

UE1 : Biochimie métabolique

Chapitre 2 :

Méthodes d'étude du glucose en biologie

Professeur Patrice FAURE

Année universitaire 2011/2012

Université Joseph Fourier de Grenoble - Tous droits réservés.

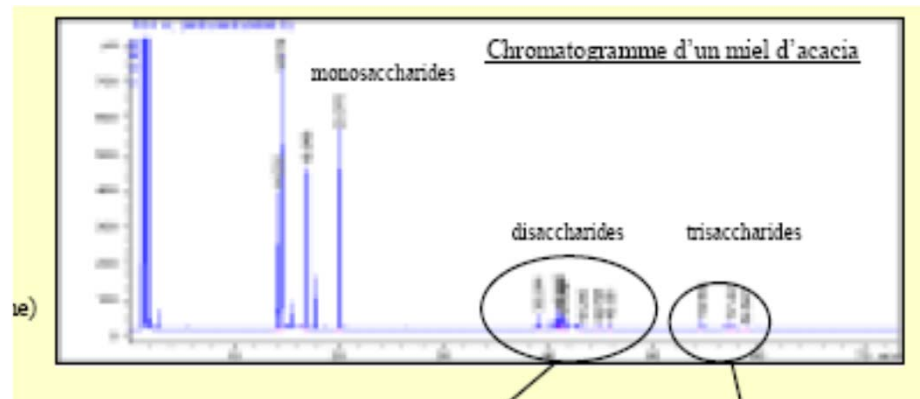
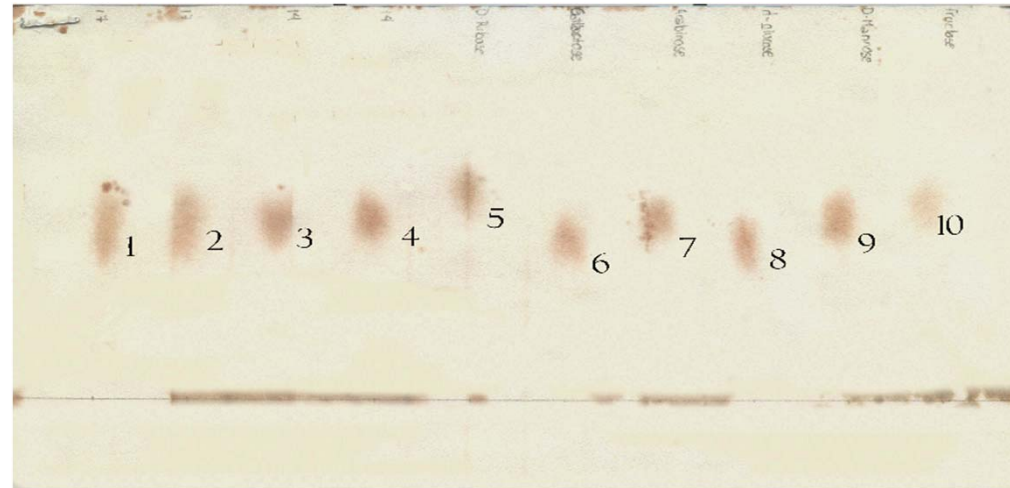
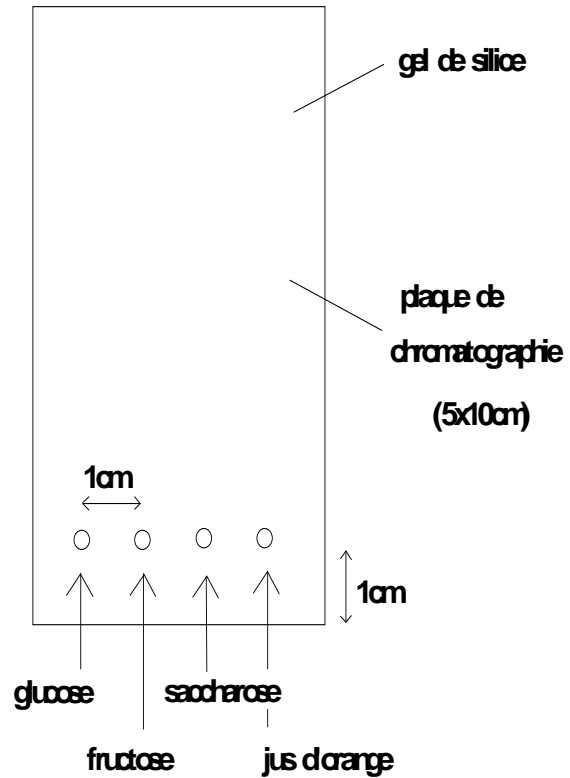
Plan

