

MEMOIRE
DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
DE
BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 14 Octobre 2005

par M^{lle} Hélène KERSPERN

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

MISE AU POINT DU DOSAGE DE CARNITINE SUR AUTOMATE
X-PAND[®] DIMENSION :
APPLICATION A UNE POPULATION D'HÉMODIALYSÉS

Président :

M. Jean-Marie BARD

Professeur de Biochimie

Membres du Jury :

M. Jean-Luc CARRE

Professeur de Biochimie, Directeur de thèse

M. Jacques DELARUE

Professeur de Nutrition

M. Tugdual TANQUEREL

Praticien Hospitalier (Unité d'Hémodialyse)

Mme Yolande AMET

Maître de Conférences de Biochimie

**MISE AU POINT DU DOSAGE DE
CARNITINE SUR
AUTOMATE X-PAND[®] DIMENSION :
APPLICATION A UNE POPULATION
D'HÉMODIALYSÉS**

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PREMIERE PARTIE : LA CARNITINE

I - HISTORIQUE.....	4
II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	6
III - METABOLISME DE LA CARNITINE.....	8
III.1 - LES SOURCES.....	8
III.1.1 - Apport exogène : alimentaire.....	8
III.1.2 - Apport endogène : biosynthèse.....	10
Les étapes de la biosynthèse.....	10
La régulation.....	12
III.2 - LE TRANSPORT.....	13
III.2.1 - Absorption intestinale.....	13
III.2.2 - Effet du premier passage hépatique et synthèse hépatique.....	13
III.2.3 - Transport et stockage dans le muscle.....	14
III.2.4 - Transport dans le cerveau.....	14
III.3 - L'EXCRETION.....	14
III.3.1 - Elimination rénale.....	14
III.3.2 - Catabolisme	15
IV - ROLES DE LA CARNITINE.....	16
IV.1- TRANSPORT DES ACIDES GRAS A CHAINE LONGUE DANS LA MITOCHONDRIE.....	16
IV.2 - TRANSPORT DES GROUPEMENTS ACYL ET ACETYL HORS DE LA MITOCHONDRIE.....	18
IV.3 - REGULATION DU METABOLISME INTRA-MITOCHONDRIAL..	19
IV.4 - TRANSPORT DES METABOLITES DU PEROXYOSOME.....	20
IV.5 - EFFET STABILISANT DE LA MEMBRANE	20
IV.6 - ROLE DE LA CARNITINE DANS LA MATURATION ET LA FERTILITE DU SPERMATOZOIDE.....	20
V - PLACE DE LA CARNITINE DANS LE METABOLISME ENERGETIQUE..	22

V.1 - CARNITINE ET METABOLISME LIPIDIQUE.....	22
V.1.1 - Oxydation des acides gras.....	22
V.1.2 - Synthèse des acides gras.....	24
V.1.3 - Carnitine et céto-genèse.....	26
V.2 - CARNITINE ET METABOLISME GLUCIDIQUE.....	26
V.2.1 - La glycolyse.....	26
V.2.2 - La néogluco-genèse.....	27
V.3 - CARNITINE ET ACIDES AMINES RAMIFIES.....	27
<u>VI - FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA CARNITINE DANS DIFFERENTS ORGANES.....</u>	28
VI.1 - LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	28
VI.1.1 - Métabolisme éner-gétique du muscle squelettique.....	28
VI.1.2 - Activité physique et carnitine : Supplémentation en carnitine chez l'homme sain soumis à un exercice musculaire.....	29
VI.1.3 - Conséquences musculaires d'un déficit en carnitine.....	30
VI.2 - LE CŒUR.....	30
VI.2.1 - Rôle de la carnitine dans le métabolisme cardiaque.....	30
VI.2.2 - Conséquences myocardiques d'un déficit en carnitine.....	31
VI.2.3 - Carnitine et pathologies cardiaques.....	31
VI.3 - LE FOIE.....	32
VI.3.1 - Rôle de la carnitine dans le métabolisme hépatique.....	32
VI.3.2 - Conséquences hépatiques d'un déficit en carnitine.....	33
VI.3.3 - Carnitine et pathologies hépatiques.....	33
VI.4 - LE CERVEAU.....	34
VI.4.1 - Rôle de la carnitine dans le métabolisme cérébral.....	34
VI.4.2 - Conséquences cérébrales d'un déficit en carnitine.....	34
<u>VII - METHODES DE DOSAGE.....</u>	35
VII.1 - PRELEVEMENTS NECESSAIRES AU DOSAGE.....	35
VII.2 - METHODES DE DOSAGE.....	35
VII.2.1 - Les différentes fractions.....	35
VII.2.2 - Les différentes méthodes.....	35
VII.3 - INDICATIONS.....	38
<u>VIII - VALEURS NORMALES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES.....</u>	39
VIII.1 - CONCENTRATIONS SANGUINES.....	39
VIII.1.1 - Valeurs normales.....	39
VIII.1.2 - Variations physiologiques.....	40

VIII.2 - CONCENTRATIONS TISSULAIRES.....	43
VIII.2.1 - Valeurs normales.....	43
VIII.2.2 - Variations physiologiques.....	44
VIII.3 - CONCENTRATIONS URINAIRES :.....	44
VIII.3.1 - Valeurs normales.....	44
VIII.3.2 - Variations physiologiques.....	45
<u>IX - VARIATIONS PATHOLOGIQUES DES TAUX DE CARNITINE.....</u>	46
IX.1 - LES DEFICITS EN CARNITINE.....	46
IX.1.1 - Déficits primaires en carnitine.....	46
IX.1.2 - Déficits secondaires en carnitine.....	47
IX.2 - DOSAGES NECESSAIRES AU DIAGNOSTIC.....	49

DEUXIEME PARTIE : LA CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE
--

<u>I - L'HEMODIALYSE.....</u>	51
I.1 - DEFINITIONS - EPIDEMIOLOGIE	51
I.1.1 - Incidence de l'insuffisance rénale terminale (IRT).....	51
I.1.2 - Evolution de l'épidémiologie de l'IRT.....	51
I.2 - CAUSES ET CONSEQUENCES DE L'UREMIE CHRONIQUE	52
I.2.1 - Causes de l'insuffisance rénale.....	53
I.2.2 - Conséquences de l'insuffisance rénale.....	54
I.3 - LA DIALYSE	58
I.3.1 - Principes physico-chimiques de l'hémodialyse	
Périodique.....	58
I.3.2 - La technique.....	61
I.3.3 - Les membranes de dialyse.....	64
I.3.4 - Conduite d'un traitement par hémodialyse.....	64
<u>II - DEFICIT EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE.....</u>	67
II.1 - ETUDE DES TAUX DE CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE.....	67
II.1.1 - Taux sériques.....	67
II.1.2 - Taux musculaires.....	69
II.2 - CAUSES DU DEFICIT EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE..	70
II.2.1 - La dialyse.....	70
II.2.2 - Le patient.....	73

II.3 - MANIFESTATIONS CLINIQUES DU DEFICIT EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE.....	76
III - TRAITEMENT DES HEMODIALYSES PAR LA CARNITINE.....	77
IV - LES EFFETS BENEFIQUES D'UNE SUPPLEMENTATION EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE.....	78

TROISIEME PARTIE : MISE AU POINT DU DOSAGE DE LA CARNITINE SUR X-PAND® DIMENSION

I - MATERIELS ET METHODES.....	80
I.1 - PRINCIPE.....	80
I.2 - APPAREILLAGE.....	80
I.3 - REACTIFS.....	81
I.3.1 - Préparation des solutions de travail.....	81
I.3.2 - Préparation des réactifs A et B	82
I.4 - CALIBRATEURS ET CONTROLES.....	82
I.4.1 - Calibrateurs.....	82
I.4.2 - Contrôles.....	83
I.5 - ECHANTILLONS : RECUEIL ET PREPARATION.....	83
I.5.1 - Echantillons.....	83
I.5.2 - Préparation des échantillons.....	83
I.6 - PARAMETRES DU PROGRAMME.....	84
I.7 - ETUDE DES PARAMETRES DU DOSAGE.....	84
I.7.1 - Répétabilité.....	85
I.7.2 - Reproductibilité.....	85
I.7.3 - Limite de détection.....	85
I.7.4 - Linéarité.....	86
I.7.5 - Etude des interférences.....	86
I.7.6 - Exactitude (test de surcharge).....	86
I.7.7 - Comparaison avec la technique de référence (corrélation).....	86
I.7.8 - Stabilité de l'échantillon à la congélation.....	87
I.7.9 - Stabilité des réactifs.....	87
I.7.10 - Stabilité des calibrateurs.....	87
I.7.11 - Intervalles de référence.....	87

I.7.12 - Etude de coût.....	87
I.8 - STATISTIQUES.....	87
<u>II - RESULTATS</u>	88
II.1 - Paramètres du dosage.....	88
II.1.1 - Répétabilité.....	88
II.1.2 - Reproductibilité.....	88
II.1.3 - Limite de détection.....	89
II.1.4 - Linéarité.....	90
II.1.5 - Exactitude (test de surcharge).....	90
II.1.6 - Comparaison avec la méthode de référence.....	92
II.1.7 - Stabilité de l'échantillon.....	93
II.1.8 - Stabilité des réactifs.....	93
II.1.9 - Stabilité des calibrateurs.....	94
II.2 - Intervalles de référence.....	96
II.3 - Etude de coût.....	97
<u>III - DISCUSSION</u>	98

QUATRIEME PARTIE : ETUDE DE LA CARNITINE CHEZ LE PATIENT HEMODIALYSE

<u>I - INTERVALLES DE REFERENCE</u>	103
I.1 - RECRUTEMENT DE TEMOINS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	103
I.2 - RESULTATS.....	103
I.2.1 - Intervalles de référence	103
I.2.2 - Intervalles en fonction du sexe.....	103
I.2.3 - Intervalles en fonction de l'âge.....	104
<u>II - ETUDE DES PATIENTS HEMODIALYSES</u>	106
II.1 - RECRUTEMENT.....	106
II.2 - VALEURS DE CARNITINE LIBRE ET TOTALE AVANT DIALYSE : STATUT DES PATIENTS EN CARNITINE.....	106
II.2.1 - Valeurs globales.....	106
II.2.1.1 - Valeurs de carnitine chez 65 patients hémodialysés.....	106
II.2.1.2 - Analyse comparée Patients - Témoins.....	106

II.2.1.3 - Influence d'un traitement par Lévocarnil sur le statut en carnitine des patients.....	108
II.2.1.4 – Comparaison entre patients traités et non traités.....	110
II.2.2 - Influence du sexe.....	111
Influence du sexe sur les taux de carnitine chez les patients hémodialysés.....	111
Analyse comparée Patients - Témoins en fonction du sexe.....	112
II.2.3 - Influence de l'âge des patients.....	114
II.2.4 - Influence de l'ancienneté de la dialyse.....	116
II.3 - EVOLUTION DES TAUX AVANT ET APRES DIALYSE :	
PERTES	
PERDIALYTIQUES.....	119
II.3.1 - Pertes perdialytiques globales.....	119
II.3.2 - Influence d'un traitement par Lévocarnil sur les pertes perdialytiques.....	120
II.3.3 – Statut avant et après dialyse des patients traités et non traités par Lévocarnil.....	121
II.3.3.1 – Patients non traités par Lévocarnil.....	121
II.3.3.2 – Patients traités par Lévocarnil.....	123
II.3.4 - Statut des patients après dialyse vis-à-vis des Témoins.....	124
II.3.4.1 – Patients non traités par Lévocarnil.....	124
II.3.4.2 – Patients traités par Lévocarnil.....	125
II.3.5 - Influence du type de membrane de dialyse utilisée.....	126
<u>III - DISCUSSION</u>.....	128

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE 1

ABREVIATIONS

ACCC	acylcarnitine à chaîne courte
ACCL	acylcarnitine à chaîne longue
AG	acide gras
ATP	adénosine triphosphate
C₀	concentration sanguine d'urée en début de séance de dialyse
C_t	concentration sanguine d'urée en fin de séance de dialyse
CAT	carnitine acétyltransférase
CE	carnitine estérifiée
CL	carnitine libre
CoA ou CoASH	coenzyme A
COT	carnitine octanoyltransférase
CPK	créatine phospho-kinase
CPT	carnitine palmitoyltransférase
CRP	C Reactive Protein
CT	carnitine totale
CV	coefficient de variation
DCI	dénomination commune internationale
DFG	débit de filtration glomérulaire
DTNB	acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)
EER	épuration extra-rénale
EPO	érythropoïétine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTA	hypertension artérielle
HVG	hypertrophie ventriculaire gauche
IL1	interleukine 1
IRC	insuffisance rénale chronique
IRT	insuffisance rénale terminale
IV	intraveineux
LCAD	long chain acyl-CoA déshydrogenase
MCAD	medium chain acyl-CoA déshydrogenase
MTHFR	5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase

NAD	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NAS	néphroangiosclérose
NCP	non collagenic protein
SCAD	short chain acyl-CoA déshydrogénase
TMAB	γ -N-triméthyl-amino-butyraldéhyde
TML	6-N-triméthyllysine (précurseur de la γ -butyrobétaine)
TNFα	tumor necrosis factor α
TNB	5-thio-2-nitrobenzoate
VO₂ max	volume d'oxygène maximal expiré

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Teneur en mg de carnitine totale dans 100 mg de produits frais	23
Tableau 2: Taux sériques et plasmatiques de carnitine.....	54
Tableau 3: Concentrations plasmatiques de carnitine et ratio CE/CL en fonction de l'âge	55
Tableau 4 : Concentrations plasmatiques de carnitine et ratio CE/CL en fonction du sexe.....	56
Tableau 5 : Concentrations hépatiques, musculaires et cérébrales de carnitine	57
Tableau 6: Taux urinaires de carnitine en fonction de l'âge.....	59
Tableau 7 : Les principales causes de déficit secondaire en carnitine.....	62
Tableau 8 : Conséquences cliniques et biologiques de l'IRC.	69
Tableau 9 : Principales toxines urémiques	71
Tableau 10 : Concentrations plasmatiques en carnitine chez l'hémodialysé	82
Tableau 11 : Concentrations plasmatiques en carnitine et acylcarnitines chez l'hémodialysé	83
Tableau 12 : Réactifs utilisés pour le dosage de la carnitine.....	95
Tableau 13 : Paramètres de la programmation.....	98
Tableau 14 : Etude de la répétabilité.....	102
Tableau 15 : Essai de reproductibilité sur des solutions de contrôle (essai 1).....	103
Tableau 16 : Essai de reproductibilité sur ultrafiltrat (essai 2).....	103
Tableau 17 : Test de Student comparant les valeurs théoriques et obtenues de CL et CT sur le plasma (S1) et l'ultrafiltrat (S2)	106
Tableau 18 : Test de Student comparant les moyennes des valeurs de carnitine obtenues par spectrophotométrie de masse (méthode de référence) (SM) et par spectrophotométrie (SPM)	107
Tableau 19 : Test de Student comparant les plasmas frais et congelés.....	107
Tableau 20 : Stabilité du calibrateur à la congélation	109
Tableau 21 : Caractéristiques des contrôles de qualité	110
Tableau 22 : Taux de carnitine chez des volontaires sains.....	111
Tableau 23 : Récapitulatif des résultats analytiques de l'évaluation	113
Tableau 24 : Intervalles de références des différentes fractions de carnitine selon les données de la littérature	115
Tableau 25 : Taux de carnitine chez les témoins : variations en fonction du sexe.....	117

Tableau 26 : Variation des taux de carnitine en fonction de l'âge	118
Tableau 27 : Test de Student (p) comparant les trois tranches d'âge de témoins.....	119
Tableau 28 : Taux en carnitine chez des patients hémodialysés (n=65).....	121
Tableau 29 : Comparaison Témoins – Patients avant dialyse.....	121
Tableau 30 : Comparaison du statut des témoins et des patients sous Lévocarnil® (Lévo +)	123
Tableau 31 : Taux de carnitine chez les patients, traités (Lévo +) ou non (Lévo -) par Lévocarnil®	124
Tableau 32 : Taux de carnitine chez les patients hémodialysés : différences Hommes (H) – Femmes (F).....	125
Tableau 33 : Comparaison des témoins (n=47) et des patients avant dialyse (n=34) de sexe masculin	126
Tableau 34 : Comparaison des témoins (n=76) et des patients avant dialyse (n=31) de sexe féminin.....	127
Tableau 35 : Taux de carnitine en fonction de l'âge des patients	129
Tableau 36 : Test de Student comparant les trois tranches d'âge de patients	129
Tableau 37 : Etude des taux de carnitine en fonction de l'ancienneté de la dialyse	131
Tableau 38 : Taux de carnitine (µM) en fonction de l'ancienneté de la dialyse.....	132
Tableau 39 : Taux de carnitine avant et après dialyse : étude des pertes per dialytiques globales	134
Tableau 40 : Pertes per dialytiques chez des patients traités ou non par Lévocarnil® ...	135
Tableau 41 : Teneur plasmatique en carnitine avant et après dialyse des patients non traités par Lévocarnil®	136
Tableau 42 : Teneur plasmatique en carnitine avant et après dialyse des patients traités par Lévocarnil®	137
Tableau 43 : Comparaison Témoins – Patients traités par Lévocarnil®	138
Tableau 44 : Comparaison Témoins – patients traités par Lévocarnil®	139
Tableau 45 : Taux de carnitine avant et après dialyse en fonction du type de membrane utilisée.....	141
Tableau 46 : Concentrations plasmatiques en carnitine chez l'hémodialysé	143

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Transport de la carnitine vers les différents organes.....	22
Figure 2 : Synthèse endogène de la carnitine.....	25
Figure 3 : Transport « carnitine dépendant » d'acides gras activés dans la mitochondrie	31
Figure 4 : Oxydation des acides gras.....	36
Figure 5 : Activation et oxydation des acides gras.....	38
Figure 6: Répartition des causes d'insuffisance rénale en France.....	68
Figure 7 : Principe de diffusion (Force motrice = différence de concentration) : transfert de solutés	73
Figure 8 : Principe d'ultrafiltration (Force motrice = différence de pression) : transfert simultané d'eau et de solutés	73
Figure 9 : Mécanismes concourant au transfert et à l'extraction de l'eau et des solutés en hémodialyse.....	74
Figure 10 : Circuit du sang et du dialysat dans l'hémodialyse	76
Figure 11 : Représentation schématique d'un dialyseur à fibres capillaires et d'un dialyseur en plaques	78
Figure 12 : Etude de la reproductibilité sur ultrafiltrat (essai 2)	103
Figure 13 : Etude de la linéarité.....	104
Figure 14 : Test de surcharge (CL et CT).....	105
Figure 15 : Corrélation CL et CT (n=43) entre la spectrométrie de masse (méthode de référence) et la méthode spectrophotométrique	106
Figure 16 : Stabilité des réactifs à bord.....	108
Figure 17 : Etude de la stabilité des calibrateurs	109
Figure 18 : Suivi des contrôles de qualité passés quotidiennement pendant un mois....	110
Figure 19 : Taux de carnitine (μM) et ratio CE/CL en fonction du sexe	118
Figure 20 : Taux de carnitine (μM) et rapport CE/CL chez les témoins en fonction de l'âge.....	119
Figure 21 : Comparaison des taux et ratios de carnitine des patients avant dialyse et des témoins.....	122
Figure 22 : Comparaison des taux de carnitine des patients traités par Lévocarnil [®] à ceux des témoins	123
Figure 23 : Taux de carnitine chez les patients, traités ou non par Lévocarnil [®]	125

Figure 24 : Taux de carnitine (μM) chez les patients hémodialysés en fonction du sexe	126
Figure 25 : Comparaison Témoins – Patients de sexe masculin	127
Figure 26 : Taux de carnitine des Témoins et des Patients de sexe féminin	128
Figure 27 : Taux de carnitine (μM) chez l’hémodialysé en fonction de l’âge	129
Figure 28 : Effet de l’ancienneté de la dialyse sur les taux de carnitine	132
Figure 29 : Influence de l’ancienneté de la dialyse sur les taux de carnitine (μM) (seuil d’ancienneté = 12 mois)	133
Figure 30 : Effet de la dialyse sur les taux de carnitine (μM)	135
Figure 31 : Pertes per dialytiques chez les patients sans traitement par Lévocarnil[®]	136
Figure 32 : Pertes per dialytiques chez les patients sous Lévocarnil[®]	137
Figure 33 : Comparaison des taux de carnitine (μM) des témoins et des patients après dialyse non traités par Lévocarnil[®]	139
Figure 34 : Comparaison des taux de carnitine (μM) des témoins et patients après dialyse sous Lévocarnil[®]	140

INTRODUCTION

La carnitine, composé physiologique présent à l'état naturel dans toutes les cellules de l'organisme, est l'unique transporteur des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie. Elle a une fonction essentielle dans le métabolisme énergétique. Chez l'homme, le pool endogène de carnitine est constitué de L-carnitine libre et d'esters de carnitine à chaînes courte, moyenne et longue. Ce pool est maintenu constant dans l'organisme grâce à un juste équilibre entre ses apports (absorption de L-carnitine à partir de sources alimentaires, synthèse endogène et réabsorption tubulaire au niveau du rein) et son élimination (urinaire essentiellement).

