

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 !!!)

DÉTERMINATION DES TRIGLYCÉRIDES SÉRIQUES

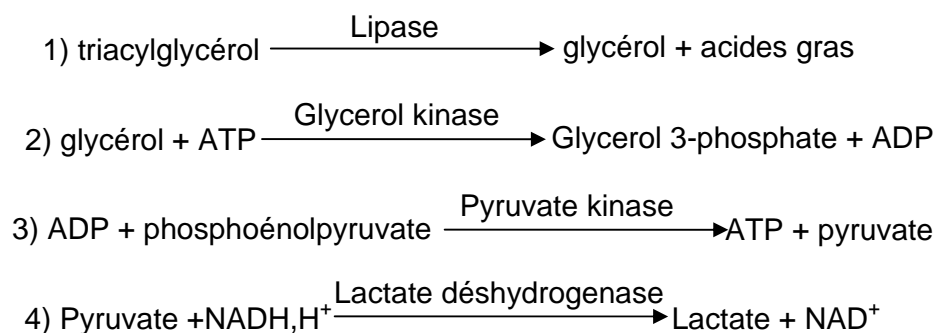
Introduction

Les triacylglycérols, nommés graisse neutre, ne donnent pas une réaction de reconnaissance spécifique, par conséquent, aucune détermination ne peut être faite directement, mais soit on utilise un moyen indirect de les déterminer, par calcul, ou un moyen directe, mais en utilisant uniquement une partie composante de la molécule à travers laquelle on calcule ensuite la quantité de composé.

La détermination des triacylglycérols sériques ou plasmatiques est utilisée pour l'évaluation et le diagnostic différentiel de l'hyperlipidémie primaire ou secondaire et d'évaluer les facteurs de risque de pancréatite aiguë.

Les méthodes actuelles sont basées sur la détermination du glycérol de triacylglycérols, détermination qui peut être basée sur des techniques chimiques ou enzymatiques.

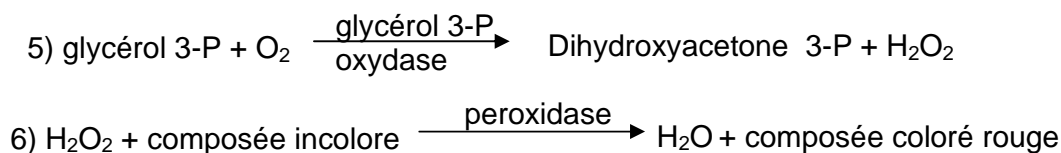
Les techniques enzymatiques utilisés aujourd'hui sont basés sur une séquence de réactions enzymatiques données ci-dessous, dans chaque cas, il s'agit d'une enzyme caractéristique. Pour la technique qui utilise la pyruvate kinase, avec la mesure finale dans l'ultraviolet, la séquence de réactions est:



La réduction de l'absorption du rayonnement à 340 nm est directement proportionnelle à la concentration des triacylglycérols sériques.

En utilisant des techniques basées sur la glycérolphosphate oxydase, la séquence de réactions est la suivante:

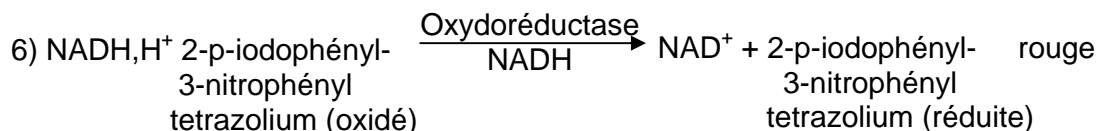
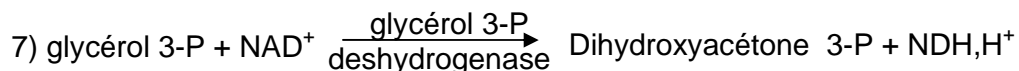
- Les premières deux réactions effectuées sont identiques que la technique ci-dessus, puis suit:



L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration des triacylglycérols.