- Rappels sur les propriétés des sucres
- Méthodes d'étude physiques :
polarymétrie
- Méthodes chimiques
- Méthodes enzymatiques
- Etapes préanalytiques
- Sucres urinaires
- Le diabétique

Propriétés physiques des oses

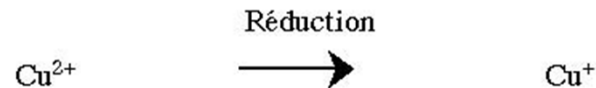
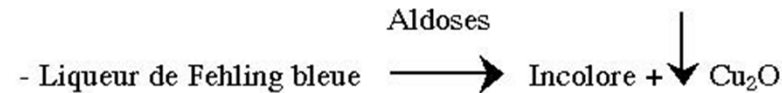
- **Solubilité**
 - Monosaccharides polaires, solubles dans l'eau (fructose > glucose)
 - solutions d'oses : visqueuses, denses
 - miel (d=1,40)
 - savueur sucrée
 - peu solubles dans alcool
 - plus solubles dans solvants organiques
- **Stabilité chimique**
 - hydrolysés en milieu acide
 - peuvent être oxydés par l'iode en milieu alcalin
- **Autres propriétés**
 - spectres infrarouges caractéristiques
 - déviations de la lumière polarisée
- **Séparation puis identification**
 - Chromatographie sur papier

Exemple d'une chromatographie des sucres sur papier



Propriétés générales des oses

1. Certains oses (fructose) ou osides (saccharose) ont un goût sucré.
2. Les oses sont très hydrosolubles en raison de leurs nombreuses fonctions alcooliques.
3. Les aldoses sont réducteurs par leur fonction hémiacétalique (pseudoaldéhydrique). Les cétooses sont très peu réducteurs :

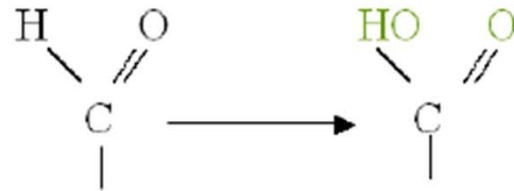


4. La Glucose oxydase oxyde spécifiquement le Glucose en acide gluconique.
5. Les oses se réduisent en polyols par voie chimique ou enzymatique.

Propriétés chimiques des oses

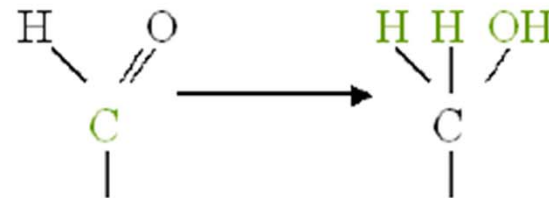
A. Fonction Carbonyle

1. Oxydation

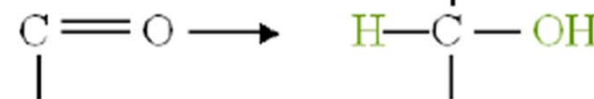


acide

2. Réduction



alcool primaire



alcool secondaire

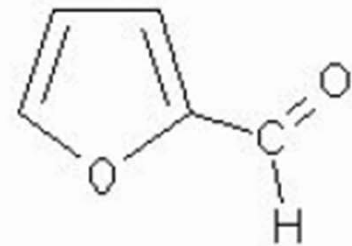
3. Condensation

- alcool
- azote : nucléotides
- phosphate : nucléotide oses

Propriétés chimiques des oses (suite)