Différentes pathologies sont liées à des déficits en carnitine. Il peut s'agir de déficits primaires dus à un déficit en protéine OCTN2 aidant au transport de la carnitine à l'intérieur de la cellule. Il peut également s'agir de déficits secondaires : désordres génétiques dans le métabolisme des acides gras, aciduries organiques, traitement par l'acide valproïque, et hémodialyse.

Dans les années 60, les progrès permanents des techniques de dialyse ont permis de traiter au long cours un nombre croissant de patients en insuffisance rénale chronique, jusque là condamnés à une mort inéluctable. Cependant, environ dix ans après l'instauration du traitement à grande échelle, en 1974, Lindner et al. [1] soulignaient un phénomène d'athérosclérose accélérée chez les patients dialysés. La première hypothèse fut que le problème était lié à l'accumulation de métabolites toxiques due à l'hémodialyse elle-même, mais l'absence d'amélioration induite par l'augmentation de la durée de dialyse a conduit certains auteurs à s'interroger sur l'absence d'un ou plusieurs substrats métaboliques à l'origine de cette accélération du phénomène d'athérosclérose. Des travaux conduits dans d'autres pathologies, le diabète notamment, et la mise au point par Cederblad d'une technique de dosage sensible [2], permirent en 1974 à Böhmer et al. d'envisager pour la première fois le rôle potentiel d'un déficit en carnitine [3]. En effet, à cette époque, il était connu que la carnitine intervenait dans l'oxydation des acides gras ; un déficit en carnitine pouvait donc entraîner une accumulation de lipides et de ce fait favoriser la constitution et la croissance de la plaque d'athérosclérose.

Cette hypothèse est à l'origine de nombreuses études consacrées à la carnitine et à l'hémodialyse, dont les objectifs étaient de mieux comprendre le déficit en carnitine de l'hémodialysé et d'évaluer les bénéfices de sa compensation thérapeutique. Aujourd'hui de nombreux patients sont supplémentés en L-carnitine.

Il existe actuellement différentes méthodes de dosage de la carnitine dans les milieux biologiques : méthodes radioenzymatiques, chromatographiques (HPLC), spectrométriques (spectrométrie de masse en tandem). Cependant les méthodes spectrophotométriques sont les plus adaptées à l'automatisation et à une utilisation en laboratoire de routine. Elles ont d'ailleurs été largement exploitées sur différents automates, mais peu encore sur l'automate X-Pand[®] Dimension (Dade-Behring, Newark, DE).

Notre travail s'est articulé en quatre parties. Après une présentation générale de la carnitine, de son métabolisme et de ses fonctions, nous détaillerons les particularités de ce métabolisme chez l'hémodialysé. Nous évaluerons ensuite les performances analytiques du dosage de la carnitine adapté sur automate X-Pand[®]. Enfin nous étudierons le déficit en carnitine chez les hémodialysés de l'AUB (association des urémiques de Bretagne) et du CHU de Brest.

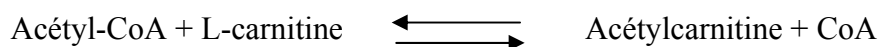
PREMIERE PARTIE :

LA CARNITINE

I - HISTORIQUE

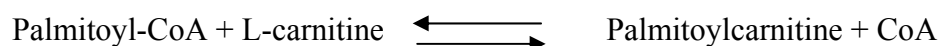
En 1905, deux savants russes, Gulewitsh et Krimberg [4] découvrent une nouvelle molécule dans du tissu musculaire isolé de bœuf. Ils lui donnent le nom de CARNITINE, afin d'en rappeler l'origine (en latin *carnis* = viande). En 1927, Tomita et Sendju [5] établissent sa structure chimique. Il s'agit de la bétaïne de l'acide γ -amino- β -hydroxybutyrique. Dans les années 30, la similarité structurale de la choline et de la carnitine (au niveau de l'ammonium quaternaire) suscite de nombreux travaux physiologiques et pharmacologiques, qui ne peuvent mettre en évidence le rôle de la carnitine.

Ce n'est qu'en 1948 que Fraenkel et al. [6] découvrent un facteur de croissance indispensable au ver de farine *Tenebrio molitor*. Appartenant à la famille des vitamines hydrosolubles, ce facteur est appelé vitamine B_T (T pour *Tenebrio*). Mais, en 1951, Carter et al. identifient la vitamine B_T comme étant la carnitine [7]. A la suite de cette observation, le rôle de la carnitine se précise. En 1955, Friedman et Fraenkel [8] découvrent que la carnitine peut être acétylée de façon réversible par l'acétyl-CoA via une enzyme, la carnitine acétyltransférase, catalysant la réaction :



En 1955 [9], un chercheur américain, Fritz, montre que la carnitine stimule la β -oxydation lipidique dans les cellules. En effet, c'est grâce à la L-carnitine, et à elle seule, que les acides gras à chaîne longue pénètrent à l'intérieur des mitochondries et permettent ainsi la production d'énergie.

Les mécanismes de biosynthèse furent ensuite peu à peu élucidés chez le rat, et le terme de vitamine est donc exclu pour caractériser la carnitine. En 1963, Bremer et al. [10] mettent en évidence l'enzyme carnitine palmitoyltransférase (CPT) qui catalyse la réaction :



Dans les années 70, les premiers cas cliniques de déficit en carnitine sont diagnostiqués. En 1973, Engel et Angelini [11] rapportent le cas d'une patiente souffrant d'une myopathie avec accumulation lipidique provoquant une forte fragilité musculaire. Cette jeune femme présente en fait un déficit en carnitine. La même année, Di Mauro S. et Di Mauro P. [12] décrivent un

déficit en carnitine palmitoyltransférase chez un patient se plaignant de douleurs musculaires récurrentes.

En 1974, Böhmer et al..[3] découvrent que les insuffisants rénaux hémodialysés présentent des déficits acquis en carnitine. Ces observations sont complétées en 1977 par Chen [13] qui démontre qu'au contraire, chez les patients non encore hémodialysés, la quantité de L-carnitine circulante est supérieure à celle des sujets non insuffisants rénaux.

En 1975, Karpati et al..[14] mettent en évidence le premier déficit systémique en carnitine chez un jeune garçon présentant des épisodes proches du syndrome de Reye et des faibles taux sériques et musculaires en carnitine.

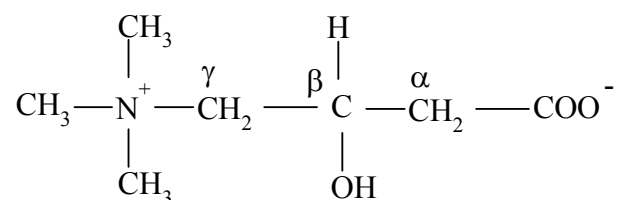
Depuis, les connaissances sur le métabolisme et le rôle de la carnitine ont beaucoup progressé et de nombreux cas de déficits primaires comme secondaires sont maintenant connus.

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

La carnitine est un ammonium quaternaire qui se trouve à l'état naturel dans l'organisme et qui est apparentée aux acides L-aminés naturels. Elle se présente sous forme de poudre cristalline, blanche, très hygroscopique, extrêmement soluble dans l'eau, un peu moins dans l'éthanol à chaud et pratiquement insoluble dans l'acétone, l'éther et le benzène. Elle est décomposée par la chaleur à 198°C. Son pouvoir rotatoire est compris entre - 30,5° et - 26°.

La carnitine est une molécule de petite taille ayant un poids moléculaire de 161,20 daltons [15].

De formule C₇H₁₅O₃N, sa structure est :



En nomenclature, sa formule est la suivante :

β-hydroxyl-γ-N-triméthyl ammonium butyrate
ou Acide 3-hydroxy-4 triméthylaminobutyrique

La liaison ester qui peut se former à partir du groupe hydroxyle (-OH) situé sur le carbone β va permettre le transfert des groupements acyls grâce aux transférases. La fonction hydroxyle peut être estérifiée avec une chaîne carbonée (R-) de structure et de longueur variables. Ce site d'estérification permet à la carnitine, comme nous le discuterons plus loin, d'être un système d'épuration pour des chaînes carbonées d'origine exogène et non métabolisables. Lorsque R est une molécule d'acide gras d'origine organique, le nombre de carbones varie de 2 à plus de 20.

Le carbone β portant la fonction hydroxyle est un carbone asymétrique : il existe donc deux énantiomères de la carnitine : les formes D et L. Mais seul le stéréoisomère L (lévogyre) est naturel et biologiquement actif. L'utilisation du racémique (DL-carnitine) pose un problème en raison de l'activité de la forme dextrogyre (D) susceptible de jouer un rôle d'inhibiteur

compétitif de la L-carnitine. Ainsi les premiers essais cliniques chez l'homme, qui ont utilisé la DL-carnitine, ont montré que la forme dextrogyre (D-carnitine) était toxique.

La D-carnitine est un inhibiteur compétitif de la L-carnitine pour différentes raisons :

→ Le transport des deux isomères n'est pas stéréospécifique et la captation cellulaire de la L-carnitine est inhibée en présence de l'isomère D.

→ La L-carnitine est sous la dépendance de deux systèmes enzymatiques qui sont inhibés in vitro de façon compétitive par la D-carnitine :

1/ les acyl-carnitine-transférases (I et II) qui assurent le transport des acides gras à chaîne longue du cytosol dans la mitochondrie

2/ la butyrobétaïne hydroxylase qui catalyse la dernière étape de la synthèse de la L-carnitine (au niveau hépatique et rénal).

III - METABOLISME DE LA CARNITINE

Présente dans toutes les cellules de l'organisme, la carnitine est apportée par l'alimentation ou par synthèse endogène. Elle est transportée vers les différents tissus via le milieu sérique (sous forme libre ou estérifiée, elle n'est jamais liée aux protéines) [16].

L'élimination de la carnitine et de ses esters se fait principalement par voie urinaire.

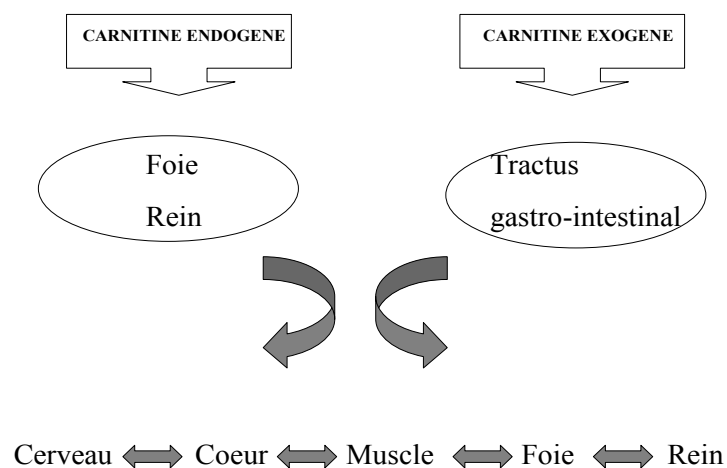


Figure 1 : Transport de la carnitine vers les différents organes
(d'après Borum et Bennett, 1986) [17]

III.1 - LES SOURCES

Les besoins en carnitine physiologiques sont satisfaits à partir de deux sources :

- un apport exogène alimentaire,
- une biosynthèse endogène.

III.1.1 - Apport exogène : alimentaire

La part de carnitine apportée par l'alimentation est considérable dans un régime équilibré normal : 75% de notre carnitine proviendrait de l'alimentation. La teneur en carnitine d'un certain nombre d'aliments est présentée dans le tableau 1.

Boeuf	Filet	59,8 – 88,66	Avocats	1,25
	Epaule	67,40	Carottes	0
	Culotte	61,60	Haricots	0,81
	Cœur	19,30	Petits pois	1,16
	Rein	1,80	Epinards	0
Porc	Foie	4,92	Tomates	2,93
Agneau	Muscle	77,97	Choux	0
	Foie	2,64	Chou-fleur	0,13
Mouton	Muscle	209,26	Pommes de terre	0
	Cœur	59,05	Asperges	1,29
	Foie	2,17	Poires	2,74
Lapin	Muscle	21,00	Pêches	1,61
	Foie	11,10	Ananas	1,05
Œuf de poule		0 – 0,81	Jus d'orange	0 – 1,77
Lait de vache	Liquide	0,53 – 3,91	Jus de pomme	1,29
	Sec, écrémé	15,00	Pain	0,81
	Entier	0,63	Levure de bière	1,60 – 3,29
Margarine		1,05	Riz	1,77

Tableau 1: Teneur en mg de carnitine totale dans 100 mg de produits frais
(d'après Bach, 1982)[18]

La carnitine est retrouvée principalement dans les aliments carnés, mais également dans les produits laitiers. La viande de mouton est la plus riche en carnitine, avec une concentration de 209 mg/100 g. A l'inverse, les produits d'origine végétale contiennent de faibles taux de carnitine.

Cependant les procédés d'extraction et de dosage, les différences possibles dans le régime des animaux avant abattage et les connaissances des effets de la cuisson des aliments ne permettent qu'une approche globale du problème.

Lennon et al. [19] estiment l'apport oral journalier entre 38 et 70 mg/j en moyenne, variant de 319 mg/j lors d'une forte consommation de viande à 0,18 mg/j lors de régime riche en légumes, fruits et pain.

Malgré des apports alimentaires variables d'un individu à l'autre et d'un jour à l'autre, le sujet en bonne santé est capable de maintenir ses taux sériques de carnitine dans des limites normales (soit $54,0 \pm 12,6 \mu\text{M}$ pour la carnitine totale et $39,1 \pm 8,6 \mu\text{M}$ pour la carnitine libre [20]). L'organisme peut aussi compenser un manque d'apport par un mécanisme de synthèse assez complexe [21].

III.1.2 - Apport endogène : biosynthèse

Ce n'est que depuis la fin des années 50 que le mécanisme de biosynthèse a été décrit. Cette synthèse a lieu principalement dans le foie et dans les reins ; elle est aussi possible dans le cerveau et les testicules [21]. Elle se fait à partir de deux acides aminés essentiels :

- la lysine qui fournit la chaîne carbonée
- la méthionine qui fournit les groupements méthyles.

Outre ces deux acides aminés, plusieurs cofacteurs nécessaires à cette synthèse sont également apportés par l'alimentation. Ces cofacteurs sont:

- 3 vitamines :
 - acide ascorbique (vitamine C)
 - acide nicotinique ou niacine (précurseur du NAD)
 - phosphate de pyridoxal (vitamine B6)
- L'ion métallique Fe^{++}

▪ Les étapes de la biosynthèse

La synthèse se fait en trois étapes (figure 2) :

- Formation de triméthyllysine
- Formation de γ -butyrobétaïne
- Formation de carnitine.

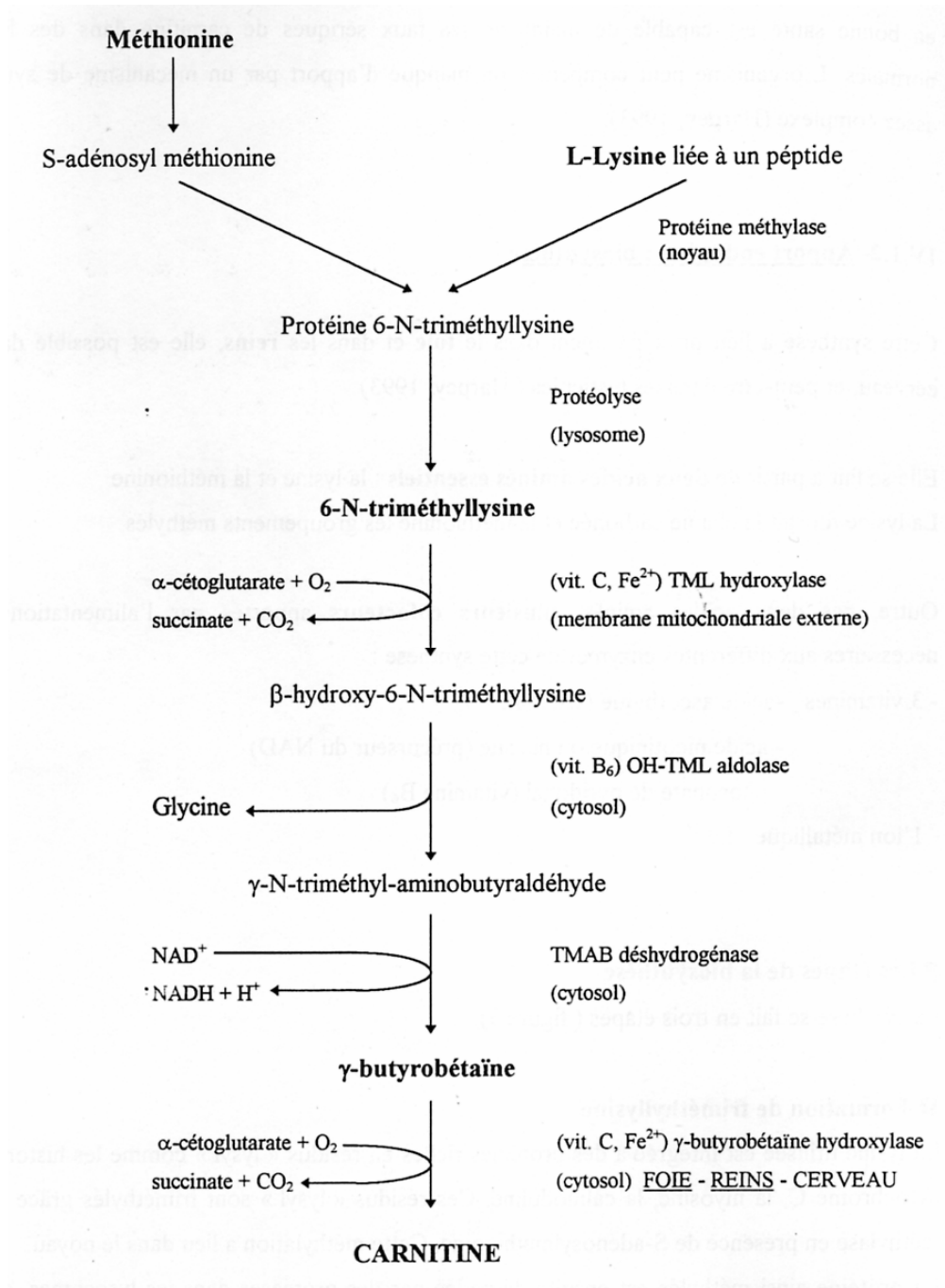


Figure 2 : Synthèse endogène de la carnitine
(d'après Scholte et De Jonge, 1987) [22]

1/ Formation de triméthyllysine (TML)

La lysine libre utilisée pour la synthèse est intégrée à des protéines riches en résidus « lysyl » comme les histones, le cytochrome C, la myosine, la calmoduline. Ces résidus « lysyl » sont triméthylés dans le noyau grâce à une méthylase en présence de S-adenosylméthionine.

La protéine ainsi méthylée est ensuite dégradée par les protéases dans les lysosomes, ce qui permet la libération de la 6-N-triméthyllysine [23].