Les méthodes pour lesquelles l'enzyme caractéristique est la glycérolphosphate déshydrogénase (GPD), la séquence de réactions est la suivante:

- Les deux premières réactions sont identiques à des réactions 1 et 2 ci-dessus, puis suit:



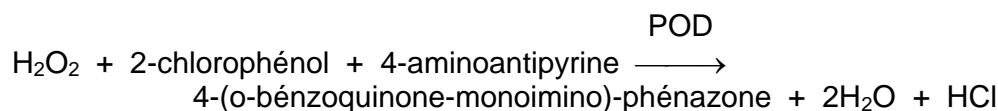
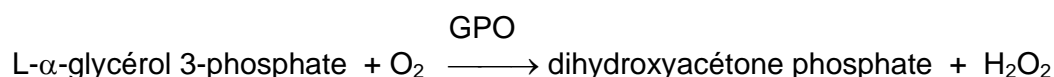
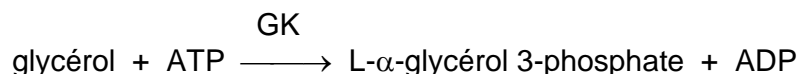
La production du composé coloré est directement proportionnelle au niveau des triglycérides.

Partie expérimentale

La détermination des triacylglycérols sériques par la méthode enzymatique

Principe

Les triacylglycérols sont hydrolysés en glycérol et acides gras libres par les lipases spécifiques. Le glycérol, puis réagit comme suit:



Où:

GK - glycérol kinase,

GPO - glycérol phosphate oxydase,

POD - peroxydase

Réactifs

1. Tampon PIPES [acide pipérazine-N,N'-bis-(2-éthansulfonique)], 0,1 M, pH = 7,5
 2. Mélange réactif (acétate Mg – 12,8 mM; 4-aminoantipyrine – 1mM; ATP – 2 mM; 2 – chlorophénol – 2mM; peroxydase – 1 U/ml; glycérol kinase – 0,2 U/ml; glycérophosphate – oxydase – 1,5 U/ml; lipase – 10 U/ml; polyéthylène glycol-monoéthyle éther – 2 g/l.
 3. Solution étalon de triacylglycerols – 200 mg%;
 4. Matériel biologique: sérum ou plasma (sang récolté sur EDTA ou héparine);
- Le sérum et la solution étalon doivent être diluées 1/10.

Mode opératoire

Pipetez dans trois tubes, notés P (échantillon), E (étalon) T (témoin) comme suit:

Réactifs (µl)	P	E	T
Sérum	100	–	-
Solution étalon	–	100	-
Eau distillée	-	-	100
Mélange réactif	1000	1000	1000

Mélangez, incubez 5 minutes à 37°C. Mesurez l'absorption de la lumière A_P et A_T à la longueur d'onde de 546 nm, en équilibrant le spectrophotomètre avec le témoin, pour une période de 60 minutes.

Calcul

$$\text{mg\% triacylglycérols} = [A_P / A_E] \times 200$$

La linéarité est respectée pour des concentrations allant jusqu'à 800 mg de triacylglycérols / 100 ml sérum. Pour des concentrations sériques plus élevées, diluez les probes avec une solution saline.

Valeurs normales

Femmes : 40 - 140 mg/100 ml de sérum

Hommes : 60 - 165 mg/100 ml de sérum

Signification clinique

Les triacylglycérols augmentent dans le sérum: hyperlipoprotéinémies primaires, sauf de type IIa, infarctus du myocarde, diabète, obésité, hypothyroïdie, maladies du foie, jaunisse obstructive, syndrome néphrotique, grossesse, traitement avec cortisol, traitement avec oestrogène.

Les triacylglycérols diminuent dans le sérum: anémie sévère, maladies de consommation, dépression, famine, hyperthyroïdie, brûlures, entéropathie exsudative.

LA CÉTOGÉNÈSE

Introduction

La cétogénèse est un processus de transformation métabolique à acétyl-CoA en corps cétoniques.

L'acétyl-CoA peut survenir dans le corps : des acides gras par bêta-oxydation, du glucose et des acides aminés par le catabolisme aérobie. Il est utilisé dans la synthèse des acides gras et triacylglycérols, dans la synthèse du cholestérol et cétogénèse.

Les corps cétoniques sont des composés qui se forment principalement au cours du catabolisme lipidique, le processus étant étroitement lié au métabolisme du glucose.

Les corps cétoniques sont représentés par:

- acide acétoacétique
- acide bêta hydroxybutyrique
- acétone

La cétogenèse se déroule exclusivement dans le foie, dans les mitochondries, le produit primaire étant l'acide acétoacétique.