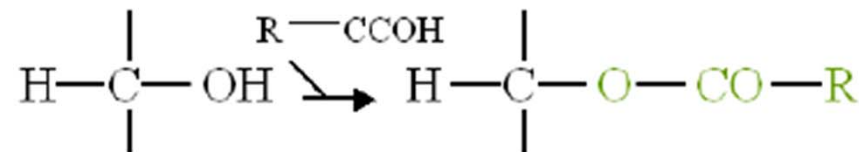
B. Fonction Alcool

1. Déshydratation interne et cyclisation

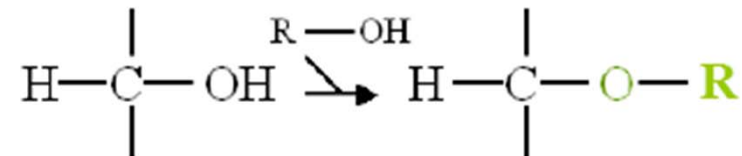


furfural

2. Esters



3. Ether oxydes



Méthodes physiques

Polarimétrie (loi de Biot) applicable à des solutions concentrées ($> 50\text{g. l}^{-1}$).

Pas utilisé en pratique biologique mais plutôt pour le dosage dans des aliments

Etude du pouvoir rotatoire d'un sucre

- L'appareil utilisé pour mesurer le pouvoir rotatoire est appelé **polarimètre**

Le polarimètre:

- * Une source de lumière qui est ici une lampe de sodium (lumière monochromatique de longueur d onde =589.5 nm : raie D)
- * Un prisme polariseur
- * Un tube polarimétrique qui contient la substance à analyser
- * Un second prisme analyseur que l'on tourne en tournant un cercle gradué en degré

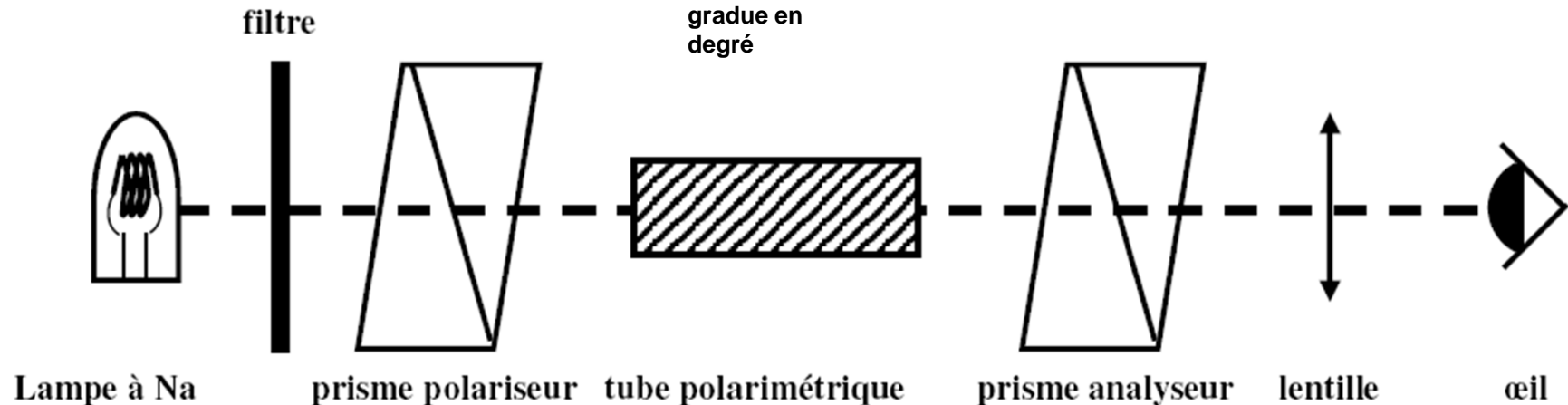
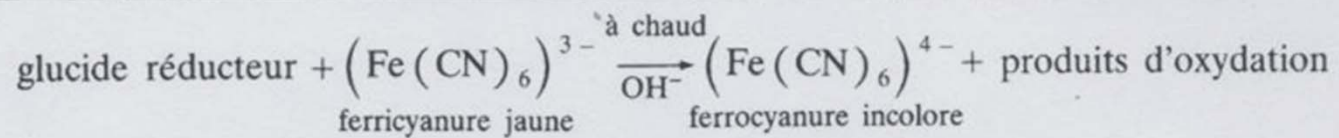


