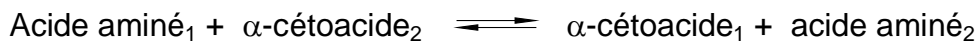


METABOLISM D'ACIDES AMINÉS

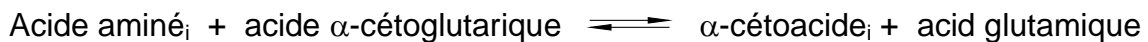
DOSAGE DE TRANSAMINASES SÉRIQUES

Introduction

Les protéines sont catabolisées dans la première étape jusqu'aux acides aminés, leurs constituantes primaires. Les acides aminés sont utilisés sur des voies anaboliques (synthèse de protéines, synthèse de base puriques et pyrimidiques, porphyrines, amines biologiquement actives, etc.) et aussi de voies cataboliques. En cas du catabolisme d'acides aminés, pour l'utilisation de leurs squelette hydrocarboné, la première étape est le processus de désamination (soit oxydative ou par transamination). Les transaminases ou aminotransférases sont un group d'enzymes tissulaires qui ont comme group prosthétique le pyridoxal 5-phosphate. Elles catalysent l'interconversion d'un acide aminé en α -cétoacide par le transfère de son group aminique à un autre α -cétoacide:



Une partie d'acides α -aminés transfèrent le group amine à l' α -cétoglutarate, en formant l'acide glutamique:



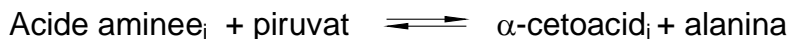
L'acide glutamique, à son tour, dans une deuxième réaction de transamination, transfère le groupe amine à l'acide oxaloacétique, réaction catalysée par la glutamate-aspartate transaminase :



Le group amine de la majorité d'acides aminés est canalisé vers la formation d'acide glutamique ou acide aspartique, qui, à leur tour, peuvent passer de l'un à l'autre, conformément à la réaction précédente.

La désamination oxydative du glutamate produits ammoniacque et régénère l'acide α -cétoglutarique pour un nouveau cycle de réactions de transamination. L'ammoniacque et l'aspartate sont les fournisseurs de groupes amine pour la synthèse d'urée.

La réaction de transamination dans le muscle utilise comme substrate l'acide pyruvique, de telle sorte que le produit de la réaction est l'alanine.



L'alanine formée est transférée dans le sang, qui la transporte au foie ou elle soufre une réaction de transamination en résultant le pyruvate qui est utilisé pour la gluconéogenèse. Le glucose résulté est transporté par voie sanguinaire au muscle, ou il est catabolisé oxydative en pyruvate. Ce cycle est nommé **le cycle glucose-alanine** et a le but de transporter l'azote du muscle au foie.

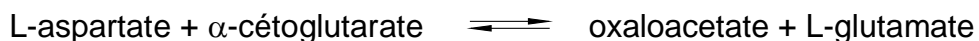
Les transaminases, présentes dans le sang, sont exclusivement d'origine intracellulaire et ont une concentration dans le sérum des milliers et de dizaines de milliers de fois plus petite que les cellules. Leur concentration sérique augmente en cas d'altération de la membrane cellulaire, ce qui permet leur passage dans le liquide interstitielle, la lymphe et le plasma.

La magnitude d'augmentation de la concentration sérique des transaminases dépend de plusieurs facteurs, notamment: l'emplacement intracellulaire et la perméabilité des membranes cellulaires et mitochondriaux, le degré de la vascularisation de l'organe blessés, la solubilité de l'enzyme dans le liquide extracellulaire, la vitesse de catabolisation de l'enzyme dans le plasma et le nombre de cellules lésées. Les enzymes (et les transaminases ne font exception) sont soumis à un processus de transformation impliquant la synthèse, l'activation, l'inactivation et leur catabolisme.