L'alimentation fournit l'apport de lysine et de méthionine. On trouve également des protéines alimentaires contenant de la triméthyllysine.

2/ Formation de gamma-butyrobétaïne

→ La triméthyllysine formée est hydroxylée en β -hydroxy-6-N-triméthyllysine (OH-TML) grâce à la triméthyllysine hydroxylase située dans la membrane externe des mitochondries des cellules du foie, des reins et des muscles. Cette enzyme nécessite la présence d' α -cétoglutarate, de Fe^{++} , et de vitamine C.

→ Puis la OH-TML clivée par la OH-TML aldolase permet la formation de glycine et de γ -N-triméthyl-amino-butyraldéhyde (TMAB). Cette étape a lieu principalement dans le cytosol de la cellule et nécessite la présence de vitamine B6.

→ Enfin, la TMAB est oxydée par la TMAB déshydrogénase pour former le γ -N-triméthyl-amino-butyrate ou γ -butyrobétaïne (désoxycarnitine). L'activité enzymatique est localisée dans tous les tissus au niveau du cytosol et nécessite du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) comme coenzyme [24].

3/ Formation de carnitine

En dernier lieu, la γ -butyrobétaïne est hydroxylée par la γ -butyrobétaïne hydroxylase, ce qui aboutit à la formation de carnitine. Cette enzyme nécessite la présence d' α -cétoglutarate, de Fe^{++} et de vitamine C. Elle n'existe de façon constante que dans le foie et les reins. En revanche, les deux tissus les plus demandeurs de L-carnitine, le muscle et le cœur, ne sont pas capables d'en assurer la synthèse complète [21].

▪ La régulation

Le régime alimentaire et l'âge sont les facteurs particulièrement impliqués dans la régulation de cette biosynthèse [25].

➤ Le régime alimentaire

Comme nous l'avons vu précédemment, deux acides aminés essentiels (lysine et méthionine), trois vitamines (vit C, vit B6, niacine), et un ion métallique (Fe^{++}) sont nécessaires à la biosynthèse de carnitine. Ainsi :

- un régime pauvre en lysine conduit à des concentrations réduites de carnitine dans le plasma, les muscles squelettiques, le myocarde et l'épididyme [16].

- de jeunes cochons d'Inde atteints de scorbut ont des taux musculaires de carnitine abaissés de 50% (cœur et muscle squelettique), alors que les concentrations dans le foie, le rein et le plasma restent les mêmes [26].

- En présence de la 1-amino-D-proline (un antagoniste de la vitamine B6), la cellule accumule de la β -hydroxy-6-N-triméthyllysine, tandis que les productions de γ -butyrobétaïne, de carnitine et d'acétylcarnitine sont diminuées de 60 à 80% dans le foie perfusé d'un rat. L'introduction de pyridoxine dans le milieu de perfusion [27] peut inverser les effets néfastes de cette 1-amino-D-proline.

➤ **L'âge**

Contrairement à l'ensemble des enzymes participant à la synthèse de γ -butyrobétaïne, l'activité de la γ -butyrobétaïne hydroxylase est dépendante de l'âge. Chez le nouveau-né, l'activité de la γ -butyrobétaïne hydroxylase est de 12% de l'activité moyenne de l'adulte normal. Vers 2 à 5 ans, cette activité est de 30% et à 15 ans, elle est égale à l'activité moyenne de l'adulte [28].

III.2 - LE TRANSPORT

III.2.1 - Absorption intestinale

L'alimentation est une source importante de carnitine. Il existe un transport actif au niveau duodéal et jéjunal par un transporteur actif dépendant d'un cotransport de sodium [21]. Cependant, les récepteurs membranaires intestinaux de la L-carnitine sont saturables et non spécifiques, car ce transport actif est diminué en présence de D-carnitine et d'acétylcarnitine. En plus de ce transport actif, il existe une diffusion passive possible dans l'intestin grêle et le colon [29], intervenant lors d'apports importants de carnitine (doses thérapeutiques utilisées dans le déficit primaire).

Plus de 50% de la carnitine absorbée est ensuite largement estérifiée dans la muqueuse intestinale avant d'être libérée lentement dans la circulation sous forme libre et acylée [23].

III.2.2 - Effet du premier passage hépatique et synthèse hépatique

Le foie joue un rôle majeur dans l'homéostasie de la carnitine. Une fois absorbée au niveau intestinal, la carnitine alimentaire transite jusqu'au foie, via la veine porte, pénètre dans les cellules hépatiques par un transport actif, saturable et dépendant d'un cotransport de sodium [30], où elle est métabolisée.

C'est exclusivement au niveau du foie que la γ -butyrobétaïne est hydroxylée, permettant ainsi la production de carnitine dans l'étape finale de sa biosynthèse. Les cellules hépatiques ont donc la capacité d'accumuler la γ -butyrobétaïne et la carnitine. La carnitine et la γ -butyrobétaïne ont le même transporteur mais la γ -butyrobétaïne représente le substrat

préférentiel. De ce fait, la concentration hépatique en γ -butyrobétaïne est plus importante que dans le sang, et que celle de la carnitine.

Depuis le foie, la carnitine est ensuite libérée dans la circulation systémique par un transport saturable, non consommateur d'énergie, et non spécifique : en effet, l'isovalérylcarnitine et l'acétylcarnitine sont aussi exportées de cette manière. Cet efflux d'acylcarnitines peut représenter une voie d'élimination des groupements acylés non métabolisés [30].

III.2.3 - Transport et stockage dans le muscle

La source majeure d'énergie des muscles cardiaques et squelettiques est l'oxydation des acides gras. Ces tissus ne synthétisant pas la carnitine, un apport via le milieu sérique leur est indispensable.

La concentration de la carnitine dans le muscle squelettique et cardiaque est plus importante que celle du plasma [31]. Ce gradient de concentration (sang \rightarrow tissus) montre qu'il existe un transport actif transmembranaire [32], dépendant d'un cotransport de sodium, saturable et inhibé par la D-carnitine et la γ -butyrobétaïne [30]. Les échanges possibles concernent la carnitine et l'acétylcarnitine d'une part, la carnitine et la γ -butyrobétaïne d'autre part. La γ -butyrobétaïne ainsi libérée peut ensuite rejoindre le foie pour subir la dernière étape de la biosynthèse permettant la production de carnitine [33].

III.2.4 - Transport dans le cerveau

Peu de données sont connues sur le transport de la carnitine dans le cerveau. L'apport de carnitine dans le cerveau est extrêmement lent, et les transporteurs situés dans le cerveau présentent une stéréospécificité pour la L-carnitine plus importante que dans le foie.

III.3 - L'EXCRETION

Après son séjour dans l'organisme, la carnitine est principalement éliminée par la voie urinaire.

III.3.1 - Elimination rénale

La carnitine est une petite molécule hydrosoluble : elle est donc librement filtrée par le glomérule rénal. Avec une excrétion journalière de seulement 100 à 400 $\mu\text{mol/j}$ selon les apports diététiques [34], la carnitine filtrée est, dans un deuxième temps, fortement réabsorbée (96 - 99%) [35]. Ce transport est saturable, lié à un cotransport de sodium et inhibé par la D-

carnitine, la γ -butyrobétaïne et les acylcarnitines. En situation physiologique, ce transport n'est pas saturé mais, lors d'apport important, il a été noté un plateau des concentrations plasmatiques à 140-170 $\mu\text{mol/l}$.

De plus, des quantités significatives de carnitine et d'acylcarnitine présentes dans les urines sont générées par le métabolisme rénal. Ainsi, la carnitine et les acylcarnitines urinaires ont une double origine, d'une part la filtration glomérulaire et d'autre part la synthèse rénale.

III.3.2 - Catabolisme

La faible quantité de carnitine retrouvée dans les fèces (moins de 1% de celle excrétée dans les urines) a longtemps laissé penser que la carnitine était totalement absorbée. Depuis, on a montré chez l'homme et chez l'animal qu'une quantité faible mais significative de la carnitine alimentaire est dégradée dans le tractus gastro-intestinal par l'action de la flore microbienne [36]. Les principaux métabolites produits sont la triméthylamine (à l'origine d'une odeur désagréable de poisson lors d'ingestion de carnitine à des doses thérapeutiques), et la γ -butyrobétaïne. La γ -butyrobétaïne est excrétée dans les fèces tandis que la triméthylamine, après absorption et oxydation hépatique, est retrouvée dans l'urine sous forme de triméthylamine-N-oxyde [37].

Dans l'urine, la carnitine est excrétée avant tout sous forme libre, mais elle peut également être décarboxylée en béta-méthylcholine (environ 2 à 20%), ceci grâce à une carnitine décarboxylase présente dans le foie, les reins, les muscles, les surrénales et surtout le cœur. D'autres métabolites urinaires ont été isolés : le N-triméthylamine et l'hydroxyde de triméthylacétonyl-ammonium. Il pourrait y avoir également déméthylation progressive de la méthylcholine en N-diméthylisopropanolamine et en isopropanolamine, avec, par ce biais, conservation des groupements méthyls de l'organisme.

IV - ROLES DE LA CARNITINE

Différents rôles de la carnitine sont connus et se rapportent surtout au métabolisme lipidique.

IV.1- TRANSPORT DES ACIDES GRAS A CHAINE LONGUE DANS LA MITOCHONDRIE

La production énergétique sous forme d'ATP, à partir des acides gras, se fait par la β -oxydation strictement intra-mitochondriale.

Alors que les acides gras (AG) à chaîne courte et moyenne pénètrent directement dans la mitochondrie, sans activation préalable, les AG à chaîne longue sont activés en acyl-CoA dans le cytosol et dépendent du «système carnitine» pour passer la membrane mitochondriale interne qui leur est imperméable [9]. Ce transport est réalisé par l'intervention successive de trois enzymes : la carnitine palmitoyltransférase I (CPT I), la carnitine/acylcarnitine translocase et la carnitine palmitoyltransférase II (CPT II), comme indiqué dans la figure 3.

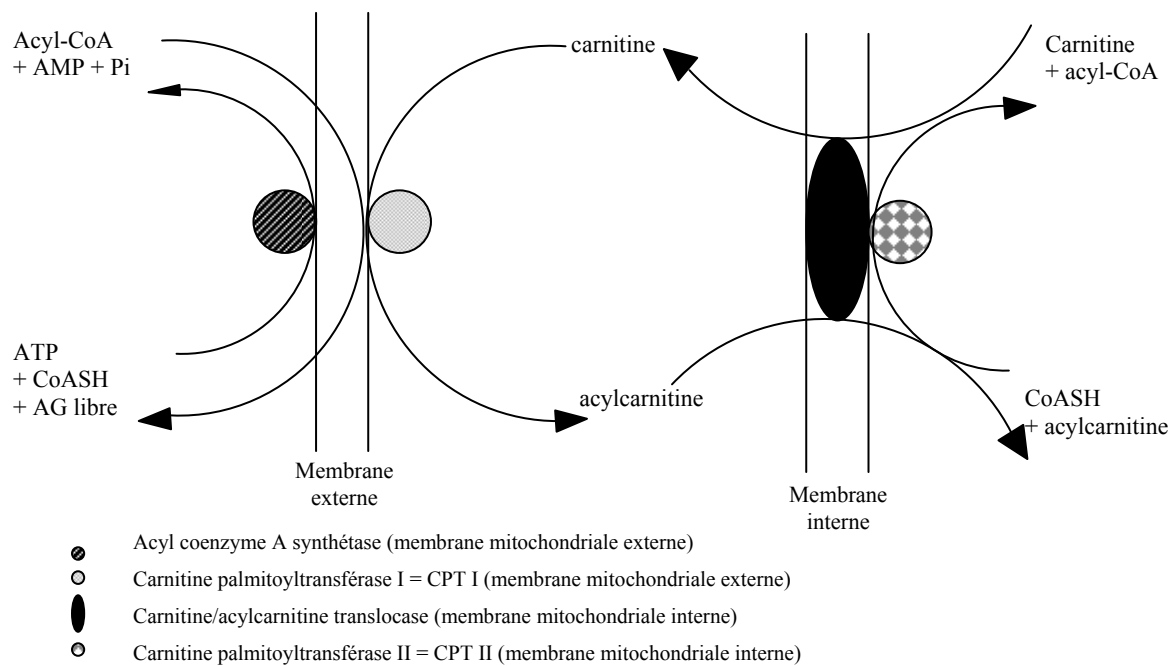
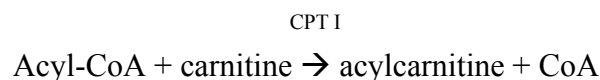


Figure 3 : Transport « carnitine dépendant » d'acides gras activés dans la mitochondrie (d'après Bremer, 1990) [38].

1 – La carnitine palmitoyltransférase I (CPT I)

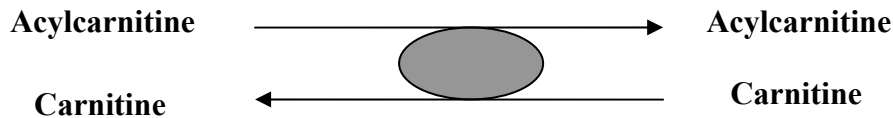
Localisée sur la face interne de la membrane mitochondriale externe, elle permet, en présence de carnitine, l'estérification de l'acyl-CoA en acylcarnitine par le transfert du groupe « acyl » de l'atome de soufre du CoA au groupe -OH de la carnitine selon la réaction suivante [39] :



Cette enzyme est inhibée par le malonylCoA [40], produit de la première étape de la synthèse des AG, particulièrement présent dans les muscles et le cœur [41]. La concentration en malonylCoA est augmentée chaque fois que l'organisme est bien alimenté en glucides (car l'excès de glucose qui n'est ni stocké ni oxydé est transformé dans le cytosol en triacylglycérol afin d'y être stocké). Ainsi l'oxydation des AG est stoppée chaque fois que le foie reçoit comme carburant un apport important de glucose : il y a alors inhibition de l'entrée des groupements acyls dans la mitochondrie par le malonylCoA.

2 – La translocase (carnitine/acylcarnitine translocase)

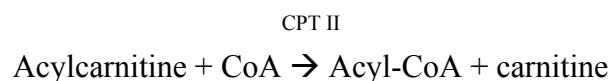
Localisée à l'intérieur de la membrane mitochondriale interne, elle assure le transfert de la carnitine acylée dans la matrice mitochondriale. L'entrée de l'acylcarnitine dans la mitochondrie se fait contre la sortie de carnitine libre ou d'acylcarnitine dans le cytosol [42].



Dans les conditions physiologiques, cet échange stoechiométrique (un pour un) maintient une concentration constante de carnitine de part et d'autre de la membrane.

3 – La carnitine palmitoyltransférase II (CPT II)

Localisée sur la face interne de la membrane mitochondriale interne (figure 3), elle permet la libération d'acyl-CoA et de carnitine dans la matrice selon le schéma suivant [43] :



La carnitine libérée peut alors repasser à travers la membrane interne via la translocase et servir ainsi à un nouveau transfert intramitochondrial d'une molécule d'acyl-CoA.

IV.2 – TRANSPORT DES GROUPEMENTS ACYL ET ACÉTYL HORS DE LA MITOCHONDRIE

La β -oxydation des AG, mais également d'autres voies métaboliques (décarboxylation oxydative du pyruvate, décarboxylation oxydative des acides aminés ramifiés...) produisent des esters de CoA à chaîne courte et moyenne qui, s'ils ne sont pas oxydés dans le cycle de Krebs, s'accumulent dans la mitochondrie. La carnitine sert de « navette » à ces fragments acylés et acétylés en les transportant hors de la mitochondrie sous la forme d'acylcarnitine et d'acétylcarnitine. Elle évite ainsi l'accumulation d'acyl-CoA qui peut avoir un effet détergent sur la membrane mitochondriale et inhibiteur pour plusieurs enzymes mitochondriales. Ceci permet de plus une meilleure disponibilité du CoA libre intramitochondrial.

Ce rôle détoxifiant de la carnitine est largement mobilisé dans certaines situations pathologiques [44] :

- Dans les troubles du métabolisme des AG, la β -oxydation est incomplète avec production de fragments d'AG partiellement oxydés qui sont éliminés sous forme d'acylcarnitines.
- Dans les acidémies organiques, avec un déficit du métabolisme des acides aminés ramifiés (acidémie méthylmalonique, propionique, isovalérique, déficit en holocarboxylase synthétase, 3-méthylcrotonyl-glycinurie,...) ou de la lysine (acidurie glutarique de type I), il y a accumulation d'acyls-CoA qui sont éliminés via la carnitine.
- La carnitine participe aussi à l'élimination des groupements acyls issus de xénobiotiques tels que l'acide valproïque et l'acide pivalique métabolisés dans la mitochondrie sous forme de valproyl-CoA et pivaloyl-CoA.

Dans ces situations pathologiques ou iatrogènes, l'augmentation de l'élimination des acylcarnitines entraîne une consommation excessive de carnitine pouvant conduire à un déficit de la molécule. Une diminution de la carnitine libre dans le plasma et l'urine est alors observée, la carnitine totale pouvant être normale ou diminuée.

IV.3 - REGULATION DU METABOLISME INTRAMITOCHONDRIAL

La carnitine transporte des groupements acétylés et acylés à l'intérieur et à l'extérieur de la mitochondrie et transforme de façon réversible des acétyl- et acylcarnitines en acétyl- et acyl-CoA. De cette façon, elle assure :

- la régulation des rapports acyl-CoA/CoA et acétyl-CoA/CoA dans la mitochondrie, en modifiant l'activité de certaines enzymes mitochondriales
- le maintien d'un pool de CoA libre intramitochondrial, qui doit être disponible pour :
 - Les groupes « acyl » entrant dans la β -oxydation mitochondriale
 - Les groupes « acétyl » rejoignant le cycle de Krebs ou la cétogenèse

La carnitine assure aussi la régulation de réactions cytosoliques. L'accumulation d'acyl-CoA dans le cytosol inhibe l'acétyl-CoA carboxylase, enzyme de la première étape de la synthèse

d'AG à partir d'acétyl-CoA. En permettant le transport des acyl-CoA dans la mitochondrie, la carnitine lève cette inhibition.

IV.4 - TRANSPORT DES METABOLITES DU PEROXYOSOME

La β -oxydation peroxysomale des AG à chaîne longue (C10 – C20) et très longue (C20 – C40) paraît à première vue être indépendante de la carnitine. En effet, le peroxysome contient une perméase assurant le transfert des acyl-CoA du cytosol. Mais la β -oxydation peroxysomale est partielle. Les AG sont simplement oxydés jusqu'à production d'octanoate (C8). L'octanoate et l'acétate formés à chaque tour de spire sont ensuite transférés à la mitochondrie afin d'y subir une oxydation complète. Ce transfert se fait avec l'aide de la carnitine octanoyltransférase (COT) et de la carnitine acétyltransférase (CAT) présentes dans le peroxysome [45].

IV.5 - EFFET STABILISANT DE LA MEMBRANE

Alors que le rôle de la carnitine dans le transport des acyl-CoA à travers la membrane mitochondriale est aujourd'hui bien établi, des observations suggèrent un effet direct de la molécule sur les propriétés physiques de la membrane.

Ainsi, Batteli et al. [46] expliquent la protection spécifique de la carnitine vis-à-vis de la myocardiotoxicité des anthracyclines [2;47], par une interaction entre la carnitine et les cardiolipines membranaires, sites de fixation des anthracyclines. De même, Arduini et al. [48] décrivent le rôle de la carnitine dans le processus d'acylation et de désacylation des phospholipides membranaires de l'érythrocyte, et par là même, dans la réparation des membranes soumises à des agressions diverses.

IV.6 - ROLE DE LA CARNITINE DANS LA MATURATION ET LA FERTILITE DU SPERMATOZOIDE

En 1965, Marquis et Fritz [49] montraient que l'épididyme contient une concentration très élevée en carnitine, que la CAT du spermatocyte a une activité importante et que cette activité enzymatique et la teneur en carnitine dépendent de la testostérone.

La carnitine intervient à plusieurs niveaux [50]. :

→ **Au niveau du spermatocyte**, elle permet l'entrée des AG à chaîne longue dans la mitochondrie lors du transit épидидymal (la principale source d'énergie du spermatocyte est l'oxydation des AG).