Schéma d'un polarimètre

Méthodes chimiques

- **Méthodes réductimétriques** (milieu alcalin et à chaud)
- Ce sont des réactions non stœchiométriques
- le mode opératoire (concentration des réactifs, conditions de chauffage) doit être observé scrupuleusement.
- Beaucoup d'interférences



Dosage du ferricyanure réduit par colorimétrie (autoanalyseur Technicon), méthode de Hoffman. Dosage de l'excès de ferricyanure par iodométrie, détermination de la glycémie par la méthode de Hagedorn et Jensen.

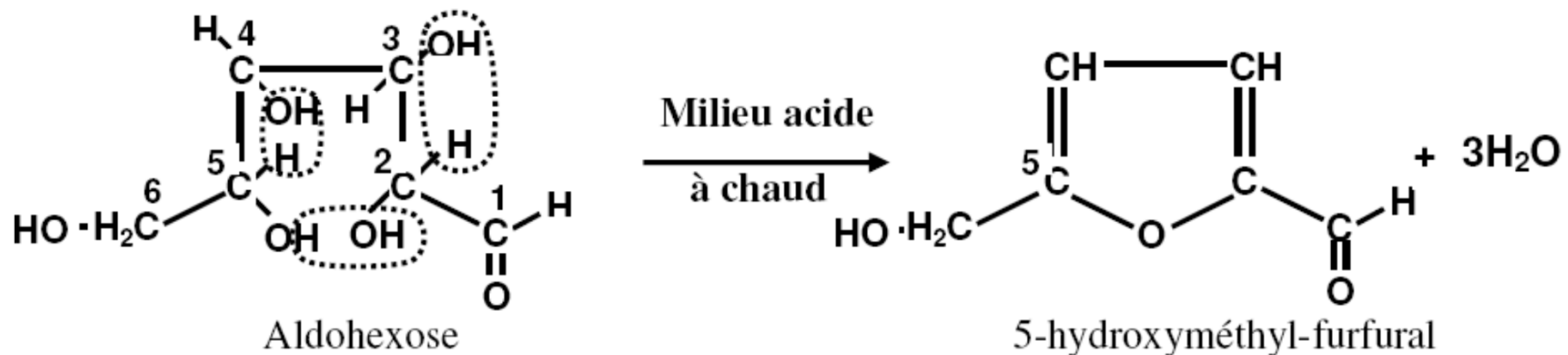
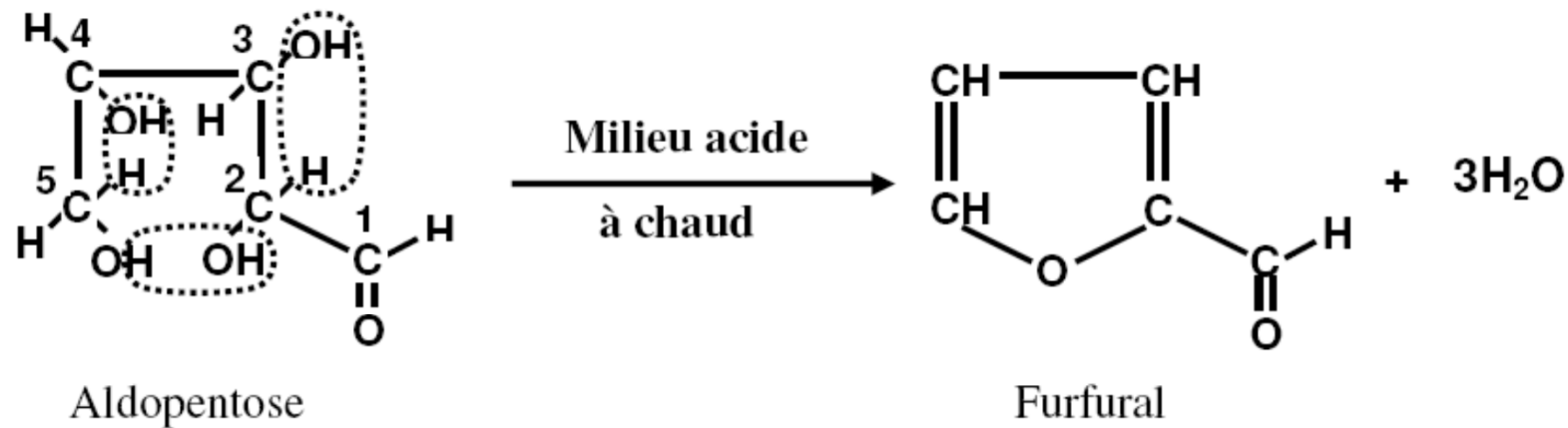
Réduction de composés organiques