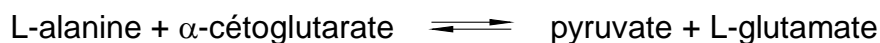
Les transaminases ayant arrivées dans le plasma, leur activité décroît rapidement. La demi-vie (en heures) est d'environ 46-58 heures pour l'ASAT et de 63-88 heures pour l'ALAT (seules les enzymes dont la demi-vie est supérieure à 6 heures font l'objet d'investigation de routine dans les laboratoires cliniques). La diminution de l'activité enzymatique peut être causée par: l'inactivation des enzymes, leur élimination dans l'urine, et de leur capture et la dégradation par les macrophages.

Pour le diagnostic clinique, d'une importance particulière sont:

- a) glutamate-oxalacétate transaminase (GOT ou ASAT), qui catalyse la réaction:



- b) glutamate-pyruvate transaminase (GPT ou ALAT) qui catalyse la réaction:



Il y a dans le cytoplasme de la cellule et les mitochondries des isoenzymes (transaminases) différentes. GOT a une double localisation, à la fois dans les mitochondries et le cytoplasme, tandis que la GPT n'est présent que dans le cytoplasme. Par exemple, dans une légère blessure aux tissus du foie, l'isoenzyme qui apparaît dans le sérum provient du cytoplasme cellulaire, même si une petite quantité d'isoforme mitochondriale est présente. Pour de graves lésions tissulaires l'isoforme mitochondriale est aussi libérée en quantités importantes.

La détermination de l'activité sérique des transaminases peut être fait par plusieurs méthodes, parmi lesquelles se trouvent des méthodes basées sur les réactions de couleurs et le test optique.

Application pratique

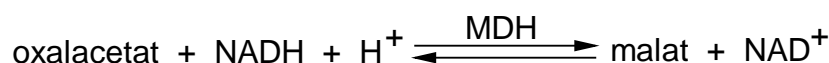
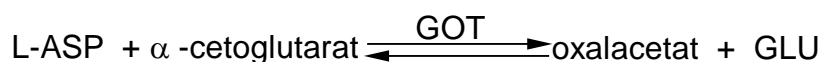
A. Détermination des transaminases sériques méthode d'essai optique

La localisation intracellulaire des transaminases est différentes: ASAT est présente dans le cytoplasme et mitochondries et ALAT est présente uniquement dans le cytoplasme. La libération des quantités significatives de l'isoforme mitochondriale est fait en cas d'une blessure grave de l'organe affecté.

A. Détermination de l'activité sérique de l'ASAT (GOT) – méthode cinétique enzymatique (test optique)

Principe

On utilise le test optique couplé avec une réaction indicatrice :



La diminution d'absorption est enregistrée à 340 nm ; il est directement proportionnel à la quantité de L-ASP (substrate) transformé, et, par conséquence, à l'activité de GOT.

Réactifs

1. Réactif 1: - tampon Tris, 100 mmole / l, pH = 7,8, L-aspartate, 200 mmole / l, LDH 800 U / l ; - MDH (malate déshydrogénase), 600 U / l
2. Réactif 2: - NADH, 0,18 mmole / l ; α - cétooglutarate, 12 mmole / l

Pour préparer le réactif de travail, faites dissoudre le contenu du flacon R2 avec le volume approprié de R1. Mélangez et laissez reposer pendant 15 minutes. Le réactif est stable une semaine à 2-8°C.

3. sérum

Mode opératoire

Pipettez dans la cuvette de spectrophotomètre 1000 μ l réactif de travail et 100 μ l sérum. Mélangez, incubez pendant 1 minute à la température ambiante. Equilibrez le spectrophotomètre avec la cuvette vide (air). Lisez l'absorbance de la probe à 340 nm, exactement après 1, 2 et 3 minutes. Calculer ΔE / minute.

