg/l}{masse\ atomique} \times valence$$

Les concentrations normales (mEq/L) des principaux cations et anions du sérum sanguin sont illustrées dans le diagramme de Gamble. Comme on peut l'observer, le nombre total de cations est égal au nombre total d'anions.

On peut observer que le liquide cellulaire a comme cation prédominant le K⁺ et comme anion le HPO₄. Dans l'espace extracellulaire, le principal cation est le Na⁺ et l'anion le Cl. L'osmogramme est assez similaire à l'ionogramme, à la différence que les valeurs sont exprimées en millimoles. L'osmogramme plasmatique normal est d'environ 300 mOsm/kg, et pour l'urine, d'environ 1200 mOsm/kg.

Tableau 2. Diagramme de Gamble

Ions	Plasma	Liquide interstitiel	Liquide cellulaire
Na ⁺	141	145,5	10 - 30
K ⁺	5	4,5	100 - 150
Ca ²⁺	5	3,5	0 - 4
Mg ²⁺	2	1,5 - 2,5	6 - 34
Cations totaux	153	155	*
Cl ⁻	101	112 - 117	0 - 70
Bases tampons			10 - 15
HCO ₃ ⁻	25	29	
Protéines	17		
Anions résiduels			
H ₂ PO ₄ ⁻	2	2,3	4 - 150
SO ₄ ²⁻	1	1	4 - 30
Acides organiques	7	6,7	Variable
Anions totaux	153	156	*
Total mEq/l	306	311	*

A. Cations

a. Sodium (Na): valeurs normales = 135 - 145 mEq/l

- est le principal cation extracellulaire, participant à la régulation de la pression osmotique, du volume plasmatique (sa concentration étant plus élevée que celle des autres cations) et de l'équilibre acido-basique (le principal système tampon étant le bicarbonate de sodium/acide carbonique = 20/1)
- il participe à la régulation du système nerveux et de l'activité musculaire
- il participe au maintien de la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane cellulaire, jouant un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux

- il joue le rôle d'activateur de certaines enzymes (alpha-amylase et bêta-galactosidase)
- il joue un rôle dans le transport transmembranaire (Na^+/K^+ - ATPase)
- le sodium est éliminé par les reins, la transpiration, l'intestin, sa régulation étant contrôlée par les hormones minéralocorticoïdes (aldostérone).

L'hyponatrémie et l'hypernatrémie sont des affections influencées par la distribution de l'eau dans les différents compartiments corporels.

Hyponatrémie: diarrhée sévère, transpirations massives, brûlures sévères, néphrite chronique, administration de diurétiques, insuffisance corticosurrénalienne, diabète sucré avec acidose, après interventions chirurgicales, insuffisance rénale.

Hypernatrémie: sténose du pylore, hyperaldostéronisme, corticothérapie, états fébriles prolongés.

b. Potassium: valeurs normales = 3,8 – 5,4 mEq/l

- est le principal cation intracellulaire
- il participe au maintien de la différence de potentiel de part et d'autre de la cellule, jouant un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux (l'augmentation du potassium intracellulaire produit l'excitabilité musculaire)
- lors de la contraction musculaire, le potassium passe dans le compartiment extracellulaire et le sodium dans le compartiment intracellulaire
- il active certaines enzymes (pyruvate kinase, carbamoyl phosphate synthase)
- il participe au transport transmembranaire (Na/K -ATPase)

Hypokaliémie: elle s'accompagne de problèmes cardiaques et neuromusculaires, et se retrouve dans les syndromes chirurgicaux (occlusion intestinale haute, sténose du pylore), l'alcalose, le coma diabétique, le coma hypoglycémique, le syndrome de Cushing, les néphropathies tubulaires.

Hyperkaliémie: destructions cellulaires (syndromes hémolytiques, choc toxi-septique, brûlures étendues), insuffisance rénale.

c. Calcium: valeurs normales = 4,5 – 5,5 mEq/l (9 - 11 mg/dl)