→ **Au niveau du spermatozoïde** :

- elle permet le passage des acides α -cétoniques à l'intérieur de la mitochondrie dans un but énergétique : la production de pyruvate
- elle permet le stockage de substrats énergétiques sous forme d'acétylcarnitine
- elle permet la sortie des résidus acétyles hors de la mitochondrie pour former l'acétylcholine cytoplasmique qui joue un rôle essentiel (encore mal connu) dans la motilité des spermatozoïdes.

V - PLACE DE LA CARNITINE DANS LE METABOLISME ENERGETIQUE

Les AG, on le sait, sont une des sources essentielles du métabolisme énergétique de la fibre musculaire cardiaque et squelettique. C'est Fritz qui, en 1959 [9], a découvert le rôle fondamental de la carnitine dans le transport intramitochondrial des AG à chaîne longue. Depuis, d'autres pathologies associées à des déficits en carnitine ont permis de mieux comprendre le rôle et l'importance de la carnitine. En effet, en plus de son rôle dans le métabolisme des lipides, la carnitine intervient dans le métabolisme des acides aminés ramifiés, la cétogenèse hépatique et l'épargne glucidique.

V.1 - CARNITINE ET METABOLISME LIPIDIQUE

V.1.1 - Oxydation des acides gras

Les AG jouent un rôle extrêmement important dans la fourniture d'énergie, pour certains organes notamment (foie, cœur, muscle squelettique). Leur mode de transfert dans la mitochondrie (où ils sont oxydés) varie selon la longueur de leur chaîne carbonée (figure 4).

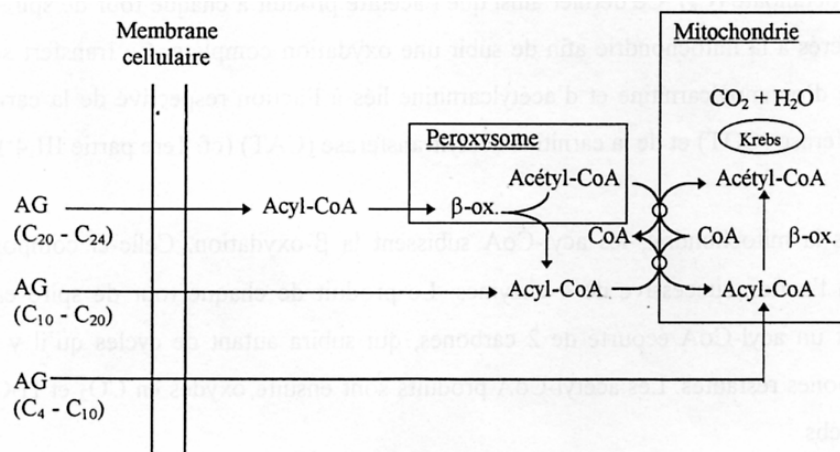


Figure 4 : Oxydation des acides gras
(d'après Bremer, 1983) [35]

Les AG à chaîne moyenne ou courte (C4-C10) pénètrent directement dans la mitochondrie, sans activation préalable. A l'inverse, les AG à chaîne longue (C10 – C20) ou très longue (C20 – C24) doivent être activés en acylCoA avec formation d'une liaison thioester riche en énergie pour passer la membrane mitochondriale interne qui leur est imperméable. Cette activation se fait par l'intervention de l'acylCoA synthétase en présence de CoASH et d'ATP, soit au niveau du réticulum endoplasmique, soit au niveau de la face externe de la membrane mitochondriale externe [35].

- Les acylCoA issus des AG à chaîne longue sont libérés dans l'espace intermembranaire et empruntent le « système carnitine » que nous avons décrit précédemment.

- Les acylCoA issus des AG à chaîne très longue présentent une oxydation en deux temps : dans un premier temps, ils pénètrent dans le peroxysoxe où ils subissent une β -oxydation partielle s'arrêtant à la production d'octanoate (C8). Ce dernier ainsi que l'acétate produit à chaque tour de spire sont ensuite transférés sous forme d'octanoylcarnitine et d'acétylcarnitine (liés à l'action respective de la carnitine octanoyltransférase (COT) et de la carnitine acétyltransférase (CAT)) à la mitochondrie afin d'y subir une oxydation complète.

Une fois dans la mitochondrie, les acylCoA subissent la β -oxydation (figure 5). Celle-ci comporte 4 étapes dues à l'action successive de 4 enzymes. Le produit de chaque tour de spire est un acétylCoA et un acylCoA écourté de 2 carbones, qui subira autant de cycles qu'il y a de paires de carbones restantes. Les acétylCoA produits sont ensuite oxydés en CO_2 et H_2O par le cycle de Krebs.

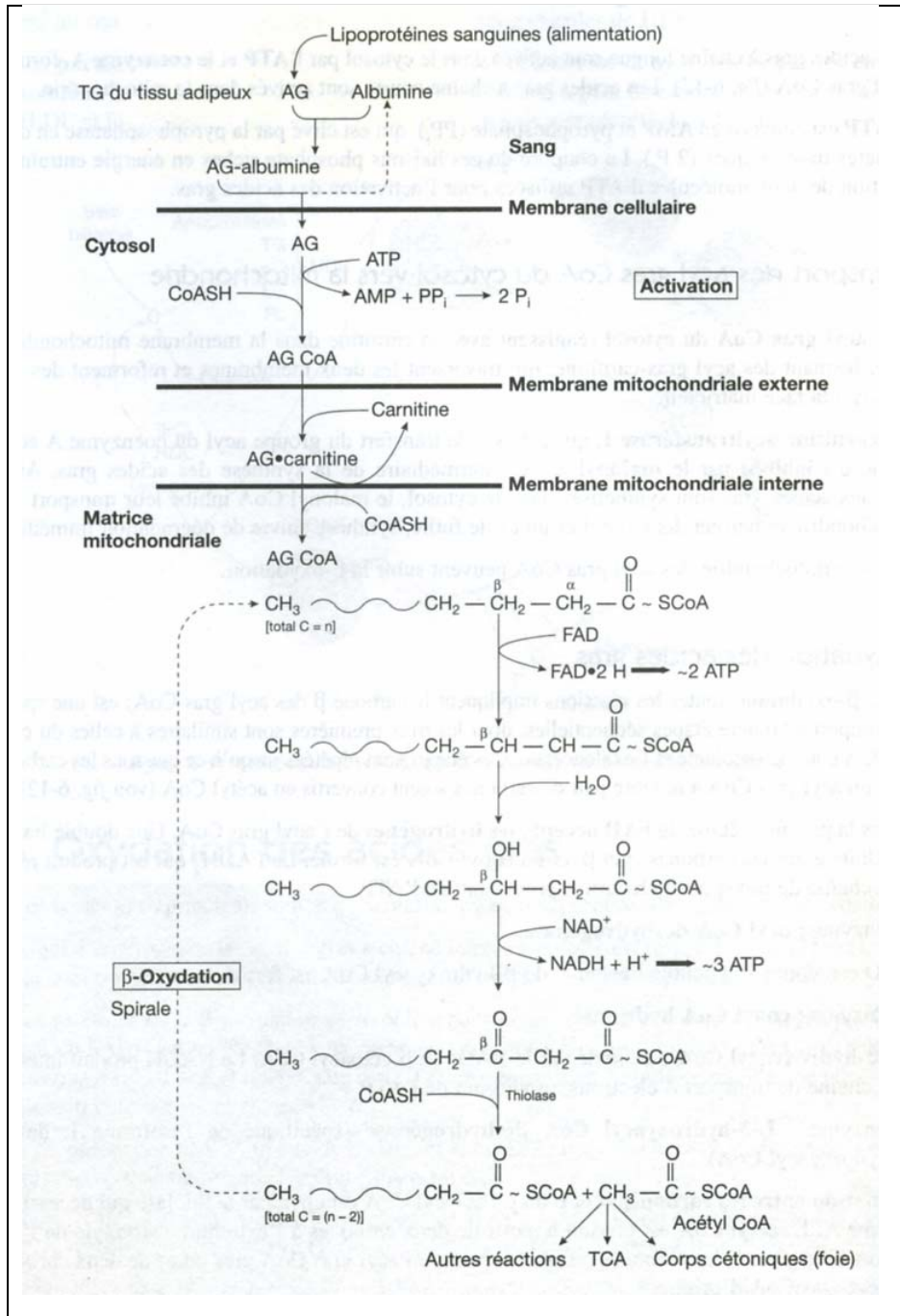


Figure 5 : Activation et oxydation des acides gras [51].

V.1.2 - Synthèse des acides gras

Les AG représentent pour l'organisme la forme de stockage d'énergie la plus importante et la plus efficace. Il existe deux voies possibles pour synthèse d'un AG :

- La voie mitochondriale
- La voie cytoplasmique

La voie intra-mitochondriale :

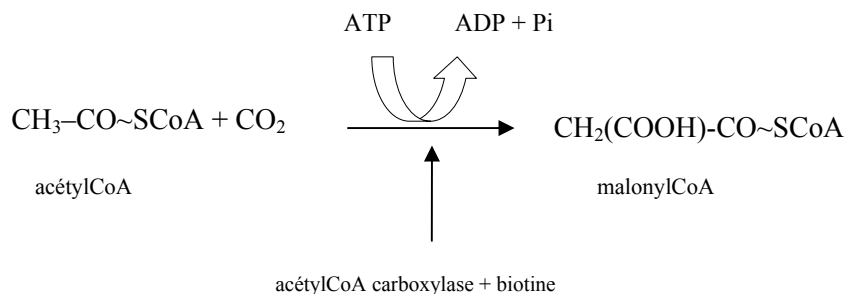
Cette voie métabolique, peu importante sur le plan quantitatif, correspond à la remontée de l'hélice de Lynen, c'est-à-dire une synthèse par élongation. Elle rajoute des maillons de 2 carbones sur des chaînes préexistantes (contraire de la β -oxydation). C'est donc un moyen de former des AG plus longs à partir d'AG préexistants, notamment les AG à chaîne très longue (C24-C30) par l'élongation de l'acide palmitique.

La voie cytoplasmique :

Elle correspond à une synthèse « de novo », qui débute à partir d'un reste de 2 atomes de carbone (acétyle). On parle également de synthèse extra-mitochondriale des AG ou de synthèse par voie malonique. Sur le plan quantitatif, c'est la voie la plus importante.

Cette synthèse extra-mitochondriale se déroule en 7 étapes :

- 1) La première étape est la carboxylation de l'acétylCoA



Cette réaction se fait en consommant une molécule d'ATP. L'enzyme impliquée dans celle-ci est l'acétylCoA carboxylase et a pour cofacteur indispensable la biotine. Cette première réaction est l'étape déterminante de cette voie métabolique car elle est limitante. En effet, l'enzyme est soumise à une régulation par des inhibiteurs (le malonylCoA et l'acylCoA) et des activateurs (les acides tricarboxyliques du cycle de Krebs, en particulier l'acide citrique)

- 2) Les autres étapes sont : la condensation de l'acétylCoA et du malonylCoA, suivie d'une hydrogénation puis d'une déshydratation, d'une seconde hydrogénation, d'un transfert d'acyle et d'une désacylation.

L'acétylCoA représente donc la base de cette synthèse.

Rôle de la carnitine dans la synthèse malonique des AG :

La carnitine aurait deux niveaux d'action :

- elle lèverait l'inhibition des acylCoA à chaîne longue sur l'acétylCoA carboxylase en donnant des acylcarnitines ;
- elle permettrait le transport des résidus acétyles de la membrane mitochondriale (qui leur est imperméable) dans le cytoplasme sous forme d'acétylcarnitine.

V.1.3 - Carnitine et cétogenèse

Les études de Mc Garry et Foster (1976) [52] ont montré le rôle primordial de la carnitine dans la cétogenèse.

Au niveau des mitochondries du foie, la β -oxydation des AG aboutit à la formation de corps cétoniques qui sont utilisés dans la néoglucogenèse, mais qui peuvent également être exportés dans le cerveau. Ces corps cétoniques (acide acétoacétique, acide β -hydroxybutyrique et acétone) servent au cours du jeûne à épargner le glucose au niveau du cerveau.

L'acétylCoA, après des réactions enzymatiques de condensation et de clivage, est transformé en acide acétoacétique : il représente donc le substrat fondamental de la cétogenèse.

La principale source d'acétylCoA (outre les acides aminés glucoformateurs et les acides aminés cétoformateurs) est le catabolisme des AG, dans la mesure où chaque étape de la β -oxydation libère une molécule d'acétylCoA. Il s'agit, à l'état normal, d'AG à chaîne longue provenant de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux.

Ainsi la production de corps cétoniques dépend de l'afflux des AG au foie et de leur oxydation. Or, nous avons vu précédemment que la β -oxydation des AG était mitochondriale et qu'elle nécessitait la présence de carnitine pour le transfert des acylCoA à chaîne longue [53].

Ainsi la carnitine joue un rôle majeur dans la production de corps cétoniques. Ce rôle essentiel de la carnitine est illustré en clinique par des états d'hypoglycémie sans cétose vus lors de déficit en carnitine.

V.2 - CARNITINE ET METABOLISME GLUCIDIQUE

La carnitine est impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique.

V.2.1 - La glycolyse

La glycolyse permet le catabolisme du glucose en pyruvate capable de diffuser à travers la membrane mitochondriale sans transporteur. Dans la matrice mitochondriale, le pyruvate est notamment déshydrogéné par un complexe enzymatique, la pyruvate déshydrogénase, pour fournir de l'acétylCoA. L'acétylCoA intègre ensuite le cycle de Krebs où il sera oxydé en CO_2 et H_2O avec production d'ATP.

La carnitine participe indirectement à la régulation de la vitesse de la glycolyse en contrôlant le rapport intramitochondrial acétylCoA / CoA. Ainsi, par son rôle détoxifiant, la carnitine

diminue le rapport acétylCoA / CoA et favorise l'oxydation du pyruvate. A l'inverse, en assurant l'entrée des AG à chaîne longue dans la mitochondrie pour qu'ils y subissent la β -oxydation, la carnitine provoque l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase et permet de ce fait l'épargne glucidique (cf 1^{ère} partie IV.3).

V.2.2 - La néoglucogenèse

La néoglucogenèse est l'inverse de la glycolyse, à l'exception de trois étapes. La transformation de l'acide pyruvique en acide phospho-énolpyruvique nécessite une étape intermédiaire avec formation d'acide oxaloacétique. La réaction intermédiaire, mitochondriale, est catalysée par la pyruvate carboxylase dont l'activité dépend comme précédemment du rapport acétylCoA / CoA. La seule différence est que l'accumulation d'acétylCoA active la pyruvate carboxylase alors qu'elle inhibe la pyruvate déshydrogénase (cf 1^{ère} partie IV.3).

V.3 - CARNITINE ET ACIDES AMINES RAMIFIES

Les catabolismes de la leucine, de l'isoleucine et de la valine comportent plusieurs étapes dont deux leur sont communes : une transamination et une décarboxylation oxydative. La première étape de transamination se situe dans le cytosol ou dans la mitochondrie. La décarboxylation oxydative des acides α cétoniques, quant à elle, a lieu uniquement dans la mitochondrie.

Elle donne naissance à des acyl-CoA possédant un carbone de moins que l'acide aminé initial (C6 \rightarrow C5).

Pour un catabolisme complet, il est possible que les dérivés de ces acides aminés soient obligés de passer d'une organelle à une autre, d'un compartiment cellulaire à un autre ; mais la plupart des membranes intracellulaires sont imperméables aux acyl-CoA. C'est donc à ce niveau qu'intervient la carnitine, jouant à nouveau son rôle de transporteur. De plus, une fois dans la mitochondrie, les cétoacides ramifiés subissent la décarboxylation oxydative. Il y a alors formation d'acylCoA mobilisant des CoASH. Pour éviter l'élévation anormale du rapport intramitochondrial acylCoA / CoASH, la carnitine intervient en acceptant les groupements acyls. Les acylcarnitines formées sont alors transportées hors de la mitochondrie. La carnitine assure ainsi la détoxification mitochondriale et le rétablissement d'un rapport acylCoA / CoASH compatible avec un meilleur fonctionnement des systèmes enzymatiques intramitochondriaux [23].

VI - FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA CARNITINE DANS DIFFERENTS ORGANES

VI.1 - LE MUSCLE SQUELETTIQUE

VI.1.1 - Métabolisme énergétique du muscle squelettique

L'énergie utilisée par l'organisme lors d'un exercice physique a deux origines : les acides gras et les glucides.

En effet, les fibres de type I sont impliquées dans l'exercice intense maximal de courte durée, elles sont riches en mitochondries pour permettre une bonne transformation du glucose en ATP par le cycle de Krebs, ce phénomène se déroulant en aérobiose.

Les réserves en glucose s'épuisant rapidement, ce sont les fibres de type II qui prennent le relais lorsque l'effort est long et soutenu (anaérobiose). Elles utilisent alors préférentiellement les acides gras comme source d'énergie, la glycolyse étant limitée par une augmentation du taux d'acétyl-CoA qui inhibe la pyruvate déshydrogénase [54].

Pendant un exercice prolongé, 30 à 120 minutes, la carnitine totale plasmatique reste inchangée. Sa fraction libre diminue significativement, alors que les formes acétylées et acylées augmentent. L'exercice musculaire augmente l'excrétion urinaire de carnitine dans les 24 heures qui suivent un exercice intense de 55 à 100 mg/jour [54]. Des médecins et diététiciens ont donc supposé que les performances physiques pouvaient être améliorées par la prise de carnitine, celle-ci étant utilisée comme dopant, ou plutôt comme substance ergogène (du grec ergon = énergie et genos = origine), qui est une substance renouvelable intervenant dans les mécanismes de production d'énergie. D'où l'utilisation de la carnitine chez le sportif basée sur les hypothèses suivantes :

- Pallier au déficit en carnitine libre plasmatique et musculaire observé lors d'exercices physiques soutenus de longue durée,
- Permettre une récupération physique plus rapide après l'exercice,
- Augmenter l'oxydation des acides gras à longue chaîne épargnant ainsi les réserves de glycogène et permettant de brûler l'excès de graisses,
- Développer la musculature ,
- Augmenter les performances physiques, avec élévation du volume d'oxygène consommé (VO₂ max).

Pour vérifier ces allégations, de nombreuses études se sont intéressées au sujet.

VI.1.2 - Activité physique et carnitine : Supplémentation en carnitine chez l'homme sain soumis à un exercice musculaire

Selon tous les auteurs, la dose minimale à proposer pour avoir une augmentation sensible mais physiologique de la carnitine plasmatique et musculaire est de 0,5 g/j.

- **Exercice aérobie :**

Selon la plupart des auteurs, la dette d'oxygène et le VO_2 max ne sont pas modifiés par la prise journalière de carnitine à des doses supérieures à 1 gramme pendant une dizaine de jours.

De plus, le seul facteur limitant l'exercice est la ventilation pulmonaire et la possibilité d'apporter aux muscles l'oxygène nécessaire à la voie oxydative. L'administration de carnitine n'augmente pas les performances du sportif ni son quotient respiratoire, montrant que la carnitine n'épargne pas le métabolisme du glycogène au profit de l'utilisation des acides gras. La récupération après l'effort n'est pas non plus améliorée.

- **Exercice anaérobie :**

- * Anaérobiose alactique

La carnitine lève l'inhibition de l'adénylate translocase : elle pourrait ainsi être à l'origine d'une augmentation intramitochondriale d'ATP et de créatine phosphate. Quatre grammes de carnitine par jour pendant deux semaines entraînent une augmentation faible mais significative de la force musculaire « explosive » [54]. Cependant l'exercice anaérobie alactique a été peu étudié jusqu'à présent.

- * Anaérobiose lactique

Pendant ce type d'exercice, il y a accumulation d'acétylCoA provenant de la lipolyse. Celui-ci inhibe la pyruvate déshydrogénase, ce qui limite l'utilisation du glucose dans le cycle de Krebs et participe à la formation d'acide lactique. La carnitine pourrait ainsi détoxifier la mitochondrie en formant de l'acétylcarnitine à partir des acétylCoA en excès, ce qui éviterait l'accumulation d'acide lactique dans le muscle et augmenterait la durée de l'exercice. Les résultats quant à cette hypothèse sont très controversés, indiquant que la teneur plasmatique en lactates n'est pas modifiée après supplémentation en carnitine.

