

SL Dr. Liviu Tămaş tamas.liviu@umft.ro et tliviu33@yahoo.com

Toutes les questions seront envoyées à SL Dr. Liviu Tămaş aux les adresses de email fournis (**IMPORTANT** – les questions seront envoyées simultanément aux les deux adresses de email fournis et pas seulement a une !!!)

GLYCOLYSE ANAEROBIE

DÉTERMINATION DE LA LACTATE DESHYDROGENASE (LDH)

DÉTERMINATION DE L'ACIDE LACTIQUE DANS LE SANG

Introduction

Pour être en mesure de remplir le rôle de substance energogene, 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.

Dans des conditions anaérobies, le pyruvate est réduit en lactate par l'action de la lactate déshydrogénase (LDH). NADH,H⁺ utilisé pour ce processus réductrice est le résultat de la déshydrogénation de glyceraldéhyde 3-phosphate (GA-3-P), donc en conditions anaérobies, la glycolyse peut fonctionner réellement en l'absence d'oxygène.

La LDH est une enzyme présente dans la plupart des tissus, en particulier le cœur, les poumons, les reins, le foie, le muscle squelettique et le cerveau. LDH catalyse la réduction du pyruvate, résulté dans la voie d'Embden-Meyerhof, en au lactate, dans des conditions d'anaérobiose relatives (en muscle squelettique en contraction, foie, reins) ou dans les tissus qui n'ont pas l'équipement nécessaire au métabolisme aérobie du pyruvate (rétine, les tissus embryonnaires et néoplasiques, les globules rouges, les fibres musculaires blanches).

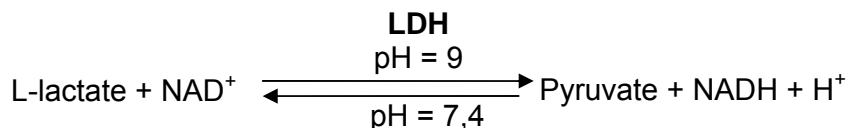
Sous l'action de la LDH se déroule aussi la reoxydation du lactate, envoyé par le foie le myocarde et les reins dans le sang, avec la génération du pyruvate, qui servira de substrat pour la gluconéogenèse.

Application pratique

1. Détermination de la LDH sérique – variante A (kit Biocon code 2113)

Principe

On incube le réactif contenant le pyruvate et le NADH,H⁺ avec l'enzyme (sérum) à pH 7,5. On vise la diminution de l'absorption à 340 nm (test optique).



Réactifs

1. Réactif 1: contiens tampon Tris 80 mmol/l, pH=7,5; NaCl 200 mmol/l; pyruvate 1,6 mmol/l
2. Réactif 2: contiens NADH 0,200 mmol/l

Réactif de travail: pour préparation, on dissoudre le réactif 2 avec un volume approprié de réactif 1. La stabilité du réactif de travail est de 3 jours à 20 – 25°C ou de 3 semaines à 2 – 8°C.

Matériel biologique

- Sérum non hémolysé

Mode opératoire

Introduises dans la cuvette du spectrophotomètre :

Réactif, μL	Probe
Réactif de travail	1000
Sérum	40

Mélangez, puis lisez l'absorption initiale à 340 nm et en même temps démarrer le chronomètre. Lisez l'absorption à nouveau après 30 secondes, 1, 2 et 3 minutes. Calculez $\Delta E / \text{minute}$.

Calcul

$$\text{LDH (UI/l)} = \Delta E / \text{minute} \times 4127$$

Valeurs normales

Adultes: 138 - 276 UI/l

Valeurs pathologiques

LDH-1 HHHH	20-30%	coeur, globules rouges, rein, cellules germinales, cerveau
LDH-2 HHHM	25-35%	coeur, globules rouges, rein (mais en moindre quantité que la LDH-1), cerveau
LDH-3 HHMM	20-30%	Poumons, plaquettes, tissus lymphoïdes, néoplasiques
LDH-4 MMMH	5-13%	globules blancs, nodules lymphatiques, muscle, foie (mais en moindre quantité que la LDH-5), tissus néoplasiques
LDH-5 MMMM	2-11%	foie, muscles, tissus néoplasiques, peau

Des niveaux élevés d'isoenzymes LDH peuvent indiquer :