- Dans le plasma, il se trouve surtout sous deux formes: 60 % sous forme de calcium libre (diffusible ou non ionisable) et 40 % sous forme de calcium protéiné (calcium non diffusible)
- Le calcium varie en fonction de l'état de l'équilibre acido-basique (il augmente dans l'acidose et diminue dans l'alcalose)
- Il participe aux processus de coagulation sanguine
- Il est impliqué dans la régulation de la perméabilité membranaire pour Na^+ et K^+ (des concentrations accrues de Ca^{2+} diminuent la perméabilité cellulaire pour Na^+ et *vice versa*)
- Il est impliqué dans la contraction musculaire (les patients présentant une hypocalcémie présentent des fasciculations musculaires dues à la diminution du Ca^{2+} au niveau des jonctions nerveuses)
- Les ions calcium participent à la régulation de l'excitabilité (à un pH alcalin, les protéines libèrent des H^+ , leurs charges négatives augmentent, le calcium se fixe aux protéines, sa concentration **diminue** dans le sang et l'excitabilité neuromusculaire augmente; à pH acide, les protéines fixent les H^+ , les ions calcium sont libérés des protéines, sa concentration plasmatique **augmente**, et l'excitabilité neuromusculaire diminue)
- Le calcium se fixe dans les os sous forme d'apatites carbonatées et hydroxylées (99 % du calcium de l'organisme est fixé dans les os et les dents), jouant un rôle dans le maintien de la calcémie

Hypocalcémie: apparaît dans l'hyperparathyroïdie (tétanie, scorbut), l'hyperthyroïdie, l'insuffisance rénale chronique, l'augmentation de la calcitonine

Hypercalcémie: destructions osseuses massives, hyperthyroïdie, hypervitaminose D.

d. Magnésium: valeurs normales = 1,9 – 2,5 mg/dl

- Il se trouve principalement en intracellulaire
- C'est un activateur enzymatique (kinases, phosphatases)
- Il participe à la synthèse des acides nucléiques
- C'est un constituant des os et des dents
- Avec le Ca^{2+} , le Na^+ et le K^+ , il participe à la régulation de l'excitabilité neuromusculaire
- Il peut être un indicateur de la fonction rénale: il est filtré au niveau du glomérule et réabsorbé au niveau tubulaire; en cas de fonction rénale déficiente, sa réabsorption augmente et implicitement sa concentration sanguine

Hypomagnésémie: vomissements, diarrhée, cirrhose, coma diabétique, scorbut

Hypermagnésémie: insuffisance rénale, hyperthyroïdie, maladie d'Addison

e. Fer: valeurs normales = 50 – 180 µg/dl

- Il contribue à la synthèse de l'hémoglobine et de certains systèmes enzymatiques redox
- C'est un constituant de l'Hb, de la myoglobine, de la catalase, de la peroxydase
- Il est stocké sous forme de ferritine
- Il est transporté dans le sang par une bêta-globuline - la transferrine

Hyposidérémie: anémie ferriprive, anémie post-hémorragique, infections aiguës.

Hypersidérémie: hémochromatose idiopathique, anémie mégaloblastique, anémie aplasique, anémie hémolytique.

B. Anions

b. Phosphore: valeurs normales = 3 – 4,5 mg/dl

- C'est, avec les protéines, le principal anion intracellulaire
- On le trouve dans le sérum combiné aux protéines (phosphoprotéines, nucléoprotéines), sous forme acido-soluble (phosphore inorganique, esters glucidiques, créatine phosphate, acides triphosphoriques, phosphoénolpyruvate) et aux phospholipides (lécithines, céphalines, sphingomyélines)
- Il joue un rôle dans la formation du tissu osseux
- Il est important pour le stockage et le transfert de l'énergie dans l'organisme
- Il est important dans le métabolisme du glucose, des lipides, et dans le maintien de l'équilibre acido-basique

Hypophosphatémie: scorbut, maladie cœliaque, hyperparathyroïdie.

Hyperphosphatémie: hypoparathyroïdie, insuffisance rénale, hypervitaminose D.

c. Chlore: valeurs normales = 98 - 110 mEq/l

- C'est l'anion prédominant dans l'espace extracellulaire
- C'est un composant du suc gastrique
- Il est impliqué dans l'équilibre des liquides et des électrolytes

Hyperchlorémie: acidose métabolique

Hypochochlorémie: alcalose métabolique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage des paramètres ASTRUP

Le système epoc ASTRUP se compose de deux composants: epoc Reader et epoc Host.