Aucune étude n'a été publiée concernant l'évolution de la masse musculaire sous carnitine.

En revanche d'autres études montrent que la carnitine n'a aucun effet sur la lipolyse ou l'amaigrissement.

En conclusion, la prise de carnitine ne permet de corriger qu'un léger déficit transitoire physiologique chez le sportif endurant. En effet, la fuite urinaire de carnitine ne dure pas et l'organisme reconstitue ses réserves par synthèse endogène ou par apport exogène (alimentation). Les effets dopants de la carnitine sont infondés. Le seul effet qu'elle aurait sur les performances physiques serait d'augmenter la force lors d'un exercice en anaérobie alactique (type épreuve de force).

VI.1.3 - Conséquences musculaires d'un déficit en carnitine

Un déficit en carnitine diminue l'entrée des AG dans la mitochondrie et conduit à un défaut d'utilisation des lipides. Les sucres deviennent alors les principaux substrats énergétiques. Et lorsque le glycogène arrive à épuisement, il n'y a pas d'autre alternative que le glucose sanguin.

Un **déficit primaire** en carnitine est caractérisé par des taux musculaires de carnitine très abaissés. Cliniquement on observe une faiblesse musculaire progressive, et sur le plan biochimique, on note une élévation des enzymes musculaires (créatine kinase, aldolase). Les biopsies musculaires montrent une surcharge lipidique des fibres de type I. Le traitement substitutif au long cours par la L-Carnitine permet d'obtenir des résultats spectaculaires.

Les **déficits secondaires** en carnitine sont moins caractéristiques mais peuvent, eux aussi, présenter une symptomatologie musculaire tels qu'une hypotonie, une faiblesse musculaire, une intolérance à l'effort, des épisodes de myalgie avec parfois myoglobinurie associée, une surcharge lipidique musculaire.

VI.2 - LE CŒUR

VI.2.1 - Rôle de la carnitine dans le métabolisme cardiaque

Le cœur utilise comme principale source énergétique l'oxydation des AG (l'oxydation du glucose et des lactates représentant un apport mineur). La translocation des acylCoA dans l'espace mitochondrial interne via le « système carnitine » est indispensable à l'oxydation des AG.

Dans le cœur, l'essentiel de la carnitine se trouve dans le cytosol tandis que la mitochondrie en contient seulement une petite quantité. L'équilibre entre les compartiments cytosolique et mitochondrial est assuré par la translocase située dans la membrane interne de la mitochondrie qui permet l'échange d'une molécule de carnitine contre une molécule d'acylcarnitine. Tous

les esters de carnitine sont plus ou moins en équilibre avec les esters de CoA correspondants via les CPT I et II et la CAT. A l'inverse, 90% du coenzyme A est localisé dans la mitochondrie et seulement 10% dans le cytosol. Cette distribution de la carnitine et du CoA facilite l'activation des AG et leur transfert dans la mitochondrie pour leur oxydation.

Dans les mitochondries du cœur, la β -oxydation et le cycle de Krebs agissent conjointement. Quasiment tous les acétylCoA issus de la β -oxydation rejoignent le cycle de Krebs. Seule une petite quantité d'acétylCoA est hydrolysée en acétate ou transférée à la carnitine par la CAT. La quantité d'acétyles transformés en acétylcarnitines est limitée par la taille du pool de carnitine. L'utilisation extramitochondriale des acétylcarnitines est quantitativement peu importante dans le cœur. La liaison et le relargage de la carnitine et de ses esters sont des processus relativement lents dans ce tissu [55].

Un déficit en carnitine du muscle cardiaque provoque des altérations du métabolisme des AG et des sucres, pouvant conduire à une altération de la fonction cardiaque [31], que l'on retrouve dans la plupart des situations de déficit myocardique en carnitine.

VI.2.2 - Conséquences myocardiques d'un déficit en carnitine

Un déficit en carnitine tissulaire modifie le métabolisme énergétique cardiaque. L'oxydation des AG est diminuée alors que celle des sucres est favorisée, car l'absence de carnitine empêche le transfert des AG vers la β -oxydation mitochondriale. Il en résulte une diminution de la production d'acétylCoA dans la mitochondrie. Inversement, la baisse du ratio acétylCoA / CoA favorise l'activité de la pyruvate déshydrogénase et ainsi l'oxydation du glucose et des lactates. L'importance du déficit en carnitine et la quantité de sucres circulants sont donc des paramètres importants à considérer.

Ces modifications métaboliques ont bien sûr des répercussions cliniques sur la fonction myocardique : des cardiomyopathies hypertrophiques et/ou dilatées ainsi que des troubles du rythme ont été rapportés lors de déficits primaires ou secondaires en carnitine [56]. Chez ces patients, l'instauration d'un traitement classique conduit le plus souvent à une insuffisance cardiaque congestive, alors qu'une supplémentation en carnitine permet une amélioration nette de ces paramètres [57].

VI.2.3 - Carnitine et pathologies cardiaques

Différentes données recensent une réduction du taux myocardique de carnitine au cours de l'insuffisance cardiaque. Ainsi, Masumura et al. (1990) [58] rapportent une baisse de carnitine

libre (CL) et une hausse des acylcarnitines à chaîne longue, la carnitine totale (CT) étant proche des valeurs normales.

L'oxydation des AG dépend entièrement de l'oxygène moléculaire. Dans l'ischémie, la baisse du flux sanguin des artères coronaires diminue l'apport d'oxygène au cœur, entraînant l'inhibition de l'oxydation des AG, avec pour conséquences une moindre production d'ATP et l'accumulation d'acylCoA délétères pour le myocarde. En effet, ces métabolites toxiques pour le sarcolemme peuvent entraîner des lésions cellulaires irréversibles.

De plus, la vitesse de conduction cellulaire est réduite par l'accumulation des chaînes d'acylcarnitines. Au cours de l'ischémie, les anomalies de propagation de l'influx peuvent conduire à des arythmies mortelles [59].

Ces constatations laissent supposer et espérer qu'une supplémentation en carnitine permet l'amélioration de la production énergétique et donc de la fonction contractile. La carnitine exogène viendrait restaurer le stock de carnitine libre intramyocardique et agirait comme modulateur du métabolisme et piègeur des métabolites délétères qui s'accumulent au cours de l'ischémie. Ainsi, la supplémentation thérapeutique par la L-carnitine pourrait inhiber les conséquences enzymatiques néfastes induites : la carnitine libre stimule la β -oxydation, réduit le taux intramitochondrial d'acylCoA et augmente celui de l'ATP dont le transfert est facilité [59].

VI.3 - LE FOIE

VI.3.1 - Rôle de la carnitine dans le métabolisme hépatique

Au niveau hépatique, les AG peuvent suivre deux voies :

Estérification pour reformer des triglycérides,

Oxydation pour la formation de corps cétoniques.

En effet, dans la mitochondrie hépatique, la β -oxydation a lieu indépendamment du cycle de Krebs, et les acétylCoA sont donc convertis en corps cétoniques. La carnitine dans le foie opère classiquement, et le « système carnitine » assure le transfert dans la mitochondrie des AG activés par l'acylCoA synthétase.

Des petites différences sont cependant à noter :

→ Les AG en C10 ou C12 peuvent être oxydés sans intervention de la carnitine.

→ Les AG à chaîne très longue empruntant l'oxydation peroxysomale sont plus nombreux. La carnitine assure le transport vers la mitochondrie des métabolites peroxysomaux.

→ Les enzymes mitochondriales comme la CPT I sont sensibles au malonylCoA.

→ Le taux d'oxydation des AG est principalement déterminé par le taux d'acylcarnitines dans le tissu, c'est-à-dire par le ratio acétylCoA / CoA extramitochondrial et l'activité de la CPT I et non par l'état rédox (NADH/NAD) [55].

VI.3.2 - Conséquences hépatiques d'un déficit en carnitine

L'absence de carnitine inhibe la β -oxydation mitochondriale des AG et de ce fait la production d'acétylCoA. La céto-genèse est alors impossible et l'épreuve de jeûne fait apparaître une hypoglycémie avec hypocétose.

En effet, de nombreux patients, principalement des nourrissons et des enfants de moins de 4 ans, ayant développé un ou plusieurs accès d'encéphalopathie hépatique, avec hypoglycémie sans cétose à l'occasion d'un jeûne malencontreux et/ou d'une infection bénigne récurrente, ont un déficit en carnitine dans le sérum, le muscle et le foie, avec une surcharge lipidique dans ces tissus [21]. Plus précisément, dans la forme systémique de déficit en carnitine, où les taux plasmatique, musculaire et hépatique de carnitine sont très abaissés, on observe en clinique une faiblesse musculaire permanente et évolutive, que compliquent des poussées dont la symptomatologie rappelle celle du syndrome de Reye. Ces symptômes sont des nausées, des vomissements, des troubles de la conscience, et un coma, avec à l'examen une hépatomégalie de degré variable. Sur le plan biologique, il est observé une hypoglycémie sans cétose, une hyperammoniémie, une élévation des transaminases sériques, une hyperlactacidémie modérée et inconstamment une élévation des acides dicarboxyliques. Ces poussées peuvent être régressives mais dans un certain nombre de cas, elles sont responsables d'une évolution mortelle si un traitement n'est pas mis en place [60].

VI.3.3 - Carnitine et pathologies hépatiques

Le métabolisme de la carnitine est modifié chez les sujets insuffisants hépatiques. Le faible apport alimentaire en carnitine, notamment chez l'alcoolique qui consomme une quantité considérable de calories sous forme d'alcool, et la localisation hépatique de la dernière étape de la biosynthèse favorisent la baisse des taux de carnitine. A l'inverse, l'élévation de la protéolyse augmente la quantité de lysine disponible, et accélère la biosynthèse de carnitine. Ce dernier paramètre permettrait d'expliquer l'élévation de la carnitine totale et estérifiée observée lors de cirrhoses alcooliques [61]. De plus, la mise en évidence d'une stéatose chez les patients présentant des taux normaux de carnitine suggère un déficit fonctionnel de la carnitine et/ou une augmentation de l'apport d'AG par la consommation d'alcool [28]. Par

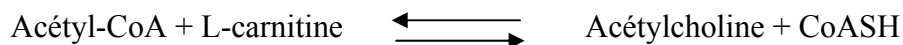
l'absorption d'éthanol, l'activité de la CPT est fortement diminuée, et la sensibilité de cette enzyme à l'inhibition par le malonylCoA exogène fortement augmentée.

VI.4 - LE CERVEAU

VI.4.1 - Rôle de la carnitine dans le métabolisme cérébral

La glycolyse constitue la première source énergétique du cerveau. Elle conduit à l'accumulation d'acétylCoA dans la mitochondrie qui, lorsqu'il n'entre pas dans le cycle de Krebs, rejoint le cytoplasme sous forme d'acétylcarnitines. Ces acétylCoA cytoplasmiques sont ensuite employés pour la synthèse d'AG, de cholestérol et d'acétylcholine [62].

L'acétylcholine est le neurotransmetteur des synapses cholinergiques. Sa synthèse se fait dans le cytoplasme selon la réaction suivante catalysée par l'acétylcholine transférase :



La synthèse d'acétylcholine est faible lors d'apport de citrate et d'acétate alors qu'elle est favorisée par l'apport de pyruvate, de glucose et d'acétylcarnitine, qui sont donc des précurseurs de l'acétylCoA. De plus, la carnitine, en assurant le transport des groupes « acétyl » de la mitochondrie vers le cytoplasme, stimule la synthèse d'acétylcholine dans une action synergique avec la choline, un apport de carnitine seule étant accompagné d'une diminution de synthèse.

VI.4.2 - Conséquences cérébrales d'un déficit en carnitine

Peu de données sont disponibles. Cependant, des déficits primaires en carnitine basés sur un défaut de transport de la molécule peuvent être corrélés avec des encéphalopathies aiguës [63].

VII - METHODES DE DOSAGE

VII.1 - PRELEVEMENTS NECESSAIRES AU DOSAGE

- **Prélèvements sanguins :**

Un volume de 5 mL est nécessaire pour déterminer le taux sanguin. Ce prélèvement est réalisé de préférence chez le sujet à jeun. Il est centrifugé rapidement et conservé à -20°C ou -70°C selon la durée du stockage.

- **Prélèvements tissulaires :**

Dix à vingt milligrammes de tissus sont nécessaires pour évaluer le taux tissulaire. Les biopsies doivent être conservées dans l'azote liquide ou stockées à -70°C.

- **Prélèvements urinaires :**

La détermination du taux urinaire demande une miction de 5 à 10 mL. Les exigences de conservation sont les mêmes que pour les prélèvements sanguins.

VII.2 - METHODES DE DOSAGE

VII.2.1 - Les différentes fractions

Dans les milieux biologiques, la carnitine est présente sous forme libre et estérifiée (acylcarnitines). Pour évaluer correctement l'état du pool de carnitine, les taux de carnitine libre et d'acylcarnitines doivent être quantifiés. Les concentrations de carnitine totale, libre et estérifiée peuvent être mesurées après déprotéinisation et/ou hydrolyse alcaline des échantillons ou obtenues par le calcul.

En effet, un dosage sans hydrolyse préalable renseigne sur le taux de carnitine libre alors qu'un dosage fait après hydrolyse donne la concentration en carnitine totale de l'échantillon. Les acylcarnitines sont ensuite évaluées en soustrayant la carnitine libre de la carnitine totale. Pour pousser l'analyse un peu plus loin, une réaction de déprotéinisation par l'acide perchlorique suivie d'une centrifugation permet la séparation des acylcarnitines à chaîne longue, mesurables dans le précipité après hydrolyse, alors que le surnageant contient la carnitine libre et les acylcarnitines à chaîne courte et moyenne [64].

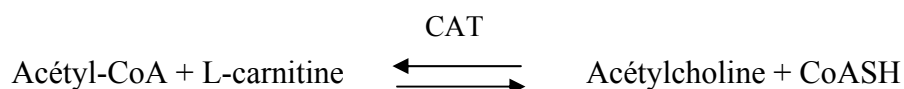
VII.2.2 - Les différentes méthodes

❖ Méthode de référence

La méthode de référence [65] utilise la spectrométrie de masse en tandem associée à la dilution isotopique et permet la détermination simultanée de la carnitine libre et des différents dérivés acylés de la carnitine. Cette procédure est rapide, sensible, et ne requiert qu'un petit échantillon de sang (< 100 µL).

❖ Méthode spectrophotométrique

Le dosage de la carnitine est basé sur une réaction catalysée par la carnitine acétyltransférase (CAT) :



D'après cette réaction, l'addition de carnitine à un système contenant un excès d'acétylCoA et de CAT conduit à la formation d'une quantité stoechiométrique de CoASH. Une deuxième réaction irréversible utilisant le CoASH permet de doser la carnitine.

Les méthodes spectrophotométriques sont basées sur la mesure du CoASH [64].

Marquis et Fritz en 1964 [49] utilisent pour la première fois le DTNB (acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque ou réactif d'Ellman) pour doser la carnitine. Le CoASH formé réagit avec le DTNB pour former l'anion 5-thio-2 nitrobenzoate (composé thiophénylate) qui absorbe à 412 nm et dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de carnitine. Avec cette méthode il est absolument indispensable d'éliminer les protéines du plasma ou du sérum qui réagissent avec le DTNB. Cette élimination peut être réalisée soit par chauffage à 100°C soit par ultrafiltration.

Les avantages de cette méthode sont :

- automatisation sur des analyseurs automatiques [66] [67] [68] [69] [70] [71] utilisables pour d'autres dosages dans un laboratoire de routine,
- bonne linéarité (jusqu'à 800 µM),
- pas d'utilisation de substrats radioactifs,
- limite de détection du même ordre de grandeur que la méthode radio-isotopique en utilisant des volumes d'échantillons identiques.

Les inconvénients sont :

- obligation d'une étape préalable de déprotéinisation. Si la technique d'ultrafiltration est choisie, le prix de revient subit une augmentation notable,

- sensibilité médiocre : cette méthode peut s'avérer insuffisamment sensible pour les concentrations inférieures à 10 nM,
- possibilité d'interférences si les échantillons contiennent des thiols (blancs élevés) ou de fortes proportions d'acylcarnitine (surestimation de la carnitine libre). Une turbidité apparaît après hydrolyse alcaline sur les échantillons non ultrafiltrés.

❖ Méthode radioenzymatique

La méthode radio-isotopique a initialement été décrite par Cederblad et Lindstedt (1972) [2] et Mc Garry et Foster [52] puis modifiée par de Sousa et al. [72] qui ont introduit le N-éthylmaléimide, agent complexant les thiols tels que le CoASH, pour rendre la réaction unidirectionnelle dans le sens de la formation d'acylcarnitine. Cette modification a pour avantage de rendre la réaction insensible à la carnitine acylée apportée par le prélèvement au cours du dosage de la carnitine libre. Le substrat radioactif utilisé est le [1-¹⁴C]acétyl-CoA et le produit radioactif de la réaction sera la [1-¹⁴C]acétylcarnitine. Ces deux produits radioactifs, présents ensemble dans le milieu d'incubation sont séparés l'un de l'autre en passant le mélange d'incubation sur une microcolonne de résine Dowex AG2-X8 [73]. La [1-¹⁴C]acétylcarnitine est éluée par un simple lavage de la colonne avec de l'eau. Des courbes étalons non linéaires, liées à la présence de molécules de faible poids moléculaire, et d'acylcarnitines à chaînes courtes ont conduit certains auteurs [3] [52] à modifier la méthode.

Les avantages de cette méthode sont :

- sa grande sensibilité, puisqu'il est possible de doser des quantités de carnitine de l'ordre de 50 à 100 picomoles,
- volume faible d'échantillon (dosage de la carnitine totale et de la carnitine libre avec 125 µl de plasma),
- pas ou peu d'interférences.

Au niveau des inconvénients, il faut noter :

- absence de réactifs prêts à l'emploi disponibles dans le commerce,
- méthode non automatisable, donc utilisable seulement avec de petites séries d'échantillons,
- méthode utilisant un substrat radioactif qui entraîne un prix de revient élevé, et une mise en œuvre dans un laboratoire agréé pour la manipulation de produits radioactifs.

❖ Autres méthodes

→ Les méthodes par HPLC (chromatographie liquide haute performance) semblent être les plus utilisées à l'heure actuelle pour la séparation et la quantification des différentes fractions [74] [75] [76].

→ Une méthode par électrophorèse capillaire avec détection UV indirecte a été mise au point pour la séparation et la détermination de la carnitine et des acyl-carnitines [77]

→ D'autres méthodes enzymatiques ont été mises au point, utilisant d'autres enzymes que la CAT [78].

VII.3 - INDICATIONS

Le dosage de carnitine est prescrit pour :

- la recherche d'un déficit systémique congénital en carnitine dans le cadre d'une cardiomyopathie,

- la recherche d'un déficit secondaire dû à une carence d'apport ou à une fuite excessive (comme par exemple l'hémodialyse),

- le suivi thérapeutique de patients ayant des aciduries organiques (acidurie propionique, méthylmalonique, isovalérique, glutarique) recevant une supplémentation en L-carnitine.

VIII - VALEURS NORMALES ET VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

Les réserves de carnitine sont la résultante d'un équilibre entre les entrées [carnitine alimentaire réellement absorbée (ingesta – excrétion fécale) + synthèse endogène] et les sorties (élimination urinaire). Le pool corporel de carnitine est d'environ 100 mmoles chez l'adulte. Il est réparti de la façon suivante :

- Muscle : 80 à 98%
- Foie : 1,6%
- Milieu extracellulaire : 0,6%

VIII.1 - CONCENTRATIONS SANGUINES

VIII.1.1 - Valeurs normales :

De nombreuses études ont déterminé les taux sériques ou plasmatiques chez les patients sains (tableau 2).