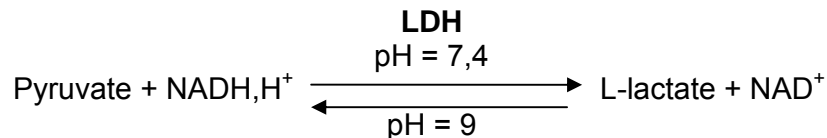
- **Infarctus du myocarde** : Dans l'infarctus du myocarde la LDH-1 est la plus augmentée (et donc le rapport LDH-1/LDH-2 devient supérieur à 1). Aujourd'hui, la troponine a remplacé ce dosage, car elle est plus sensible et spécifique des lésions cardiaques.
- **Embolie pulmonaire** : cette affection douloureuse thoracique se traduit par une augmentation de la LDH (en particulier LDH2 et LDH3) avec des taux de CPK normaux.
- **Infarctus rénal** : avec une élévation des fractions LDH1 et LDH2.
- **Hépatites, cirrhoses, cholestases, cancer du foie** : on note dans ce cas une augmentation de la LDH5 avec un rapport LDH-5/LDH-2 qui devient supérieur à 1.
- **Maladies musculaires, dystrophies, myopathies inflammatoires** : dans les atteintes des muscles (myolyses), on retrouve une élévation des fractions LDH1 et 2 dans les dystrophies et une élévation de la fraction LDH5 dans les nécroses, les traumatismes, les myopathies inflammatoires.
- **Lymphomes, leucémies aiguës** : l'augmentation porte sur la fraction LDH3

- Certaines anémies (mégaloblastiques, hémolytiques), prothèses valvulaires et érythroblastoses fœtales : augmentation essentiellement des fractions LDH1 et LDH2.
- Certaines tumeurs: des cellules germinales – ovaire et testicule - (augmentation de LDH1); prostate, sein, côlon, poumon, estomac, utérus (LDH4 et 5) ; neuroblastomes, phéochromocytomes, cancers bronchiques (augmentation de LDH2,3 et 4)
- Etats de choc, brûlures, actes chirurgicaux, comas, collagénoses, rejets de greffe : augmentation de la LDH total.

2. Détermination de l'acide lactique dans le sang

A cause de son production, réalisée dans certains tissus (érythrocytes, rétine, cartilage), même en présence d'oxygène, le lactate est normalement présent dans le plasma en une concentration d'environ 9 mg%. La réalisation de la glycolyse anaérobie dans un tissu détermine l'augmentation en excès du lactate dans l'effluent plasmatique de ce tissu.

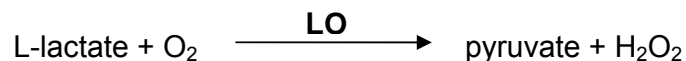
Les techniques enzymatiques utilisées pour déterminer le lactate utilisent l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) ou la lactate oxydase (LO). Dans les techniques utilisant la lactate déshydrogénase, la réaction de base est la suivante:



Metodele care folosesc lactat oxidaza au la bază reacția:

Que l'équilibre de réaction soit déplacé vers la gauche, on doit avoir des conditions adéquates pour que la réaction conduise à la formation du pyruvate: pH = 9, excès de NAD^+ et l'utilisation d'un agent de liaison du pyruvate. Le NADH résulté est mesuré par spectrophotométrie ou fluorimétrie.

Les méthodes avec la lactate oxydase sont basées sur la réaction:

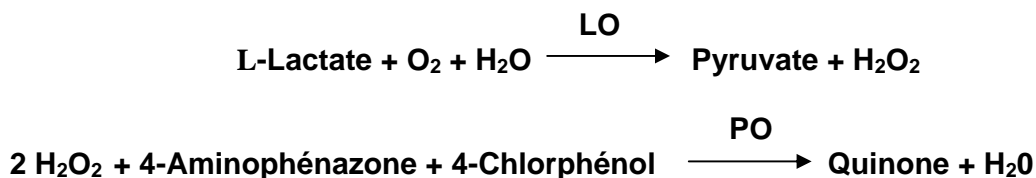


Le peroxyde d'hydrogène résultant peut être déterminé par spectrophotométrie ou en utilisant une électrode spécifique.

DÉTERMINATION D'ACIDE LACTIQUE

Principe de la méthode :

L'acide lactique est oxydé par lactate oxydase (LO) pour former l'acide pyruvique et le peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène, en présence de 4-aminophénazone et 4-chlorophénol est transformé sous l'influence de la peroxydase (PO) en un produit de couleur rouge (quinone), dont l'absorption de rayonnement est mesurée à $\lambda = 505 \text{ nm}$ (l'intensité de couleur est directement proportionnelle à la concentration de l'acide lactique).



Réactifs:

- Réactif de travail:
R1 = 4-chlorophénol 4mol/L dans tampon
R2 = enzymes (LO = 800 U/L et PO = 2000 U/L) + 4-Aminophénazone 0,4 mmol/l
- Mélangez 1 flacon de R2 avec 10 ml R1 pour obtenir le réactif de travail
- Eau double distillée
- solution d'étalon – acide lactique = 10 mg/dl
- Sérum / plasma pour analyse.