L'acide acétoacétique est un métabolite inerte pour le foie, qui ne peut pas être catabolisé puisque le foie est dépourvu d'équipement enzymatique nécessaire à l'activation d'acide acétoacétique (succinyl-CoA-acétoacétate-CoA transférase).

Les tissus extrahépatiques (muscle squelettique, myocarde, tissu rénal et tissu nerveux) peuvent utiliser énergogéniquement l'acétoacétate et bêta-hydroxybutirate. Les corps cétoniques sont des substrats énergogéniques utilisés dans des situations de famine, efforts prolongés, lorsque le glucose est épargné pour les tissus strictement dépendants de lui.

L'acétone est un composé caractéristique pour la pathologie cétogénique et est une substance volatile qui est éliminée par les poumons, ce qui explique pourquoi les patients diabétiques ont une odeur d'air expiré caractéristique.

Dans des conditions normales, la production de corps cétoniques est faible, la concentration sanguinaire étant de 1 mg/100 ml. L'excrétion urinaire est minimale (10 mg/24 heures), de telle sorte que la réaction pour les corps cétoniques est négative.

Quand il y a un déficit d'insuline ou de l'apport de glucose est diminuée, la production de corps cétoniques augmente.

Si l'apport de glucose est faible (la famine), l'augmentation de la production de corps cétoniques est une adaptation métabolique, les corps cétoniques étant une source d'énergie utilisée pour remplacer le glucose. Dans ces conditions, le glucose est oxydé seulement par les cellules strictement dépendantes de lui, le reste des tissus en utilisant des substrats énergétiques alternatives (corps cétoniques, acides gras). Le glucagon, les catécholamines et les glucocorticoïdes sont les principales hormones qui coordonnent les réactions de mobilisation des réserves énergétiques et le tissu adipeux a le rôle clé de fournisseur de substrats énergétiques. Le mécanisme d'hyperproduction de corps cétoniques implique une lipolyse intense dans le tissu adipeux, avec une libération accrue d'acides gras. Les acides gras libres sont ensuite utilisés par les tissus (à l'exception du cerveau et les globules rouges) pour soutenir leurs besoins en énergie. Dans le foie, dans ces conditions, des quantités accrues de corps cétoniques sont synthétisés, qui fournissent de l'énergie alternative pour tous les tissus, y compris le cerveau.

Le diabète sucré, l'état pathologique caractérisé par une carence en insuline, relative ou absolue, est caractérisé par la prévalence de la lipolyse dans le tissu adipeux et une augmentation des acides gras libres dans le sang. Dans le foie, il en résulte dans une première étape, une synthèse accrue de triacylglycérols endogènes (hypertriacylglycérolémie endogène, les triacylglycérols étant inclus dans les VLDL et renvoyés en circulation), puis une surproduction de corps cétoniques (acétonémie - cétose) et une infiltration graisseuse.

La cétose est l'état pathologique caractérisé par une synthèse hépatique accrue d'acétoacétate, synthèse qui dépasse la capacité de tissus extrahépatiques d'utiliser les corps cétoniques et le résultat est l'augmentation de la cétonémie et l'apparition de la cétonurie. Parce que l'élimination des corps cétoniques est fait sous forme de sels, ils consomment la réserve alcaline du corps et l'acidose apparaisse.

La mise en évidence des corps cétoniques dans l'urine

Principe

La méthode utilise le réactif Legal-Imbert (mettant en évidence l'acide acétylacétique et l'acétone). Les corps cétoniques dans l'urine donnent avec le nitroprussiate et l'ammoniac un mélange de couleur violette.

Réactifs et matériaux

1. Urine frais du matin
2. Réactif Legal-Imbert: nitroprussiate de sodium + acide acétique glacial
3. Solution d'ammoniaque à 25%

Mode opératoire

Placez dans un tube à hémolyse 2 ml d'urine filtrée. Ajoutez 5-6 gouttes de réactifs Legal-Imbert et mélangez. Sur la paroi interne du tube suintez 7-8 gouttes d'ammoniaque concentrée de manière à former une couche sur la surface de l'urine. Laissez le tube reposer 15 minutes.

L'apparition d'un anneau violet à l'interface entre les deux phases liquides indique la présence de corps cétoniques dans l'urine. L'urine normale ne donne pas une coloration violette.