REFERENCES	n	CT (µmol/l)	CL (µmol/l)	CE (µmol/l)	CE/CL
<u>Lennon et al. (1986) [19]</u>	28	41.4 ± 12.0	33.4 ± 7.8	8.2 ± 7.1	
Hommes	14	43.0 ± 12.3	35.4 ± 8.8	7.6 ± 7.3	
Femmes	14	39.9 ± 12.0	33.4 ± 7.8	8.7 ± 7.3	
<u>Schmidt-Sommerfeld et al. (1988) [20]</u>					
Hommes	21	61.5 ± 10.7	43.8 ± 7.3	17.7 ± 7.5	0.41 ± 0.18
Femmes	20	46.1 ± 9.3	34.2 ± 7.1	12.0 ± 5.2	0.36 ± 0.15
(min – max)		(33.8 – 77.5)	(25.4 – 54.1)	(5.4 – 30.1)	(0.11 – 0.78)
<u>Harper et al. (1993) [79]</u>					
Hommes	13	47.0 ± 5.4	41.3 ± 4.9	5.7 ± 4.1	
Femmes	16	42.7 ± 10.3	36.7 ± 8.3	6.0 ± 4.2	
(min – max)		(22.6 – 62.3)	(22.7 – 52.2)	(0 – 14.1)	
<u>Boulat et al. (1993) [80]</u>					
Hommes	160	43.6 ± 7.3	37.8 ± 6.6	5.8 ± 4.9	0.159 ± 0.1
Femmes	180	38.1 ± 7.6	31.7 ± 6.9	6.47 ± 3.3	0.214 ± 1.12
(min – max)		(18 – 60)	(14 – 53)	(1 – 21)	(0.02 – 0.65)
<u>Güneral (1995) [81]</u>					
Hommes et Femmes	18	59.6 ± 11.9	52.2 ± 11.9	7.6 ± 0.6	0.19 ± 0.03
(min – max)		(40.9 – 74.5)	(33.5 – 67.1)	(7.4 – 9.3)	(0.14 – 0.22)

Tableau 2: Taux sériques et plasmatiques de carnitine

CL: carnitine libre - CT: carnitine totale - CE: carnitine estérifiée (CE = CT – CL)

Chez l'adulte en bonne santé, le taux de carnitine totale (CT) varie en moyenne de 38 à 63 µM et celui de carnitine libre (CL) de 30 à 55 µM. La carnitine estérifiée (CE) représente 25% de la carnitine totale. Le rapport acylcarnitine/carnitine (CE/CL) est inférieur à 0,4 [21]. Chez la femme les taux de CT et CL sont légèrement inférieurs à ceux de l'homme : - 5 µmol/l en moyenne [21]. Certains auteurs rapportent un ratio CE/CL plus important chez la femme que chez l'homme [80] [82].

Des dosages de carnitine érythrocytaire sont aussi possibles. Les relations entre les taux plasmatiques et érythrocytaires sont limitées. Le contenu en CT est plus important dans l'érythrocyte que dans le plasma, et la proportion des acylcarnitines plus importante [79].

VIII.1.2 - Variations physiologiques

Plusieurs facteurs interviennent dans les variations physiologiques des taux de carnitine : l'âge, le sexe, la grossesse, et l'alimentation

- **L'âge**

Schmidt et Sommerfeld [20] ont effectué des dosages plasmatiques chez 353 enfants et 41 adultes en bonne santé (tableau 3).

AGE	N	CT (µmol/l)	CL (µmol/l)	CE (µmol/l)	CE/CL
1 jour	30	36,4±10,8 (23,3-67,9)	20,1±6,7 (11,5-36,0)	16,3±5,7 (7,0-36,6)	0,87±0,33 (0,37-1,68)
2-7 jours	44	25,2±4,1 (17,4-40,6)	14,9±3,0 (10,1-21,0)	10,3±3,7 (2,9-23,8)	0,73±0,31 (0,15-1,44)
8-28 jours	9	36,7±10,5 (18,5-58,7)	27,6±9,7 (12,3-46,2)	9,2±3,2 (4,1-14,5)	0,37±0,16 (0,11-0,65)
29 jours - 1 an	16	47,6±7,7 (38,1-68,0)	35,5±6,5 (26,9-49,0)	12,0±3,1 (7,4-19,0)	0,35±0,10 (0,23-0,50)
1-6 ans	2	54,4±9,9 (34,6-83,6)	41,7±7,9 (24,3-62,5)	12,8±5,9 (4,0-28,3)	0,32±0,16 (0,11-0,83)
10-17 ans	97	53,4±9,5 (33,7-77,0)	39,4±8,7 (21,6-64,5)	14,0±5,1 (3,7-29,2)	0,38±0,17 (0,09-0,88)
Adultes	41	54,0±12,6 (33,8-77,5)	39,1±8,6 (25,4-54,1)	14,9±7,0 (5,4-30,1)	0,39±0,17 (0,11-0,78)

Tableau 3: Concentrations plasmatiques de carnitine et ratio CE/CL en fonction de l'âge (d'après Schmidt-Sommerfeld et al.. 1988) [20]

Chez l'enfant, une corrélation positive est constatée entre les concentrations plasmatiques de carnitine libre et totale et l'âge. Le ratio CE/CL, lui, est, inversement corrélé à l'âge.

Les valeurs adultes sont atteintes à l'âge de 1 an pour Schmidt-Sommerfeld et al.. [83] et de 10 ans pour Güneral [81]. Contrairement aux taux musculaires, les taux plasmatiques ne diminuent pas avec l'âge (au contraire, ils augmentent à partir de 45 ans chez la femme) [84].

- **Le sexe :**

Il est nécessaire de distinguer les hommes des femmes pour une étude plus précise des taux de carnitine (tableau 4).

Sexe, âge	N	CT (µmol/l)	CL (µmol/l)	CE (µmol/l)	CE/CL
Homme, adulte	21	61.5 ± 10.7	43.8 ± 7.3	17.7 ± 7.5	0.41 ± 0.18
Femme, adulte	20	46.1 ± 9.3	34.2 ± 7.1	12.0 ± 5.2	0.36 ± 0.15
Garçon, 10-17 ans	51	53.5 ± 10.1	39.6 ± 9.3	14.0 ± 5.2	0.38 ± 0.17
Fille, 10-17 ans	46	53.2 ± 8.9	39.3 ± 8.1	13.9 ± 5.1	0.37 ± 0.16

Tableau 4 : Concentrations plasmatiques de carnitine et ratio CE/CL en fonction du sexe (d'après Schmidt-Sommerfeld et al., 1988) [20]

Jusqu'à 17 ans (seuil au-delà duquel, selon les auteurs, la personne est considérée comme adulte), les concentrations plasmatiques sont les mêmes pour les deux sexes alors que des différences sont notées à l'âge adulte. Les concentrations plasmatiques en carnitine totale sont plus élevées entre 10 et 17 ans qu'à l'âge adulte chez la femme tandis que l'opposé est observé chez l'homme [20]. Après 45 ans, les taux en carnitine libre et totale sont à nouveau les mêmes dans les deux sexes. Ainsi il existe probablement une régulation des concentrations plasmatiques de carnitine par les hormones sexuelles [85] [86].

- **La grossesse :**

Les taux plasmatiques de carnitine baissent significativement jusqu'à l'accouchement. Cette diminution est liée à une nette diminution du taux de carnitine libre alors que celui des acylcarnitines n'est que très peu modifié [87].

- **Les apports alimentaires :**

Il existe une relation significative entre les apports alimentaires et les concentrations sanguines en carnitine. Un régime végétarien abaisse les taux de 10 à 15%. De même, après vingt et un jours de nutrition entérale sans carnitine, les taux de CL et CT diminuent respectivement de 31,7 et 44,2 µM à 21,8 et 29,5µM respectivement [88]. De plus, indépendamment des apports de carnitine, la composition du régime peut influencer ces concentrations. En 1987, Cederblad [89] étudiant l'effet d'un régime riche en graisses ou en sucres présentant la même teneur en carnitine, observe une élévation des acylcarnitines quel que soit le régime, et une augmentation de la carnitine libre lors de régime riche en graisses. Toutefois, aucune différence significative entre les taux plasmatiques dosés à jeun ou en postprandial n'a été démontrée [72].

VIII.2 - CONCENTRATIONS TISSULAIRES

Les données concernant les taux tissulaires de carnitine chez le sujet sain sont plus rares (tableau 5). En effet, le prélèvement tissulaire est plus invasif et donc moins facilement pratiqué que le prélèvement sanguin (par exemple, pour les tissus hépatiques, les échantillons ont été obtenus le plus souvent en post-mortem ou chez des patients ayant des hépatopathies, ce qui peut affecter les concentrations en carnitine).

De plus, les valeurs tissulaires de carnitine libre et estérifiée rapportées dans la littérature sont difficiles à comparer, les bases de référence n'étant pas toujours les mêmes : poids sec, poids frais, protéines non collagéniques (NCP), ADN. Pour plus d'exactitude, il est préférable d'exprimer un même dosage dans plusieurs unités [79].

Les tissus les plus riches en carnitine sont le muscle squelettique, le myocarde, le foie et le cerveau. Les différences de concentration et de composition en carnitine dans le muscle, le foie et le cerveau sont relatives à l'âge des sujets et aux fonctions métaboliques des organes [90].

Tissu	Unité de référence	CT (μM)	CL (μM)	CE (μM)
Muscle	mmol/kg poids sec	$12,4 \pm 3,4$	$10,1 \pm 3,3$	$2,3 \pm 1,0$
	$\mu\text{mol/g}$ NCP	$19,1 \pm 5,9$	$15,6 \pm 5,6$	$3,5 \pm 1,6$
	mmol/g DNA	$4,9 \pm 1,6$	$4,0 \pm 1,5$	$0,9 \pm 0,4$
Foie	mmol/kg poids sec	$2,5 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,6$	$0,91 \pm 0,43$
	$\mu\text{mol/g}$ NCP	$5,0 \pm 1,4$	$3,3 \pm 1,1$	$1,77 \pm 0,77$
	mmol/g DNA	$0,252 \pm 0,076$	$0,164 \pm 0,059$	$0,088 \pm 0,038$
Cerveau	$\mu\text{mol/g}$ poids frais	$0,09 \pm 0,02$		

Tableau 5 : Concentrations hépatiques, musculaires et cérébrales de carnitine
(d'après Harper [79] et Nakano [90])

VIII.2.1 - Valeurs normales

- Concentrations musculaires :

Quelle que soit l'unité de mesure choisie, le rapport entre les différentes formes reste le même. Dans le muscle, la fraction de CL représente $81 \pm 10\%$ de la CT, ce qui est sensiblement identique à ce qui est observé dans le plasma.

- Concentrations hépatiques :

Dans le foie, la fraction de CL représente $65 \pm 11\%$ de la CT.

- Concentrations cérébrales :

Le ratio CE/CL est proche de 1 dans le cerveau : la proportion des acylcarnitines y est donc importante [90], alors que la concentration en carnitine totale du cerveau est très basse chez l'adulte.

VIII.2.2 - Variations physiologiques :

- L'âge :

Il existe des différences dans l'évolution des concentrations de carnitine au cours du développement humain en ce qui concerne le muscle squelettique, le foie et le cerveau. Dans le muscle, on observe une augmentation graduelle avec l'âge, pendant la période pré et postnatale, proportionnelle au volume et à la maturation de la fibre musculaire (taux adulte : $2,15 \pm 0,52 \mu\text{mol/g}$ poids frais) [90]. A l'inverse, chez l'adulte, les taux musculaires de CL et CT diminuent avec l'âge jusqu'à atteindre des valeurs très abaissées chez le sujet âgé [84]. Les taux hépatiques et cérébraux varient très peu au cours de la vie. Les concentrations adultes sont atteintes dès 1 an.

Dans le cerveau, la proportion des acylcarnitines est importante. Le ratio CE/CL est de 0,5 avant terme et de 1 en période postnatale. La tendance est différente pour le muscle squelettique et dans le foie. Dans le muscle, le ratio est de 1 avant terme et de 0,25 chez l'adulte et dans le foie de 1/4 à 1/5 quel que soit l'âge.

- Le sexe :

Les concentrations tissulaires de carnitine ne sont pas différentes entre les hommes et les femmes

- Les apports alimentaires :

Les taux tissulaires ne sont pas modifiés de façon significative par les apports alimentaires [19].

VIII.3 - CONCENTRATIONS URINAIRES :

VIII.3.1 - Valeurs normales :

L'urine est la principale voie d'excrétion de la carnitine où elle est éliminée sous forme libre et acylée. Des variations importantes étant constatées avec le régime alimentaire et l'activité physique, l'excrétion urinaire quotidienne pour un adulte varie alors de 100 à 300 μmol [21]. La forte réabsorption tubulaire de la carnitine libre conduit à l'excrétion préférentielle de la forme estérifiée. En effet, la carnitine urinaire est composée à 46% de CL, et à 54% d'acétylcarnitines et d'acylcarnitines à chaîne courte et moyenne.

VIII.3.2 - Variations physiologiques :

- L'âge :

Age	N	CT	CL	CE	CE/CL
6 mois – 2 ans	15	146.6 \pm 91.3	35.8 \pm 22.6	110.8 \pm 69.3	3.2 \pm 0.4
3 – 5 ans	19	158.0 \pm 68.6	68.5 \pm 42.4	104.5 \pm 39.4	1.9 \pm 0.77
6 – 10 ans	16	175.5 \pm 70.1	70.6 \pm 33.5	126.8 \pm 40.4	2.6 \pm 0.8
20 – 35 ans	18	204.8 \pm 66.0	75.0 \pm 38.6	144.8 \pm 35.1	2.7 \pm 0.7

Tableau 6: Taux urinaires de carnitine en fonction de l'âge
(d'après Güneral [81])

L'excrétion urinaire de carnitine augmente avec l'âge. Les acylcarnitines et le ratio CE/CL diminuent jusqu'à l'âge de 5 ans pour ensuite réaugmenter avec l'âge. L'équilibre entre le métabolisme et l'excrétion est donc atteint seulement après l'âge de 5 ans et rend, de ce fait, difficile l'établissement de valeurs de référence chez l'enfant. Cette variation de l'excrétion urinaire avec l'âge s'expliquerait par une différence de masse musculaire, de fonctionnement rénal et de synthèse endogène.

- Le sexe :

Les valeurs observées chez la femme sont plus faibles que celles de l'homme [34].

- Les apports alimentaires :

Comme nous l'avons vu auparavant, la teneur en carnitine du régime alimentaire influence fortement le taux d'excrétion urinaire. De même, un régime riche en graisses s'accompagne d'une augmentation des acylcarnitines et de la CL dans l'urine [89].

IX - VARIATIONS PATHOLOGIQUES DES TAUX DE CARNITINE

Les variations pathologiques des taux consistent surtout en des déficits en carnitine. En effet, l'augmentation des taux de carnitine au-delà des valeurs physiologiques, ne semble pas avoir de conséquences cliniques (des hypercarnitinémies sont surtout observées lors de traitements substitutifs par de la L-carnitine chez les patients déficitaires).

IX.1 - LES DEFICITS EN CARNITINE

Deux types de déficit en carnitine sont reconnus :

- Déficits primaires affectant le transport membranaire de la carnitine ;
- Déficits secondaires associés à des situations pathologiques très diverses

Selon le type de déficit, les concentrations sériques, musculaires et urinaires varient.

IX.1.1 - Déficits primaires en carnitine

Il en existe deux types :

- **Déficit primaire systémique**

Le déficit primaire en carnitine correspond à un défaut génétique (mutation en 5q33.1 de transmission autosomique récessive) touchant la protéine OCTN2 [91] [92], intervenant dans le transport de la carnitine à travers les membranes des cellules tissulaires. De nombreux tissus (muscle, cœur, rein, fibroblastes) sont concernés par ce déficit de transport ; seul le foie est épargné. Il exprime un système de transport particulier favorisant l'influx. Les taux de carnitine sont effondrés dans le sérum (10 à 40% du taux normal), dans le muscle (10 à 25% du taux normal) et augmentés dans l'urine. Les signes cliniques sont donc variés : neurologiques (encéphalopathie, coma hypocétosique et hypoglycémique, crises convulsives), musculaires (myopathie, fatigue progressive des muscles proximaux, amyotrophie), cardiaques (cardiomyopathie sévère avec surcharge lipidique). Des signes cliniques hépatiques sont également observés (hépatomégalie, insuffisance hépato-cellulaire, hypoglycémie sans cétose, stéatose, hyperammoniémie, transaminases élevées), malgré l'absence de déficit en protéine OCTN2 dans cet organe. Cette pathologie rare apparaît dans la petite enfance. Ces manifestations aiguës apparaissent le plus souvent au cours de maladies

infectieuses ou au cours d'un jeûne (où le catabolisme est augmenté) et peuvent conduire à un tableau clinique semblable au syndrome de Reye ou à la mort subite du nourrisson. Le traitement de ce déficit primaire consiste à administrer des doses massives de L-Carnitine, ce qui permet de forcer le transport passif de la carnitine à travers la membrane cellulaire.

- **Déficit primaire myopathique**

Ici, seul le système de transport musculaire de la carnitine est affecté. Les manifestations cliniques sont bien sûr essentiellement musculaires (une cardiomyopathie est cependant possible) et consistent en une fatigabilité et une faiblesse progressives des muscles, pouvant aussi atteindre les muscles respiratoires, ainsi qu'une myopathie avec surcharge lipidique.

Seuls les taux musculaires de carnitine sont effondrés (5 à 25% de la normale), avec une élévation des enzymes musculaires (CPK et al.dolases). Sur les biopsies musculaires des inclusions de gouttelettes lipidiques au niveau des fibres de type I et des altérations de la membrane mitochondriale sont observées.

IX.1.2 - Déficits secondaires en carnitine

Les déficits secondaires en carnitine sont nettement plus répandus que les déficits primaires. Ils peuvent résulter d'un défaut de biosynthèse ou être associés à de nombreuses situations pathologiques acquises ou iatrogènes provoquant indirectement une déplétion des stocks sériques ou tissulaires en carnitine. C'est le cas notamment de l'hémodialyse qui entraîne la fuite non sélective de toutes les fractions de carnitine, et que nous étudierons dans la quatrième partie de cet exposé.

Les principales étiologies susceptibles de provoquer un déficit secondaire en carnitine sont évoquées dans le tableau suivant (tableau 7)[93].

Déficits secondaires dans les maladies métaboliques d'origine génétique

- **Accumulation d'acyl-CoA provoquant un excès d'estérification de la carnitine**
 - Déficit en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne longue (LCAD)
 - Déficit en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne moyenne (MCAD)
 - Déficit en déshydrogénase des acyl-CoA à chaîne courte (SCAD)
 - Aciduries organiques
 - Déficit multiple en déshydrogénases
 - Déficiences de la chaîne respiratoire (complexe I en particulier)
- **Défaut de synthèse**
 - Déficit en 5,10 MTHFR
 - Déficit en ornithine transcarbamylase
- **Augmentation des pertes rénales dues au rôle détoxifiant de la carnitine**
 - Cystinose
 - Syndrome de Lowe
 - Déficit en complexe de la chaîne respiratoire (cytochrome C oxydase)

Déficits secondaires à une pathologie acquise

- **Défauts d'apport**
 - Régime végétarien
 - Nutrition parentérale prolongée
 - Malabsorption
 - Lait infantile à base de soja
 - Carence en folates et en vitamine B12
- **Défauts de synthèse**
 - Cirrhoses et autres atteintes hépatiques
 - Insuffisance rénale chronique
 - Nouveaux-nés prématurés
- **Diminution des stocks tissulaires**
 - Grossesse
 - Prématurité
 - Retard de croissance intra-utérin
 - Enfant né d'une mère déficiente en carnitine
- **Augmentation des pertes rénales**
 - Syndrome de Fanconi
 - Tubulopathies acquises

Causes iatrogènes

- **Augmentation des pertes**
 - Traitement par Cisplatine
 - Hémodialyse chronique
- **Défaut d'apport**
 - Régime des enfants phénylcétonuriques
- **Augmentation de l'élimination rénale de la forme estérifiée**
 - Traitement par valproate ou autres principes actifs (pivampicilline, pivmécillinam, céphalosporines, pyriméthamine, sulfadiazine, acide benzoïque)

Tableau 7 : Les principales causes de déficit secondaire en carnitine

(d'après Méas [93])

IX.2 - DOSAGES NECESSAIRES AU DIAGNOSTIC

Il est donc intéressant de déterminer les concentrations sanguines en carnitine lorsqu'un déficit est suspecté. Dans ce cas, les taux de CT mais aussi la proportion de CL et CE sont indispensables à prendre en compte. **Un taux de CT plasmatique inférieur à 20 μ M et/ou un ratio CE/CL supérieur à 0,4 sont pathologiques [21].**

Cependant, les concentrations plasmatiques de carnitine ne reflètent pas nécessairement les concentrations musculaires de carnitine. A titre d'exemple, dans certaines myopathies, et dans l'insuffisance rénale, les concentrations musculaires de carnitine peuvent être abaissées alors que les taux sériques sont conservés.