Fonctionnement de l'appareil epoc ASTRUP:

1. Connecter l'appareil à une prise secteur.
2. Allumer l'appareil.
3. Appuyer et maintenir le bouton Reader (sur l'epoc Reader) → un voyant VERT apparaît.
4. Appuyer sur le bouton ROUGE sur l'epoc Host → l'écran s'allume, affichant la page de connexion.
5. Saisir un identifiant utilisateur et un mot de passe, puis appuyer sur le bouton Connect → RECHERCHE.
6. Appuyer sur l'icône Discovery (Antenne - sur le composant epoc Host).
7. Appuyer et maintenir Rdr 888 → « Effectuer l'analyse sanguine »!!
8. Saisir les informations du patient: l'identifiant du patient est saisi via le clavier (en bas à droite), avec les paramètres supplémentaires relatifs à la thérapie respiratoire, l'âge et le sexe.
9. À l'aide de la flèche VERTE, accéder à l'onglet 2 → HÉMODILUTION = sélectionner NON!!!
10. Appuyer sur l'onglet 1.
11. OUVRIR LA CARTE D'ANALYSE (à partir de l'encoche).
12. Insérer la carte d'analyse:
 - Positionner l'étiquette de la flèche bleue vers le haut et le module capteur vers le Reader.
 - Insérer la carte dans la fente pour carte de l'epoc Reader jusqu'à sentir une légère résistance et entendre un petit « clic » !
 - Pousser la carte d'analyse légèrement au-delà de ce point pour la « verrouiller » en position.
 - Éviter les arrêts brusques ou une vitesse irrégulière lors de l'insertion de la carte.
13. Attendre → jusqu'à ce que le processus d'étalonnage soit terminé.
14. Sur l'epoc Host, le message « Injecter l'échantillon...!! » apparaît.
15. Préparer l'échantillon sanguin:
 - Ouvrir la seringue à sang (retirer le bouchon VERT)!!
 - Retirer TOUTES LES BULLES D'AIR de la seringue à sang!!!
16. Injecter l'échantillon sanguin dans la carte d'analyse:
 - Appliquer une pression douce et insérer la pointe de la seringue dans le trou central du port d'échantillon sanguin sur la carte d'analyse.
 - Continuer à insérer jusqu'à entendre un petit clic, et le côté gauche de la carte se remplit de sang !
 - L'epoc Reader émet un bip, et l'indicateur d'état de l'analyse clignote en vert, confirmant qu'une quantité de sang suffisante a été reçue pour l'analyse.
 - L'epoc Host affiche également le message d'acceptation de l'échantillon.
17. Fermer la seringue à sang avec le bouchon VERT!!!
18. Attendre ~170 secondes pour que l'analyse se termine.
19. Une fois que le Reader a terminé l'analyse, l'indicateur d'état clignotera en vert, indiquant que la carte d'analyse peut être retirée.
20. ATTENTION!!! Retirer la carte d'analyse avec précaution (risque que la température élevée fasse coller la carte à l'intérieur de l'appareil)!!
21. Trouver les résultats de l'analyse: Gaz, Chimie, Métabolites.

22. Enregistrer les résultats.
23. Imprimer les résultats.
24. Une fois toutes les analyses avec un Reader terminées et toutes les saisies de données effectuées, fermer la session en appuyant sur le bouton X ROUGE (en haut à droite) pour quitter l'écran du Reader.
25. Déconnecter l'opérateur via le menu situé dans le coin inférieur gauche de l'écran ou appuyer sur le bouton « Déconnexion opérateur ».
26. Utiliser le bouton d'alimentation du Host pour éteindre l'appareil.

Valeurs de référence des paramètres ASTRUP:

- **Gaz:**
 - pH = 7,35 – 7,45
 - pCO₂ = 35 – 53 mmHg
 - pO₂ = 75 – 105 mmHg
 - cHCO₃⁻ = 21 – 26 mmol/L
 - BE = -2 – 3 mmol/L
 - cSO₂ = 95 – 99%
- **Paramètres biochimiques:**
 - Na⁺ = 128 – 145 mmol/L
 - K⁺ = 3,6 – 5,1 mmol/L
 - Ca⁺⁺ = 1,15 – 1,33 mmol/L
 - Cl⁻ = 98 – 109 mmol/L
 - cTCO₂ = 22 – 29 mmol/L
 - Hct = 38 – 51%
 - cHgb = 12 – 16g/dL
- **Paramètres métaboliques:**
 - Glucose = 74 – 100 mg/dL
 - Lactate = 0,56 – 1,39 mmol/L
 - Créatinine = 0,6 – 1,2 mg/Dl