Réduction de 3,5-dinitrosalicylate en milieu alcalin \Rightarrow couleur rouge

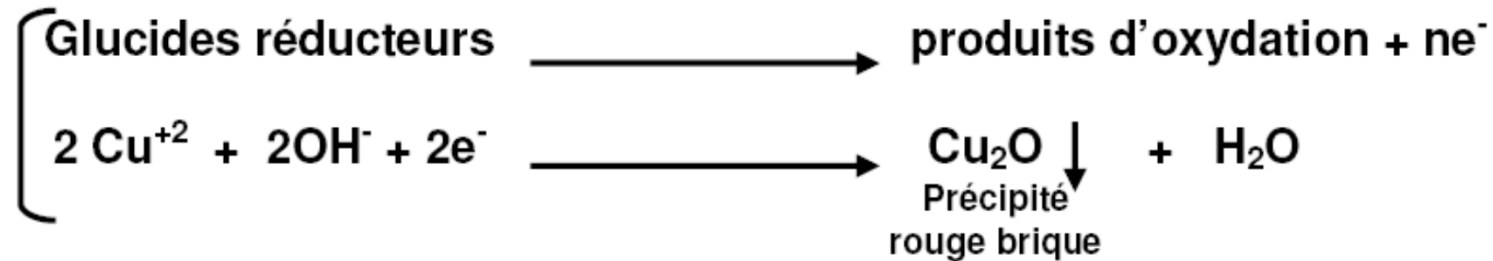
Méthodes furfuraliques : principe

- En milieu fortement acide et à chaud, les oses ayant au moins 5 atomes de carbones subissent une déshydratation et se transforment en furfural (si l'ose est un pentose) ou en un dérivé du furfural (si l'ose est un hexose).
- Aldopentose Furfural
- Aldoheptose 5-hydroxyméthyl-furfural
- Le furfural et ses dérivés peuvent se condenser avec des substances telles que les phénols,
- les amines aromatiques pour former des produits colorés caractéristiques.

Méthodes furfuraliques (milieu acide et à chaud) (pentoses et hexoses)