Calcul de l'activité enzymatique :

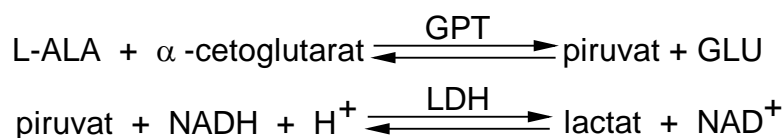
$$\text{ASAT (U/L)} = \Delta E / \text{minute} \times 1746$$

Valeurs normales: - hommes: 0 – 25 U/l
- femmes: 0 – 21 U/l

B. Détermination de l'activité sérique de l'ALAT (GPT) – méthode cinétique enzymatique (test optique)

Principe

On utilise le test optique couplé avec une réaction indicatrice :



La diminution d'absorption est enregistrée à 340 nm ; il est directement proportionnel à la quantité de L-alanine (substrate) transformé, et, par conséquence, à l'activité de GPT.

Réactifs:

1. Réactif 1: LDH, 1200 U / l de L-alanine, 500 mmole / l de tampon Tris, 100 mmole / l, pH = 7,8
2. Réactif 2: α -cétooglutarate, 15 mmol / l NADH, 0,18 mmol / l
Pour préparer le réactif de travail, faites dissoudre le contenu du flacon R2 avec le volume approprié de R1. Mélangez et laissez reposer pendant 15 minutes. Le réactif est stable une semaine à 2-8°C.
3. sérum

Mode opératoire

Pipettez dans la cuvette de spectrophotomètre 1000 µl réactif de travail et 100 µl sérum. Mélangez, incubez pendant 1 minute à la température ambiante. Equilibrez le spectrophotomètre avec la cuvette vide (air). Lisez l'absorbance de la probe à 340 nm, exactement après 1, 2 et 3 minutes. Calculer $\Delta E / \text{minute}$.

Calcul de l'activité enzymatique :

$$\text{ALAT (U/L)} = \Delta E / \text{minute} \times 1750$$

Valeurs normales

- hommes: 0 – 29 U/l
- femmes: 0 – 22 U/l

Signification clinique

Les transaminases sont largement distribuées dans les tissus humains ; à la fois GOT et GPT sont normalement présents dans le plasma humain, la bile, le liquide céphalo-rachidien et la salive, mais aucun n'est présent dans l'urine, à moins que le rein soit endommagé. Dans **l'hépatite virale** et autres maladies du foie associés à une nécrose hépatique, les niveaux de GOT et GPT dans le sérum sont élevées avant même l'apparition des signes cliniques et les symptômes, comme le jaunisse.

L'activité des deux enzymes peut atteindre des valeurs jusqu'à 100 fois plus élevées que la normale, la plus courante étant une augmentation de 20-50 fois. Dans les hépatites toxiques ou virales, l'activité de GPT est généralement plus élevée que celle de GOT. Les valeurs enregistrées dans cirrhoses varient avec l'état du processus cirrhotique ; les valeurs GOT sont plus élevées que ceux pour la GPT.

Les valeurs légèrement surélevée de GOT et GPT peut être observée après l'ingestion d'alcool et après l'administration de médicaments tels que les opiacés, les salicylés, l'ampicilline, des benzodiazépines, du paracétamol, la plupart des neuroleptiques, etc.

Bien que les deux enzymes sériques sont plus élevés quand l'intégrité des cellules hépatiques est affectée, l'GPT est une enzyme avec une plus grande spécificité pour le foie ; valeurs élevées de GTP sont rarement observés dans des conditions autres que les maladies du foie.

Après un infarctus cardiaque il y a une augmentation de l'activité sérique de GOT. GOT et à l'occasion GPT ont valeurs élevées dans la **dystrophie musculaire progressive** et dans la **dermatomyosite**, atteignant valeurs jusqu'à 8 fois plus élevées. **L'embolie pulmonaire** peut augmenter GOT de deux à trois fois, la **pancréatite aiguë**, la **gangrène**, les **maladies hémolytiques** du deux à cinq fois.