Questions

1. Indiquez l'intervalle normal du pH sanguin. Quelle est la signification clinique si le pH descend en dessous de 7,35 ou monte au-dessus de 7,45 ?
2. Différenciez l'acidose métabolique de l'acidose respiratoire en termes de perturbation primaire et de réponse compensatoire.
3. Citez deux causes d'hyponatrémie et deux causes d'hypernatrémie.
4. Que deviennent les taux d'ions calcium pendant l'acidose et l'alcalose, et comment cela affecte-t-il l'excitabilité neuromusculaire ?
5. Quels paramètres peuvent être mesurés à l'aide de la micro-méthode Astrup ?
6. Un patient de 58 ans atteint de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) se présente à l'unité médicale avec un essoufflement et une léthargie. Analyse des gaz du sang: pH = 7,30, pCO₂ ↑, [HCO₃⁻] ↑.
 - Identifiez le trouble acido-basique.
 - Quelle est l'altération primaire, et quel mécanisme compensatoire est observé dans ce cas ?
7. Sur la base des valeurs fournies dans le tableau, suggérez un diagnostic possible. Justifiez votre réponse en interprétant le statut acido-basique et les paramètres biochimiques pertinents.

Paramètre	Valeur		Paramètre	Valeur
pH	7,34		K ⁺	3,5 mmol/L
pCO ₂	33,8 mmHg		Ca ²⁺	1,18 mmol/L
HCO ₃ ⁻	15 mmol/L		cHb	13,3 g/dL
BE (ecf)	0,4 mmol/L		Glucose	348 mg/dL
cSO ₂	91%		Lactate	1,45 mmol/L
Na ⁺	137 mmol/L			

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

L13. ANALYSE MÉTABOLIQUE INTÉGRATIVE. DOSAGE DES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES À L'AIDE DU SYSTÈME AUTOMATIQUE PICCOLO XPRESS

Introduction

Le métabolisme englobe l'ensemble des réactions chimiques au sein des organismes vivants, comprenant à la fois les processus cataboliques, qui dégradent les molécules complexes pour libérer de l'énergie, et les processus anaboliques, qui synthétisent de nouvelles molécules à partir de précurseurs plus simples. Bien que ces voies soient souvent étudiées isolément (métabolisme des glucides, métabolisme des lipides, métabolisme des protéines et des acides aminés, métabolisme des acides nucléiques), dans l'organisme humain elles fonctionnent comme un réseau intégré. Le flux des métabolites est dynamique, s'adaptant constamment aux variations de la disponibilité en nutriments, aux signaux hormonaux et aux besoins énergétiques. Comprendre le métabolisme intégratif permet au clinicien de prévoir comment une perturbation d'une voie influencera l'ensemble du réseau métabolique, un concept particulièrement pertinent dans des troubles tels que le diabète, le syndrome métabolique, l'insuffisance hépatique et les erreurs innées du métabolisme.

Le rôle central des molécules énergétiques

L'objectif des voies cataboliques est la production d'ATP, la monnaie énergétique universelle de la cellule, et d'équivalents réducteurs (NADH, NADPH, FADH₂) qui alimentent les réactions oxydatives et réductrices.

- L'ATP fournit l'énergie pour le travail mécanique, le transport actif et la biosynthèse. Il est généré principalement par l'oxydation du glucose, des acides gras et des acides aminés via la glycolyse, le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) et la phosphorylation oxydative.
- Le NADH et le FADH₂ sont produits pendant le catabolisme oxydatif et transfèrent des électrons vers la chaîne respiratoire mitochondriale pour générer de l'ATP.
- Le NADPH, en revanche, est utilisé pour les réactions biosynthétiques réductrices telles que la synthèse des acides gras et du cholestérol, et pour maintenir le glutathion réduit, un antioxydant clé.

Les mitochondries constituent le carrefour métabolique, où les carburants issus des glucides, des lipides et des protéines convergent sous forme d'acétyl-CoA et entrent dans le cycle de Krebs. Cette centralisation garantit que la production d'énergie est coordonnée et efficace.

Interrelations glucides-lipides-protéines

Les glucides constituent la source d'énergie la plus immédiate de l'organisme. À l'état nourri, le glucose alimentaire est oxydé pour produire de l'ATP ou stocké sous forme de glycogène dans le foie et le muscle. Lorsque le glucose est abondant, l'excès est converti en acides gras par lipogenèse *de novo*, qui sont ensuite stockés sous forme de triacylglycérols dans le tissu adipeux. Pendant le jeûne, la glycogénolyse hépatique libère du glucose dans le sang, et lorsque les réserves de glycogène sont épuisées, la néoglucogenèse prend le relais, utilisant le lactate issu de la glycolyse anaérobie, le glycérol issu de la lipolyse, et les acides aminés glucoformateurs issus de la dégradation des protéines musculaires.