Réduction de sels de métaux lourds en milieu alcalin et à chaud



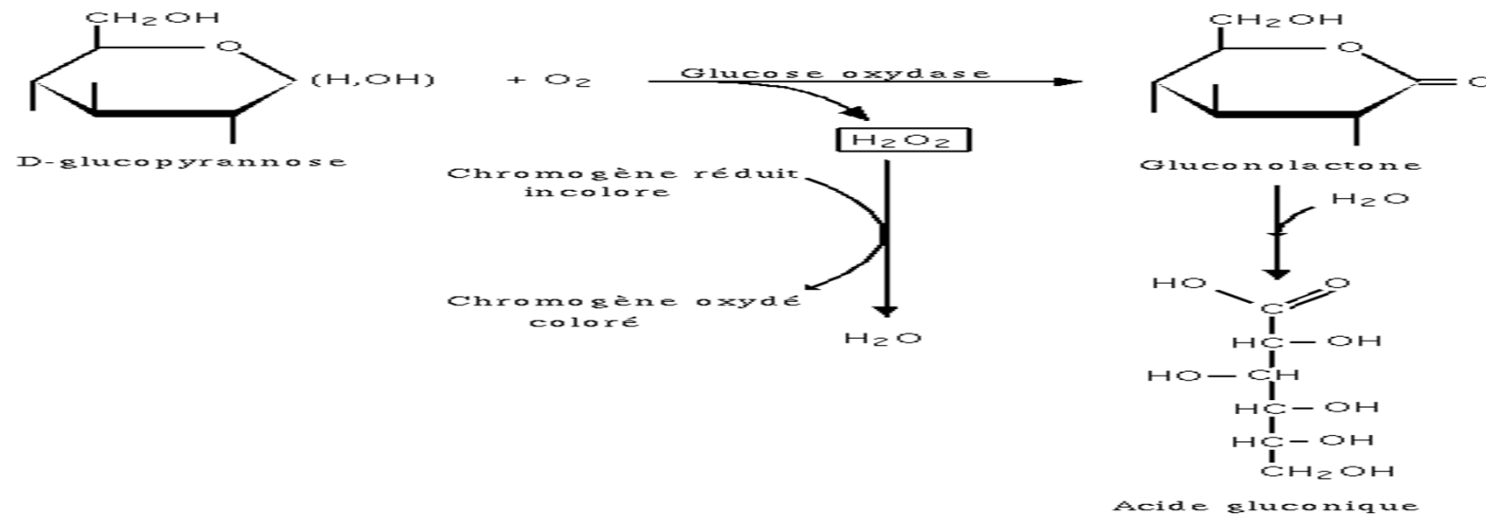
Détermination de la quantité de glucide réduisant la totalité d'une prise d'essai de solution cuivrique : dosage du glucose urinaire par les méthodes de Fehling et de Causse-Bonnans.

Utilisation de ces méthodes

- Répression des fraudes
- Œnologie
- Authenticité de certains produits naturels (les miels)
- Dosage dans les tissus

Techniques utilisant le système glucose-oxydase / peroxydase

Ces techniques exploitent la réaction d'oxydation du glucose selon le principe réactionnel suivant :



Différents modes d'évaluation de cette réaction sont possibles :

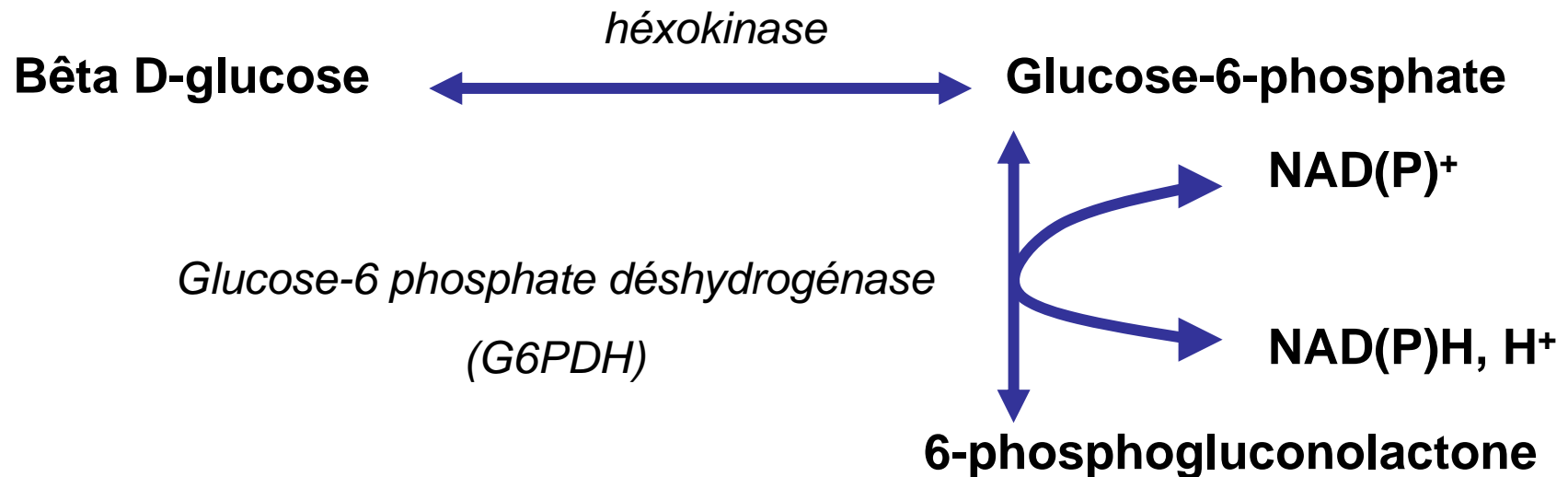
- Soit par une électrode de mesure de la consommation d'oxygène.