Afin de diagnostiquer correctement une éventuelle pathologie touchant la carnitine, quelques règles doivent être appliquées :

- Il est nécessaire de considérer l'âge et le sexe du sujet pour une bonne interprétation des taux sériques [20].
- L'excrétion rénale quotidienne doit être interprétée en fonction de l'âge (ou du poids) et de la concentration plasmatique de ce composé.
- Il est recommandé, lors de dosage tissulaire, d'exprimer le résultat dans plusieurs systèmes d'unités [79].

DEUXIÈME PARTIE :
LA CARNITINE CHEZ L'HÉMODIALYSÉ

I - L'HEMODIALYSE

I.1 - DEFINITIONS - EPIDEMIOLOGIE

L'hémodialyse périodique est un mode d'épuration extra-rénale (EER) dont le but est de suppléer à l'insuffisance rénale terminale (IRT). Depuis l'invention de la méthode en 1960, des progrès considérables ont été réalisés concernant aussi bien la technologie de l'EER que la compréhension des complications de l'urémie chronique.

I.1.1 - Incidence de l'insuffisance rénale terminale (IRT)

Le nombre de nouveaux patients atteignant chaque année le stade d'IRT varie considérablement d'un pays à l'autre [94]. Les statistiques portant sur l'année 1999 indiquent une incidence annuelle de patients atteints d'IRT requérant une hémodialyse périodique considérablement plus élevée aux USA (315 par million de population (pmp)) et au Japon (236 pmp) qu'en Europe et, notamment, en France où elle est de 105 pmp.

L'IRT est deux fois plus fréquente chez l'homme que chez la femme et sa fréquence augmente considérablement avec l'âge : elle est 6 à 10 fois plus élevée chez les sujets âgés de plus de 75 ans que chez ceux de moins de 40 ans.

I.1.2 - Evolution de l'épidémiologie de l'IRT

L'épidémiologie de l'IRT s'est modifiée au cours des dernières années, indiquant une augmentation exponentielle du nombre de patients traités par hémodialyse dans le monde [64].

Entre 1960 et 1970, l'hémodialyse de suppléance était réservée aux adultes jeunes sans complications extra-rénales sévères et ayant une probabilité élevée de bénéficier d'une réhabilitation suffisante. Actuellement, dans la plupart des pays industrialisés, il n'existe aucune limitation à l'accès au traitement de suppléance fondée sur le type de néphropathie, l'âge, le sexe, les conditions socio-économiques ou la pathologie associée. Il en résulte une augmentation continue de l'âge moyen des patients abordant la dialyse de suppléance. L'IRT est près de 30 fois plus élevée dans la tranche de 45 à 65 ans que dans celle de 0 à 20 ans. L'âge moyen des patients au début de l'hémodialyse a augmenté de plus de 15 ans au cours des deux dernières décennies dans tous les pays occidentaux. En France, il est passé de 47 ans

en 1977 à 66 ans en 2002, et la proportion de patients âgés de 65 ans ou plus au début des hémodialyses est passée de 9% à 54% au cours de la même période.

L'augmentation de l'incidence annuelle de l'IRT dans les pays industrialisés est particulièrement marquée aux USA et au Japon, où elle atteint en moyenne 7% par an, tandis qu'elle est de l'ordre de 5% en Europe. Cette augmentation continue s'explique en majeure partie par le vieillissement de la population dans tous les pays occidentaux, où l'espérance de vie s'allonge d'environ 2 mois chaque année, et par l'expansion du diabète de type 2 dans ces mêmes pays. En effet, la fréquence de l'HTA et des néphropathies vasculaires augmente avec l'âge, et l'amélioration de la longévité des diabétiques permet à un nombre croissant d'entre eux de développer une atteinte rénale.

La part prise par les néphropathies diabétiques parmi les causes d'IRT a considérablement augmenté au cours des dernières années. Elle dépasse aujourd'hui 45% aux USA et 40% au Japon et dans les pays du Nord de l'Europe. Elle atteint 20 à 40%, selon les régions, en France. Les néphropathies vasculaires suivent une évolution analogue.

Au total, l'augmentation d'incidence de l'IRT porte de manière prédominante sur les sujets âgés et sur les patients atteints de néphropathie vasculaire ou diabétique. Or, ces patients ont une co-morbidité élevée et leur prise en charge thérapeutique est particulièrement lourde.

I.2 - CAUSES ET CONSEQUENCES DE L'UREMIE CHRONIQUE

L'insuffisance rénale chronique (IRC), ou urémie chronique, est la conséquence de la perte progressive de la fonction rénale [12]. Elle résulte de la destruction irréversible du parenchyme rénal au cours de maladies très diverses affectant les reins ou les voies excrétrices. Elle se traduit par un ensemble d'altérations biologiques et de troubles cliniques décrits sous le terme d'urémie chronique.

Les altérations biochimiques sanguines apparaissent précocement au cours de l'évolution de l'insuffisance rénale chronique et s'aggravent progressivement au fur et à mesure de la réduction de la masse des néphrons sains résiduels (chaque rein possède environ 1 million de néphrons). En revanche, les manifestations cliniques de la toxicité urémique apparaissent tardivement, au stade avancé de l'insuffisance rénale, c'est-à-dire lorsque le débit de filtration glomérulaire (DFG) s'abaisse au dessous de 10 ml/min, soit à un niveau 10 fois inférieur à la normale.

Tant que le nombre de néphrons fonctionnels reste supérieur à 10% de leur capital initial, le maintien de l'homéostasie reste possible. En effet, les néphrons sains résiduels

s'hypertrophient et accroissent leur capacité de travail, ce qui permet de maintenir pendant très longtemps l'excrétion des « substances déchets » et l'équilibre hydro-électrolytique de l'organisme. Cette adaptation se fait par augmentation de la filtration glomérulaire individuelle des néphrons sains restants et par diminution de leur réabsorption tubulaire.

Au-dessous de ce seuil de 10%, défini comme l'IRT, le maintien de l'homéostasie n'est plus possible et le traitement de suppléance par dialyse ou transplantation devient nécessaire. Il est cependant à noter qu'une insuffisance rénale ne se développe que si les deux reins sont touchés par le processus pathologique, car un seul rein sain est capable d'assurer l'ensemble des fonctions rénales.

I.2.1 - Causes de l'insuffisance rénale

Les maladies conduisant à l'IRC sont variées (figure 6). Les unes sont primitives, affectant uniquement les reins, les autres sont secondaires à des maladies touchant l'ensemble de l'organisme, telles que le diabète ou les maladies systémiques. Le rythme de leur progression vers l'IRT est également très variable d'un cas à l'autre.

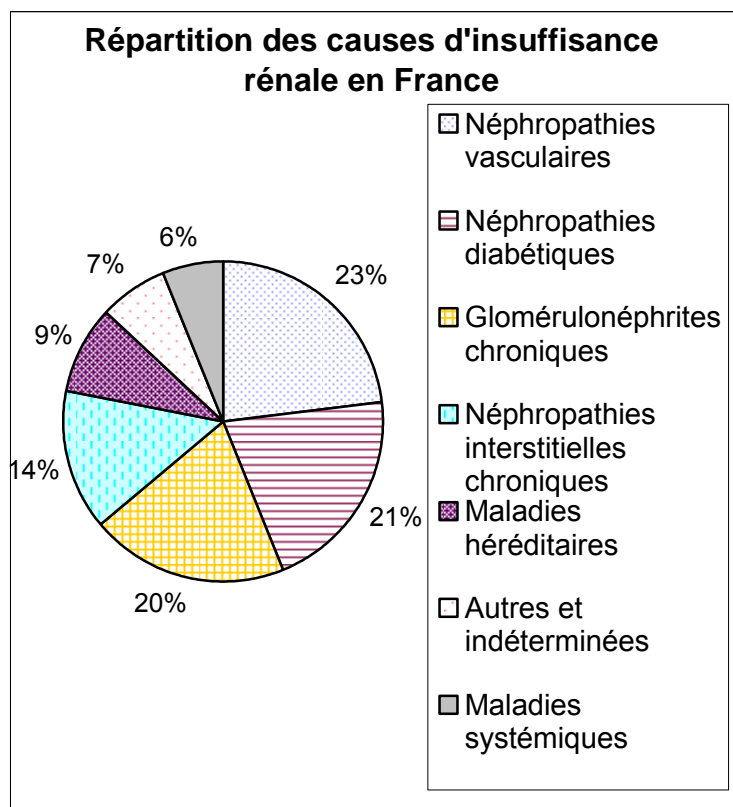


Figure 6: Répartition des causes d'insuffisance rénale en France
(d'après Jungers [95])

Les néphropathies primitives représentent environ 50% du total (les plus courantes sont les glomérulonéphrites (20%), puis viennent les néphrites interstitielles chroniques (14%), et la néphroangiosclérose commune (23%).

Parmi les maladies héréditaires (9%), la plus fréquente est la maladie polykystique rénale, les autres types de maladie héréditaire touchant les reins sont plus rares.

Les néphropathies diabétiques sont une cause d'IRC de plus en plus fréquente en France comme dans les autres pays européens. Actuellement, elles représentent plus de 20% des causes d'IRT en France.

Les maladies systémiques comptent également pour une part croissante dans les causes d'IRC (6%), qu'il s'agisse du lupus érythémateux disséminé, de l'amylose, des vascularites, ou d'hémopathies malignes telles que le myélome multiple.

I.2.2 - Conséquences de l'insuffisance rénale

Une bonne connaissance des conséquences de la perte des fonctions rénales est nécessaire pour comprendre comment agit la dialyse de suppléance et quelles sont ses possibilités et ses limites.

Les reins normaux assurent trois fonctions principales :

- excrétion des produits de déchet du métabolisme azoté,
- régulation du bilan hydrique et électrolytique,
- fonctions endocrines.

L'insuffisance rénale entraîne donc des anomalies dans ces trois domaines.

Les principales conséquences cliniques et biologiques sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 8)

Conséquences biologiques	Conséquences cliniques
<p>Rétention azotée : (Urée, créatinine, acide urique, toxines urémiques)</p> <p>Déficit d'érythropoïétine</p> <p>Troubles phosphocalciques : (Hypocalcémie, hyperphosphorémie hyperparathyroïdie secondaire)</p> <p>Acidose métabolique</p> <p>Dyslipidémie</p> <p>Hyperfibrinémie</p> <p>Hyperhomocystéinémie</p> <p>État inflammatoire chronique</p>	<p>Hypertension artérielle</p> <p>Athérome accéléré</p> <p>Cardiomyopathies, HVG</p> <p>Artériosclérose</p> <p>Calcifications artérielles et valvulaires</p> <p>Ostéodystrophie rénale</p> <p>Amylose à α2-microglobuline</p> <p>Anémie</p> <p>Malnutrition</p> <p>Troubles endocriniens</p> <p>Altération de la qualité de vie</p>

Tableau 8 : Conséquences cliniques et biologiques de l'IRC.

▪ **Accumulation des produits de déchet de faible poids moléculaire**

Les reins sont la voie principale d'élimination de l'urée et des autres composés azotés résultant du catabolisme protéique. A niveau identique d'apport en protéines, le sujet urémique produit et excrète chaque jour la même quantité d'urée que les sujets ayant une fonction rénale normale, mais au prix d'une élévation de sa concentration plasmatique, en proportion inverse du nombre de néphrons restants (un patient ayant une fonction rénale réduite au 1/5ème de la normale élimine la même quantité d'urée par jour qu'un sujet à fonction rénale normale, mais au prix d'un taux d'urée sanguine 5 fois plus élevé). Ainsi la concentration sanguine de l'urée reflète ainsi le degré de l'insuffisance rénale.

L'urée (PM=60 Da) est quantitativement le plus abondant des produits de déchet azotés. Sa production dépend directement de l'apport protidique. Tant que sa teneur dans le sang reste inférieure à 50 mM (soit 3 g/L), il ne se produit aucune manifestation clinique. Au-delà de cette limite apparaissent une anorexie, des nausées, puis des vomissements, ainsi qu'une somnolence et un ralentissement des fonctions intellectuelles.

La créatinine (PM=113 Da) et l'acide urique (PM=168 Da) s'accumulent dans le sang en proportion inverse du débit de filtration glomérulaire (DFG) mais n'exercent aucune toxicité directe. Toutefois, l'accumulation de l'acide urique peut provoquer des crises de goutte.

La créatinine étant éliminée de manière quasi exclusive par filtration glomérulaire, la mesure de la capacité d'épuration des reins pour cette molécule, ou clairance de la créatinine, fournit une estimation du débit de filtration glomérulaire, index global de la fonction rénale. Le taux sanguin de créatinine est l'index usuel le plus simple permettant d'évaluer le degré de l'insuffisance rénale.

▪ **Accumulation des toxines de poids moléculaire moyen**

Des substances de poids moléculaire compris entre 150 et 12000 Da s'accumulent également chez l'urémique. Certaines de ces substances sont des hormones ou des peptides, d'autres sont des composés organiques. Au total plus de 80 molécules ont été incriminées comme « toxines urémiques ». Le syndrome de toxicité urémique est, de ce fait, multifactoriel. Aucune manifestation clinique ne peut être attribuée à une molécule spécifique, mais ces toxines urémiques exercent des effets délétères sur de multiples fonctions de l'organisme ; elles entraînent notamment tendance au saignement, anorexie, nausées, somnolence, altération des fonctions intellectuelles, polynévrite, destruction des hématies et athérome accéléré. Elles provoquent souvent aussi une diminution de la liaison des médicaments aux protéines, augmentant leur fraction libre pharmacologiquement active.

Les caractéristiques d'épuration des différentes toxines urémiques diffèrent considérablement en fonction de leur poids moléculaire. Plus celui-ci est élevé, plus la diffusion hors du compartiment intracellulaire vers le compartiment extracellulaire et leur passage à travers les membranes de dialyse sont lents. Ces faits ont d'importantes conséquences en ce qui concerne le traitement dialytique. Les principales molécules identifiées participant à la toxicité urémique sont indiquées dans le tableau 9.

Molécules de faible PM (aisément diffusibles)
Myoinositol Xanthines Oxalate Acide urique
Moyennes molécules (peu diffusibles)
Peptides Parathormone α 2-microglobuline
Molécules de faible PM se comportant comme des moyennes molécules (du fait d'une forte liaison protéique, les rendant peu diffusibles)
Méthylguanidine, acide guanidinosuccinique Sulfate d'indoxyle Acide hippurique Polyamines Phénols, indoles, chloramines Diméthylarginine asymétrique Acide carboxyméthylpropionylfuranpropionique Nitrosothiols Homocystéine

Tableau 9 : Principales toxines urémiques

- **Perte des fonctions de régulation hydro-électrolytique**

Tant que le nombre de néphrons sains reste supérieur à 10%, les reins restent capables de préserver le bilan hydrique et électrolytique de l'organisme en diminuant la réabsorption tubulaire d'eau, de sodium, de potassium et de phosphore provenant chaque jour de l'alimentation et du métabolisme intermédiaire. Cependant, en dessous de ce seuil de 10% (défini comme l'IRT), cette adaptation n'est plus possible et seul le traitement de substitution peut assurer la survie du patient.

- **Pertes des fonctions endocrines**

Les reins normaux produisent l'érythropoïétine (EPO), hormone qui stimule la production des globules rouges, et la 1α -hydroxylase, enzyme nécessaire à la formation du calcitriol, forme

active de la vitamine D3 qui régit l'absorption du calcium. La production de ces deux hormones est très diminuée chez les patients au stade d'IRT, expliquant l'anémie et les troubles du bilan calcique observés. En revanche, l'activité de l'axe rénine-angiotensine est souvent exagérée chez les urémiques : la rénine est produite en excès, augmentant ainsi la production d'angiotensine II, dont l'effet vasoconstricteur puissant contribue à l'hypertension artérielle qui accompagne très fréquemment l'insuffisance rénale chronique.

Ces anomalies des fonctions endocrines des reins surviennent dès le stade débutant de l'insuffisance rénale et se majorent au fur et à mesure de sa progression.

L'hémodialyse, processus purement physique, peut suppléer à la perte de l'excrétion des produits de déchet et de la régulation du bilan hydrique et électrolytique. En revanche, les troubles endocriniens et métaboliques qui résultent de la perte de la masse rénale active ne peuvent être corrigés par la dialyse elle-même. Heureusement ils peuvent être aujourd'hui en grande partie palliés par des médicaments spécifiques qui ont considérablement amélioré les possibilités de traitement.

I.3 - LA DIALYSE

La dialyse est une méthode d'échange entre deux solutions, le sang du malade et un liquide appelé dialysat (de composition proche de celle du plasma normal) au travers d'une membrane semi-perméable. Cet échange permet l'extraction des produits de déchet azotés et des autres toxines urémiques, ainsi que l'ajustement de la concentration en électrolytes du plasma à celle du bain de dialyse [94].

Deux modalités de dialyse sont possibles selon la nature de la membrane servant aux échanges. L'hémodialyse, ou dialyse extracorporelle, utilise une membrane artificielle, tandis que la dialyse péritonéale, ou dialyse intracorporelle, utilise comme membrane le propre péritoine du patient. Ces deux méthodes, bien que différant par leur technologie, ont une efficacité comparable.

I.3.1 - Principes physico-chimiques de l'hémodialyse périodique

Deux mécanismes sont impliqués dans la dialyse : la diffusion et l'ultrafiltration (figures 7 et 8)

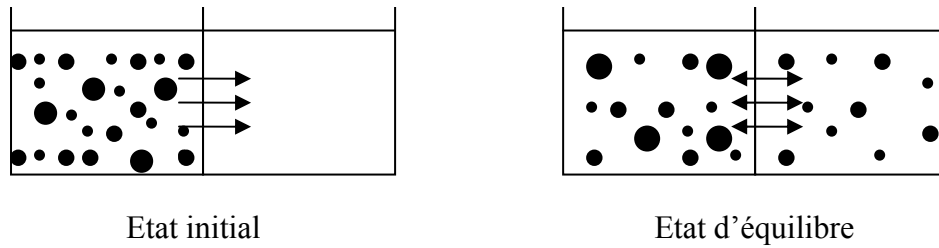


Figure 7 : Principe de diffusion (Force motrice = différence de concentration) : transfert de solutés

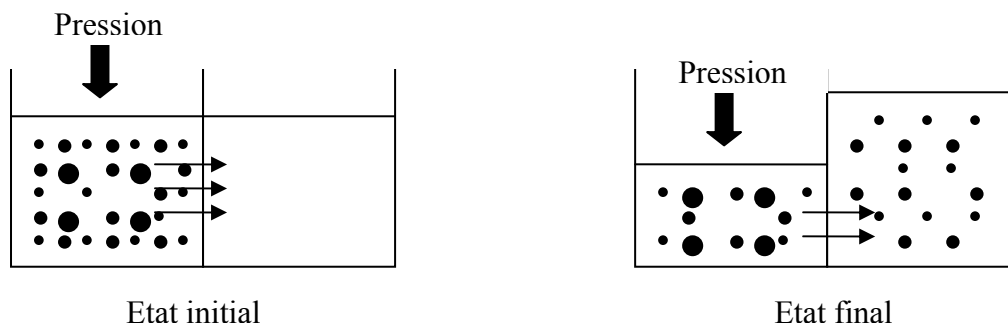


Figure 8 : Principe d'ultrafiltration (Force motrice = différence de pression) : transfert simultané d'eau et de solutés

▪ **La diffusion (ou conduction) :**

La diffusion est un transfert passif de solutés du sang vers le dialysat au travers de la membrane de dialyse, sans passage de solvant. C'est le mécanisme principal de l'hémodialyse. Le gradient de concentration de soluté de part et d'autre de la membrane détermine la quantité de molécules diffusant. Leur vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire. La clairance des solutés de faible poids moléculaire (<300 Da) dépend essentiellement du débit sanguin, habituellement voisin de 300 mL/min, tandis que celle des solutés de poids moléculaire plus élevé dépend surtout de la perméabilité de la membrane et de la durée de la dialyse. Il en résulte un transfert diffusif beaucoup plus efficace pour des solutés de faible poids moléculaire que pour des molécules moyennes.