Les lipides constituent la réserve énergétique la plus concentrée. À l'état nourri, les graisses alimentaires (principalement des triacylglycérols) sont transportées sous forme de chylomicrons et stockées dans les adipocytes. Pendant le jeûne ou l'exercice prolongé, la lipolyse libère des acides gras libres, oxydés dans le foie et le muscle pour produire de l'ATP. Lors d'un jeûne prolongé, le foie convertit l'excès d'acétyl-CoA issu de la β -oxydation en corps cétoniques, qui servent de carburant alternatif et contribuent à préserver les protéines musculaires.

Les protéines et les acides aminés servent principalement de molécules structurelles et fonctionnelles, mais agissent également comme substrats métaboliques lorsque les réserves de glucides et de lipides sont insuffisantes. À l'état nourri, les acides aminés sont utilisés pour la synthèse protéique ou transaminés en intermédiaires du cycle de Krebs. Pendant le jeûne, la protéolyse musculaire libère des acides aminés, notamment l'alanine et la glutamine, qui soutiennent la néoglucogenèse et l'uréogénèse hépatiques.

Coordination hormonale

L'intégration métabolique dépend fortement de la régulation hormonale:

- L'insuline domine à l'état nourri, stimulant la captation du glucose (via GLUT4 dans le muscle et le tissu adipeux), favorisant la synthèse de glycogène et de lipides, et favorisant l'anabolisme protéique.
- Le glucagon prédomine pendant le jeûne, activant la glycogénolyse hépatique, la néoglucogenèse et la lipolyse dans le tissu adipeux.
- Les catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine) mobilisent les réserves de carburant lors d'un stress aigu et de l'exercice.
- Le cortisol et l'hormone de croissance jouent des rôles de soutien dans la modulation de la disponibilité des substrats sur des périodes plus longues.

États métaboliques et adaptations

À l'état nourri (postprandial précoce), l'abondance de nutriments favorise le stockage d'énergie.

Pendant le jeûne, la glycogénolyse est la principale source de glucose sanguin, la néoglucogenèse gagnant progressivement en importance. Lors d'un jeûne prolongé ou d'une famine, la production de corps cétoniques augmente fortement, fournissant jusqu'à 60-70 % des besoins énergétiques du cerveau.

Pendant l'exercice, la demande énergétique augmente fortement, et la sélection du carburant dépend de l'intensité: la phosphocréatine et la glycolyse anaérobie dominant au début et lors d'intensités élevées, tandis que l'oxydation des acides gras contribue davantage lors d'une activité modérée prolongée.

Corrélations cliniques

Une application clé du métabolisme intégratif est la compréhension des mécanismes pathologiques:

- Dans le diabète de type 1, le déficit en insuline entraîne une lipolyse, une cétogenèse et une protéolyse non contrôlées.
- Dans le diabète de type 2, l'insulinorésistance altère l'équilibre glucido-lipidique, favorisant l'hyperglycémie et la dyslipidémie.
- Le syndrome métabolique représente un ensemble d'affections caractérisées par l'insulinorésistance, des taux élevés de triglycérides et une obésité centrale.
- Les erreurs innées du métabolisme, telles que les glycogénoses ou les anomalies de la β -oxydation, illustrent comment la perturbation d'une seule enzyme peut affecter de multiples voies interconnectées.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dosage des paramètres biochimiques à l'aide du système automatique Piccolo Xpress

Le Piccolo Xpress est un analyseur diagnostique portable offrant une gamme complète de tests de chimie sanguine au point de soin. Il permet la réalisation de divers bilans biochimiques de routine en utilisant 100 µL de sang total, de sérum ou de plasma, par chimie sèche. Le système utilise des disques réactifs à usage unique pouvant contenir jusqu'à 14 tests biochimiques. Pour un rotor, les résultats sont obtenus en environ 12 minutes.

Le Piccolo Xpress comprend un processus intégré appelé iQC (Intelligent Quality Control, contrôle qualité intelligent). L'iQC vérifie l'analyseur, le rotor réactif et l'échantillon à chaque analyse afin d'assurer un fonctionnement électronique et chimique correct. Le système iQC intégré établit des normes empêchant des résultats de mesure incorrects.