Les techniques mesurant la diminution de la pO₂ sont un peu sensibles à l'influence des substances réductrices.

- Soit par la mesure de la concentration de peroxyde d'hydrogène : il est mesuré par l'intermédiaire d'une réaction faisant intervenir une peroxydase et un chromogène donneur d'hydrogène pour donner naissance à un composé coloré dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie

Techniques utilisant le système hexokinase (HK) / glucose-6 phosphate déshydrogénase (G6PDH)

Elles se déroulent en deux étapes selon le schéma réactionnel suivant :



- Une réaction auxiliaire au cours de laquelle le bêta-glucose est phosphorylé ; cette réaction n'est pas spécifique du glucose.
- Une réaction indicatrice durant laquelle le substrat formé, sous l'action d'une G6PDH, est oxydé avec formation concomitante de NAD(P)H₂ dont l'absorbance est mesurée à 340 nm.

ETAPE PREANALYTIQUE

Glucose dans le sang

Le sujet doit être à jeun depuis au moins 12 heures et 16 heures au plus.

Le glucose peut être mesuré dans le plasma, dans le sérum ou dans le sang après déprotéinisation ou directement. Les valeurs obtenues dépendent du type de prélèvement effectué : les valeurs plasmatiques sont environ 12 à 13 % plus élevées que la glycémie mesurée sur le sang, étant donnée la différence de contenu en eau des érythrocytes et du plasma.

Glucose dans les urines

Le dosage du glucose est effectué sur une miction ou sur un échantillon des urines de 24 heures.

L'addition d'un antiseptique dans le flacon de recueil des urines est souhaitable, étant donnée la consommation possible du glucose par d'éventuels germes.

Il est possible de dépister une glycosurie par des bandelettes réactives utilisant la glucose-oxydase (Combur-test® Boehringer-Mannheim, Multistix® Ames-Bayer ...).

Celles-ci sont sensibles à l'interférence de nombreuses substances réductrices présentes dans les urines.

Exemple du patient diabétique

- Diagnostic et surveillance du diabète
- Doit réaliser une auto surveillance de sa glycémie
- Il utilise pour cela un lecteur de glycémie
 - Dépôt d'une goutte de sang sur une bandelette
 - Mise dans un lecteur d'utilisation simple
 - Technique ampérométrique (mesure indirecte de la consommation d'oxygène après une réaction enzymatique)
 - Indispensable au patient pour adapter son traitement



Retenir

- Les propriétés des sucres
- Le principe de la polarymétrie
- Le principe des méthodes chimiques
- Les méthodes enzymatiques
- Les situations biologiques citées

Mentions légales

L'ensemble de cette œuvre relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle, littéraire et artistique ou toute autre loi applicable.

Tous les droits de reproduction, adaptation, transformation, transcription ou traduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Cette œuvre est interdite à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'université Joseph Fourier (UJF) Grenoble 1 et ses affiliés.

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits à l'Université Joseph Fourier (UJF) Grenoble 1, et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.