Mode opératoire

Pipetez dans 3 tubes:

Réactif (µl)	Echantillon	Étalon	Témoin
Réactif de travail	500	500	-
Sérum	100	-	-
Solution d'étalon	-	100	-
Eau double distillée	-	-	600

- Homogénéisez les tubes très lentement
- Incubez 10 minutes à la température du chambre
- Équilibrez le spectrophotomètre avec le témoin (le zéro) au $\lambda = 505$ nm
- Lisez les absorptions du échantillon (AEch) et de l'étalon (AEt) au $\lambda = 505$ nm (la stabilité de la couleur est de 30 min);

Calcul

$$\text{Concentration d'acide lactique (mg/dl)} = [A_{\text{Ech}} / A_{\text{Et}}] \times 10$$

Valeurs normales

Acide Lactique = 5 – 20 mg/dl (0,5 – 2,2 mmol/l)

Facteur de conversion: mg/dl X 0.111 = mmol/l

A. Détermination de l'acide lactique par la méthode enzymatique avec la LDH

Principe

L'acide lactique sanguin est déshydrogéné et converti en l'acide pyruvique. La réaction est catalysée par la LDH à un pH de 9,00. Le NADH résultant est mesurée l'augmentation de l'absorption de la lumière à 340 nm, étant proportionnelle à la quantité de lactate.

Réactifs et matériaux

1. Acide perchlorique 0,6 N
2. Tampon Glycocolle 0,1 M, pH = 9,00
3. Glycocolle 0,5 M
4. Hydrazine 0,4 M
5. Solution de lactate déshydrogénase (LDH) - 2 mg/ml, contenant environ 650 unités / ml
6. Solution de nicotinamide adénine dinucleotide (NAD⁺), 27 mM
7. Solution étalon d'acide lactique 20 mg/100 ml, acide perchlorique 0,6 N

Les réactifs sont conservés dans un réfrigérateur à + 4°C.

Le matériel biologique

Pour obtenir des résultats plus précis une grande importance devrait être accordée à la récolte des échantillons. La stase veineuse augmente la lactacidémie et les érythrocytes, métaboliquement actives, transforment le glucose en acide lactique. Le sang refroidi à 4°C peut être utilisé sans changements significatifs dans la concentration de lactate à 2 heures suivant le prélèvement. Il est recommandé que l'échantillonnage pour déterminer la présence de la lactacidémie soit effectué en présence d'iodoacétate (dans le tube de prélèvement), afin que l'échantillon puisse être conservé à température ambiante plus de 2 heures. Le fluorure de sodium peut également être utilisé comme inhibiteur de la glycolyse.

Mode opératoire

Déprotéinisation

Le sang collecté est immédiatement déprotéinisé comme suit: 1 ml d'une solution d'acide perchlorique et 0,5 ml de sang sont pipetés dans un tube à centrifuger. Ensuite il faut bien mélanger le tube et centrifuger 10 minutes à 3000 tours/minute. Le surnageant obtenu est utilisé dans la détermination.

Les réactifs sont pipetés dans des tubes selon le tableau:

Réactif (ml)	Echantillon	Étalon	Témoin
Surnageant	0,20	-	-
Étalon	-	0,20	-
Acide perchlorique	-	-	0,20
Tampon glycolle, pH = 9	2,00	2,00	2,00
LDH	0,02	0,02	0,02
NAD ⁺	0,20	0,20	0,20

- Homogénéisez les tubes très lentement
- Incubez une heure minutes à la température du laboratoire (25°C)
- Équilibrez le spectrophotomètre avec le témoin (le zéro) au $\lambda = 340 \text{ nm}$
- Lisez les absorptions de la probe (AP) et de l'étalon (AE) au $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Calcul

$$\text{Concentration d'acide lactique (mg/dl)} = [A_P / A_E] \times 20$$

Valeurs normales

Acide Lactique = 5 – 20 mg/dl (0,5 – 2,2 mmol/l)

Variations physiologiques

La valeur de l'acide lactique est augmentée chez les nouveau-nés, après une activité musculaire intense, après des émotions fortes, au dernier trimestre de la grossesse, etc.

Variations pathologiques

Le lactate s'accumule lors de tout épisode d'anoxie et de toute situation perturbant la respiration cellulaire.

Les causes les plus fréquentes d'acidose lactique secondaire comprennent :

- toute défaillance d'organe sévère: insuffisance cardiaque, hépatique, rénale, les états de choc avec défaillance circulatoire, l'ischémie d'un organe ou l'hypoxémie, les cardiomyopathies, les convulsions, la ventilation assistée, la septicémie ;

- certaines situations chroniques: diarrhée chronique, anémie chronique sévère, diabète sucré, infection urinaire chronique ;
- certaines intoxications : biguanides, éthanol ;
- les prélèvements « difficiles » avec utilisation de garrot, chez un patient qui s'agite ou un prélèvement non conservé dans la glace jusqu'à son acheminement au laboratoire. La cétose est absente dans les hyperlactacidémies secondaires, elle est souvent présente dans les maladies héréditaires du métabolisme

Les hyperlactacidémies sont associées à une hypoxie tissulaire due à maladies du foie, insuffisance circulatoire, des troubles hématologiques, épilepsie, des convulsions, choc infectieux, choc cardiogénène, infarctus du myocarde, postopératoire, intoxication médicamenteuse par des antihistaminiques, des néoplasmes.

Hypolactacidémie: insuffisance rénale