Le Piccolo Xpress dispose de 13 panels disponibles. Cependant, seuls 3 types de panels sont présentés ci-dessous:

Panel métabolique complet:

Alanine aminotransférase (ALT), Albumine (ALB), Phosphatase alcaline (ALP), Aspartate aminotransférase (AST), Calcium (Ca^{2+}), Chlorure (Cl^-), Créatinine (CRE), Glucose (GLU), Potassium (K^+), Sodium (Na^+), Bilirubine totale (TBIL), Dioxyde de carbone total (tCO_2), Protéines totales (TP), Azote uréique sanguin (BUN).

Chimie générale 13:

Alanine aminotransférase (ALT), Albumine (ALB), Phosphatase alcaline (ALP), Amylase (AMY), Aspartate aminotransférase (AST), Calcium (Ca^{2+}), Créatinine (CRE), Gamma-glutamyl transférase (GGT), Glucose (GLU), Bilirubine totale (TBIL), Protéines totales (TP), Acide urique (UA), Azote uréique sanguin (BUN).

Panel lipidique Plus:

Cholestérol total (CHOL), Lipoprotéines de haute densité (HDL), Triglycérides (TRIG), Alanine aminotransférase (ALT), Aspartate aminotransférase (AST), Glucose (GLU). Les paramètres calculés comprennent le LDL, le VLDL et le rapport cholestérol total/HDL.

Procédure

Fonctionnement du système multiparamètre Piccolo Xpress:

1. Connecter l'appareil à la prise.
2. Ouvrir l'appareil.
3. Appuyer sur l'option ANALYSE → la trappe s'ouvre, où le rotor est placé face blanche vers le haut.
4. !!Avant d'insérer le rotor dans l'appareil, injecter l'échantillon sanguin à l'aide de la seringue spéciale (injecter environ 120 µl d'échantillon), de façon à ce que l'échantillon sanguin remplisse le croissant au centre du rotor.
5. ATTENTION - Si le rotor est éclaboussé de sang, il doit être nettoyé avec un mouchoir (risque de contamination).
6. Après avoir placé le rotor sur le bras de l'appareil, appuyer sur la touche CLOSE.
7. Choisir l'option PATIENT sur l'écran de l'appareil → saisir un identifiant (numéro ou nom) pour l'échantillon à analyser.
8. Appuyer sur la touche DONE, moment auquel l'appareil commence à analyser l'échantillon (l'analyse prend environ 12 min).

9. Une fois l'analyse terminée, le message *Analyse terminée* apparaît, après quoi la touche OPEN est pressée pour retirer le rotor de l'instrument. Le résultat de l'analyse est imprimé automatiquement.
10. Appuyer sur la touche CLOSE.
11. Appuyer sur la touche HOME.
12. Éteindre l'appareil.

Valeurs normales:

- $\text{Na}^+ = 128 - 145 \text{ mmol/L}$;
- $\text{K}^+ = 3,6 - 5,1 \text{ mmol/L}$;
- $\text{Cl}^- = 98 - 108 \text{ mmol/L}$;
- $\text{tCO}_2 = 18 - 33 \text{ mmol/L}$;
- $\text{CA} = 8,0 - 10,3 \text{ mg/dL}$;
- $\text{GLU} = 73 - 118 \text{ mg/dL}$;
- $\text{BUN} = 7 - 22 \text{ mg/dL}$;
- $\text{CRE} = 0,6 - 1,2 \text{ mg/dL}$;
- $\text{ALP} = 42 - 141 \text{ U/L}$;
- $\text{ALT} = 10 - 47 \text{ U/L}$;
- $\text{AST} = 11 - 38 \text{ U/L}$;
- $\text{TBIL} = 0,2 - 1,6 \text{ mg/dL}$;
- $\text{ALB} = 3,3 - 5,5 \text{ g/dL}$;
- $\text{TP} = 6,4 - 8,1 \text{ g/dL}$.

Le système automatique Piccolo Xpress peut détecter si l'échantillon biologique est:

- Hémolysé (HEM: 0, +.....4+);
- Lipémique (LIP: 0, +.....4+);
- Ictérique (ICT: 0, +.....4+).

Questions

1. Décrivez brièvement les principaux processus générant de l'ATP et indiquez les principaux processus cellulaires consommant de l'ATP.
2. Expliquez les interconnexions entre le métabolisme des glucides et des lipides, en soulignant les principales molécules, voies et enzymes impliquées.
3. Décrivez comment le métabolisme des glucides et des protéines interagit via la néoglucogenèse et le cycle de Krebs. Incluez le rôle de l'alanine, de la glutamine et des réactions de transamination.
4. Décrivez les liens entre le métabolisme des glucides et le métabolisme énergétique, en identifiant les molécules, voies et enzymes établissant cette connexion.
5. Expliquez comment le métabolisme des protéines s'intègre au métabolisme énergétique, en vous concentrant sur les rôles de molécules, voies et enzymes spécifiques.
6. L'acétyl-CoA est un intermédiaire métabolique central. Identifiez les voies dans lesquelles l'acétyl-CoA apparaît et expliquez comment il sert de plaque tournante reliant différents processus métaboliques.
7. Présentez les principaux processus métaboliques ayant lieu dans le foie et leur signification physiologique.
8. Expliquez les effets de l'insuline, du glucagon et de l'épinéphrine sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Comment ces hormones coordonnent-elles l'apport énergétique pendant l'exercice et le stress ?
9. Comparez les voies métaboliques prédominantes à l'état nourri (postprandial précoce) par rapport à l'état de jeûne prolongé. Expliquez la régulation hormonale par l'insuline et le glucagon.
10. Comparez les rôles du muscle squelettique et du tissu adipeux dans le métabolisme énergétique. En quoi ces tissus diffèrent-ils dans leurs réponses à l'insuline et au glucagon ?
11. Quels tests biochimiques relatifs au métabolisme des glucides avez-vous étudiés ?
12. Quels tests biochimiques relatifs au métabolisme des lipides avez-vous étudiés ?
13. Quels tests biochimiques relatifs au métabolisme des protéines avez-vous étudiés ?
14. Quels tests biochimiques relatifs au métabolisme des acides nucléiques avez-vous étudiés ?
15. Indiquez les paramètres pouvant être mesurés avec un panel métabolique complet (CMP) à l'aide de l'analyseur *Piccolo Xpress*.

Notes de laboratoire

Utilisez cet espace pour prendre des notes manuscrites pendant la séance pratique.

RÉFÉRENCES

1. Marian C, Anghel A, Şeclăman E, Kaycsa A, Sîrbu IO, Tămaş L, Biochemistry of Metabolism for medical students, Victor Babeş Publishing House, 2016.
2. Anghel A, Tămaş L, Şeclăman E, Metabolic biochemistry with clinical applications, Eurostampa Publishing House, 2017.
3. Anghel A, Şeclăman E, Tămaş L, Motoc M, Şişu E, Kaycsa A, David D, Sîrbu IO, Marian C, Samoilă C, Grecu D, Sfrijan F, Georgescu A, Marcu A, Buzatu R, Bonţe D, Gurban C, Alexa A, Bujor G, Mărieş L, Mihala A, Sala-Cârtoag M, Practical works of medical chemistry and biochemistry for medical students, Victor Babeş Publishing House, 2019.
4. Devlin TM, editor. Textbook of biochemistry with clinical correlations. John Wiley & Sons; 2010.
5. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical Chemistry: Techniques, Principles, and Correlations. The Netherlands: Wolters Kluwer; 2018.
6. Meisenberg G, Simmons WH. Principles of Medical Biochemistry E-Book: Principles of Medical Biochemistry E-Book. Elsevier Health Sciences; 2016.
7. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto Jr. GJ, Stryer L, Biochemistry, 9th Edition, 2019.
8. Ciaccio M, editor. Clinical and laboratory medicine textbook. Springer Nature; 2024.
9. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2017.
10. Abali EE, Carman R, Spicer DB. Biochemistry Behind the Symptoms. 1st ed. Wolters Kluwer Health; 2023.
11. Lee M, editor. Basic skills in interpreting laboratory data. 6th ed. American Society of Health-System Pharmacists; 2017.
12. Murphy M, Srivastava R, Deans K. Clinical biochemistry: an illustrated colour text. 7th ed. Elsevier; 2023.
13. Ahmed N, editor. Clinical biochemistry. 3rd ed. Oxford University Press (Fundamentals of Biomedical Science); 2025.
14. Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, Ayling RM. Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects. 3rd ed. Elsevier; 2014.
15. <https://www.globalpointofcare.abbott/us/en/product-details/apoc/piccolo-xpress-chemistry-analyzer.html>