▪ **L'ultrafiltration (ou convection):**

Le transfert par convection est un transfert simultané du solvant et d'une fraction des solutés qu'il contient. Il est dépendant du gradient de pression transmembranaire, lequel est la résultante arithmétique de la pression sanguine positive et d'une pression négative dans le

dialysat. La sortie de l'eau du plasma est d'autant plus rapide que la pression transmembranaire efficace est plus élevée et que la perméabilité hydraulique (dépendant de la nature physico-chimique de la membrane) est elle-même plus élevée. Elle vise à éliminer au cours d'une séance de dialyse la quantité de liquide accumulée entre deux séances de dialyse. Habituellement, celle-ci correspond à une prise de poids de 2 à 3 kg.

L'importance relative de la diffusion et de l'ultrafiltration en hémodialyse varie selon le poids moléculaire des solutés : la diffusion est prépondérante dans le transfert des solutés de faible poids moléculaire, tandis que le transfert par ultrafiltration augmente pour les solutés de poids moléculaire plus élevé. En pratique, les effets de la diffusion et de l'ultrafiltration s'additionnent au cours de l'hémodialyse.

▪ **L'adsorption :**

Les protéines telles que l'albumine, la fibrine, la α 2-microglobuline, les fragments de complément activés et les cytokines telles que L'IL 1 et le TNF α peuvent, dans une certaine mesure, être adsorbés sur la membrane de dialyse. Ce mécanisme, plus ou moins important selon les membranes, contribue à leur extraction du sang. L'adsorption est une propriété exclusive des membranes hydrophobes.

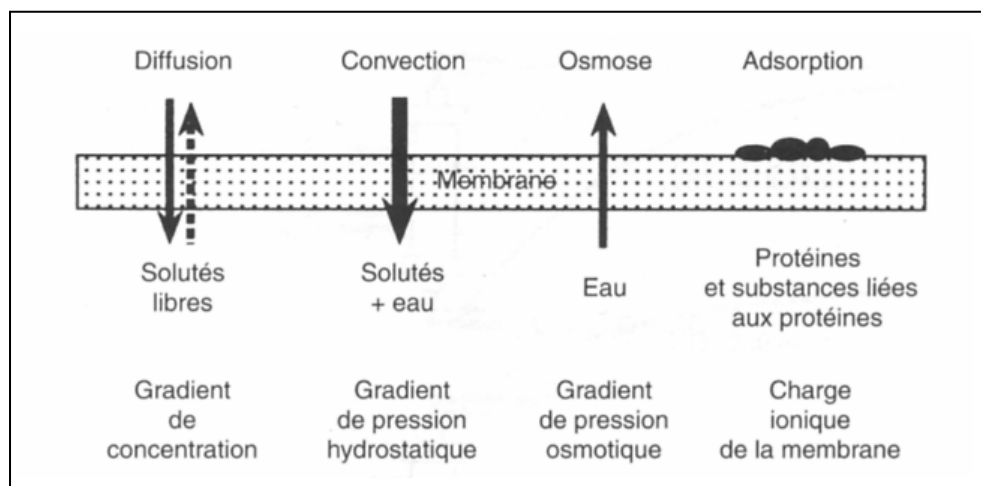


Figure 9 : Mécanismes concourant au transfert et à l'extraction de l'eau et des solutés en hémodialyse

(d'après Jungers [95])

▪ **Modalités du transfert des solutés**

Il existe actuellement plusieurs systèmes d'hémodialyse, différant par la part respective que prennent la diffusion et la convection dans le transfert des solutés.

Dans l'hémodialyse proprement dite (cas le plus fréquent), l'extraction des produits de déchet se fait principalement par diffusion, l'ultrafiltration assurant l'élimination de l'eau et du sodium accumulés entre deux dialyses.

Dans l'hémofiltration, seule l'ultrafiltration assure le transport des solutés. Pour un rendement efficace d'extraction des produits de déchet, le débit d'ultrafiltration doit être très élevé, dépassant 10 litres par heure. Cette sortie d'eau et d'électrolytes doit absolument être compensée par une perfusion sanguine de solution isotonique stérile et apyrogène à un débit correspondant à l'ultrafiltration (diminué de la perte de poids souhaitée), soit 10 à 20 litres par heure.

L'hémodiafiltration associe les avantages de l'hémodialyse et de l'hémofiltration. En effet, elle combine la diffusion (pour une extraction élevée des substances de déchet de faible poids moléculaire) et l'ultrafiltration pour soustraire efficacement les toxines de poids moléculaire élevé. Le débit de réinjection est de 5 à 10 litres par heure.

I.3.2 - La technique

L'hémodialyse se réalise grâce à un circuit extracorporel du sang et du dialysat avec un échange dans un dialyseur ou « rein artificiel » (figure 10).

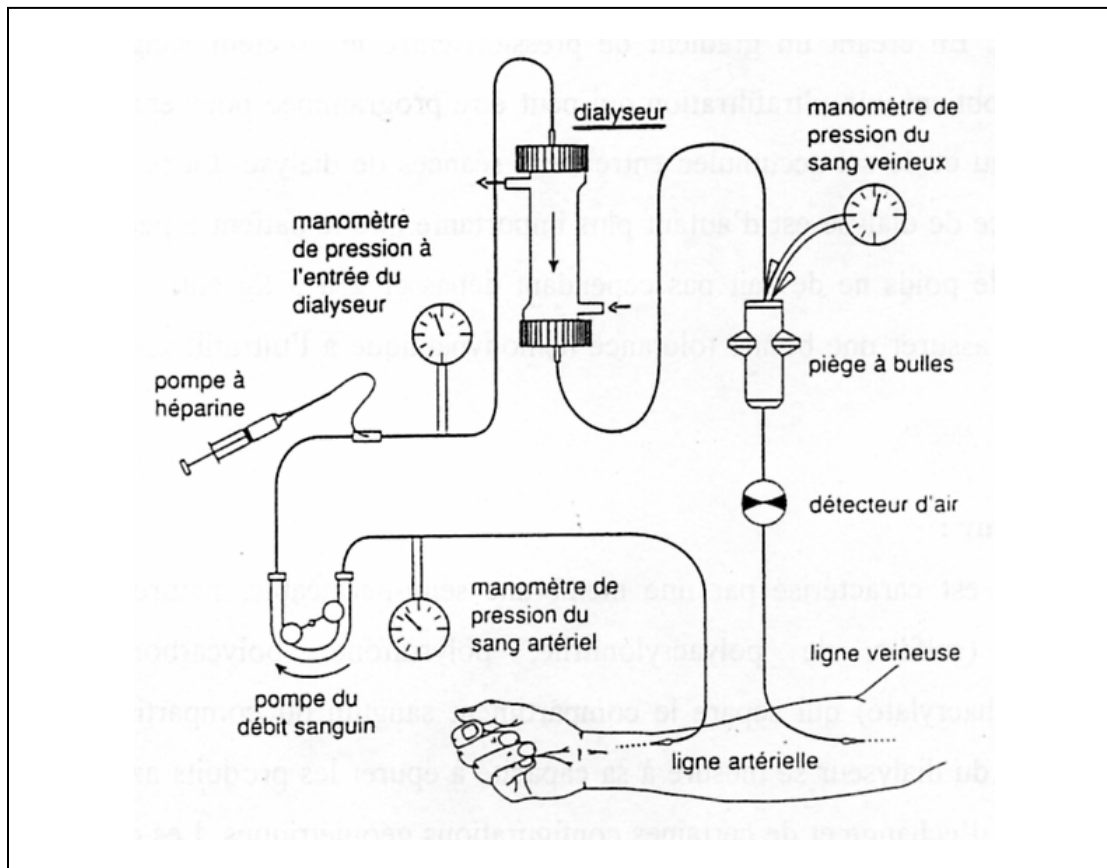


Figure 10 : Circuit du sang et du dialysat dans l'hémodialyse
(d'après Ang et Simon, 1996 [96])

▪ **Le circuit sanguin :**

Grâce à la ponction d'une fistule artériovoineuse ou à un autre type d'abord vasculaire, le sang est acheminé par un circuit extra-corporel jusqu'au dialyseur, aidé par une pompe aspirante qui assure le débit sanguin de 250 ml/min au minimum, mais qui peut monter à des valeurs de 350 à 400 ml/min si la qualité de l'abord vasculaire le permet. Le sang traverse ensuite le dialyseur selon un trajet inverse de celui du dialysat afin d'optimiser les échanges par gradient de concentration. Le retour du sang au malade s'effectue par un trajet qui comporte un piège à bulles permettant de prévenir tout risque d'accident par embolie gazeuse.

▪ **Le circuit du dialysat :**

Un générateur de bain de dialyse permet la production de dialysat dans des conditions définies de concentration, de température, de pression et de débit. Ce dialysat est une solution électrolytique à la composition proche de celle du liquide extracellulaire normal présentant cependant quelques variations dans le but de corriger certaines anomalies plasmatiques dues à l'urémie ou à la dialyse.

Il existe aujourd'hui deux types de solution de dialyse, selon que l'acétate ou le bicarbonate est employé comme tampon. Si l'acétate a longtemps été le seul tampon utilisé, il est aujourd'hui le plus souvent supplanté par le bicarbonate, car il procure une correction plus physiologique de l'acidose, et il améliore la tolérance hémodynamique de la dialyse.

A la sortie du générateur, le dialysat passe à l'intérieur du dialyseur où se réalise l'échange avec le sang. En créant un gradient de pression entre le secteur sanguin et le secteur dialysat, on obtient une ultrafiltration qui peut être programmée pour enlever au patient la quantité d'eau et de sel accumulée entre deux séances de dialyse. La prise de poids entre chaque séance de dialyse est d'autant plus importante que le patient a perdu toute diurèse. Cette prise de poids ne devrait cependant pas dépasser 2 à 3 kg entre chaque séance de dialyse pour assurer une bonne tolérance hémodynamique à l'ultrafiltration au cours de la séance.

▪ **Le dialyseur :**

Les deux principaux types de dialyseurs employés actuellement sont les dialyseurs en plaque et les dialyseurs à fibres creuses (figure 11). Stériles, apyrogènes, ils sont prêts à l'emploi et à usage unique.

Les dialyseurs en plaques sont composés d'un nombre variable de compartiments parallèles séparés par des structures de soutien rigides, de façon à réduire l'épaisseur du film sanguin et à favoriser les turbulences du bain de dialyse, augmentant ainsi les échanges.

Les dialyseurs à fibres creuses, ou dialyseurs capillaires consistent en la juxtaposition de 10000 à 15000 fibres creuses enchâssées de chaque côté dans un bloc de polyuréthane. Le sang circule à l'intérieur des fibres alors que le dialysat circule lui, à contre-courant dans leur intervalle. Ces dialyseurs capillaires sont actuellement les plus employés dans le monde. En effet, ce dispositif a le rapport surface/volume plus élevé, et le contenu sanguin est plus réduit que pour les dialyseurs en plaque.

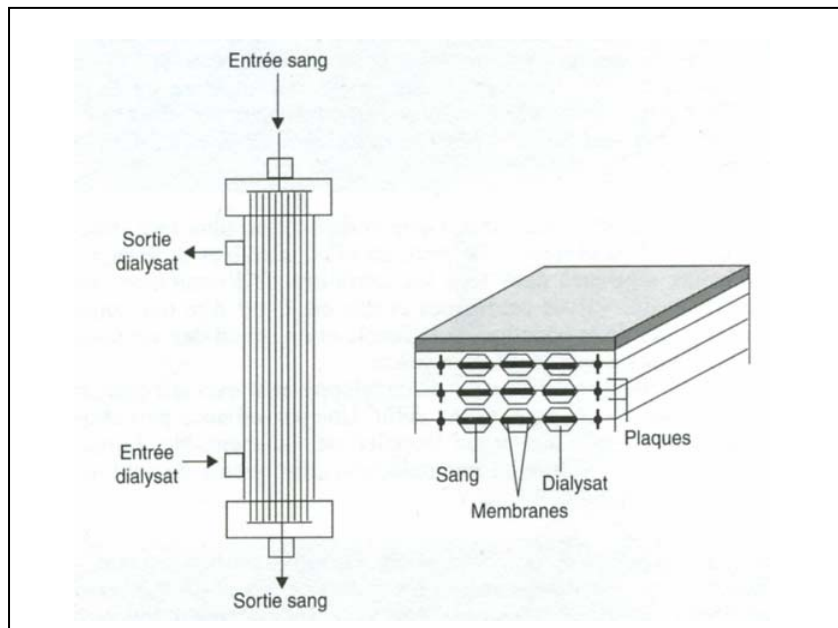


Figure 11 : Représentation schématique d'un dialyseur à fibres capillaires et d'un dialyseur en plaques

(d'après Jungers [95])

I.3.3 - Les membranes de dialyse

Les membranes les plus anciennes sont des polymères de cellulose. Elles peuvent être substituées (Hémophan® ou triacétate de cellulose) ou non (Cuprophane®). Toutes ces membranes sont hydrophiles.

Depuis, ont été créées des membranes de haute perméabilité, ayant une perméabilité à l'eau et aux solutés élevée. Certaines sont hydrophiles (polyétherpolycarbonate, éthylvinyl-alcool), d'autres sont hydrophobes (polysulfone, polyamide, polyméthylmétacrylate, polyacrylonitrile). Les membranes hydrophobes adsorbent les protéines à leur surface et sont dotées des perméabilités à l'eau et aux solutés les plus élevées.

Il existe également aujourd'hui de toutes nouvelles membranes de dialyse capables d'augmenter l'extraction des toxines urémiques et d'améliorer la biocompatibilité.

I.3.4 - Conduite d'un traitement par hémodialyse

L'hémodialyse est un traitement discontinu et périodique. Les séances se répètent trois fois par semaine (soit en moyenne 12 à 15 heures hebdomadaires). La durée d'une séance varie, le plus souvent entre 4 et 6 heures. Les séances les plus courtes devront être réservées aux patients jeunes qui ont une diurèse conservée et qui supportent des débits sanguins élevés

(350-400 ml/min). Au cours de la séance de dialyse, le débit sanguin est généralement compris entre 250 et 300 mL/min et celui du dialysat est de 500 mL/min.

L'efficacité de la dialyse est contrôlée à l'aide de la modélisation cinétique de l'urée, sachant qu'une extraction adéquate de l'urée est indispensable au bon résultat clinique à long terme du traitement.

La concentration sanguine de l'urée à la fin d'une séance (C_t) est reliée à sa concentration au début de la même séance (C_o) par la relation suivante :

$$C_t = C_o \times (e^{-Kt/V})$$

K = clairance de l'urée du dialyseur (caractérise la puissance d'épuration du dialyseur pour l'urée)

t = durée de la séance d'hémodialyse

V = volume de diffusion de l'urée = volume de l'eau totale du patient (soit environ 60% du poids post-dialytique chez l'homme et 55% chez la femme)

Cette équation peut être reformulée de la façon suivante :

$$Kt/V = \ln (C_o/C_t)$$

Ainsi Kt/V peut être calculé sans nécessairement connaître les valeurs de t , K , ni V .

L'efficacité d'extraction de l'urée peut être plus simplement encore exprimée par le pourcentage de réduction de l'urée (PRU) selon la relation suivante :

$$PRU = (C_o - C_t) / C_o$$

Une valeur de Kt/V de l'urée d'au moins 1,2 et une valeur de PRU d'au moins 0,65 (soit une réduction de l'urée sanguine d'au moins 65% au cours de la dialyse) signifie que l'épuration est adéquate et que la morbidité et la mortalité du patient sont réduites au minimum (la meilleure survie en dialyse ayant été obtenue avec des valeurs dépassant 1,4 [96]).

Il n'existe aucune limitation théorique à la durée de survie des patients traités par hémodialyse. En effet, les progrès technologiques et la surveillance médicale renforcée dont bénéficient ces patients évitent en grande partie les complications liées à l'urémie et leur offrent une espérance de vie pratiquement égale à celle des sujets de même âge sans maladie rénale. La mortalité annuelle globale, tous âges confondus, est inférieure à 8% en France

comme dans le reste de l'Europe et au Japon. Ce taux varie peu avec le temps, car les effets positifs de l'amélioration de la technologie contrebalancent en grande partie l'effet négatif dû à la proportion croissante de sujets acceptés en traitement. La mortalité rapportée aux USA est nettement plus élevée, de l'ordre de 20% par an. L'explication la plus plausible est l'abaissement de la durée de dialyse (9 heures/semaine contre 12 à 15 en France). En effet, une durée hebdomadaire de dialyse suffisante, en dépit de la contrainte qu'elle constitue, est seule garante d'un traitement efficace capable de limiter la survenue des complications de l'hémodialyse au long cours [94].

II - DEFICIT EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE

Böhmer et al. envisagent pour la première fois un déficit en carnitine chez un patient hémodialysé souffrant d'athérosclérose accélérée [3]. Chez l'insuffisant rénal non hémodialysé, il y a augmentation des taux sériques de carnitine. En revanche chez le patient hémodialysé, il est observé à chaque séance une diminution rapide de ces taux, due à la fuite de carnitine à travers les membranes de dialyse. De tels changements aboutissent à un remodelage important des différentes fractions. En effet, la CL est diminuée car elle n'est plus correctement réabsorbée par le tubule rénal ; les taux plasmatiques de CE augmentent proportionnellement à la baisse du DFG, et également à cause de l'excès de production de corps cétoniques observé chez ces patients. De plus, le ratio CE/CL augmente du fait de la mauvaise réabsorption tubulaire de la CL.

II.1 - ETUDE DES TAUX DE CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE

II.1.1 - Taux sériques

Différents auteurs ont mesuré les taux sériques de CT, CL et CE chez l'hémodialysé (tableau 10).

	Nombre de dialysés	CT (μM)	CL (μM)	CE (μM)	CE/CL	Références
PATIENT HEMODIALYSE	82	61 \pm 2	31 \pm 2	26,3	0,84	Golper et al.. (1990) [97]
	54	62,7 \pm 22,3	39,3 \pm 16,5	23,4 \pm 10,9	0,60	Rodriguez-Segade et al.. (1986) [98]
	31	60,2 \pm 19,9	32,4 \pm 12,8	27,7	0,85	Rössle et al.. (1986) [99]
	8	50,8	25,9 \pm 7,9	24,0	0,93	Lennon et al.. (1986) [100]
	113	50,6	36,2	20,5	0,57	Corsi (1986) [101]
	194	44,1 \pm 1,2	31,8 \pm 0,9	12,3	0,38	Chazot (1997) [102]
SUJET SAIN		41,4 – 61,5	33,4 – 52,2	5,7 – 17,7	0,19 – 0,41	Tableau 2 page 40

Tableau 10 : Concentrations plasmatiques en carnitine chez l'hémodialysé

Avec des valeurs situées chez le sujet sain entre 38 et 63 μM pour la CT et 30 à 55 μM pour la CL, les taux plasmatiques de CT chez l'hémodialysé sont le plus souvent dans les limites hautes de la normale alors que ceux de CL sont inférieurs ou dans les limites basses de la normale.

Chazot et al. (1997) [102] rapportent quelques patients présentant des taux très abaissés : 19% ont un taux de CT <30 μM et 25% un taux de CL <25 μM .

La différence entre les taux plasmatiques des patients sains et ceux des hémodialysés est plus marquée lorsque l'on considère la carnitine estérifiée (CE). Chez l'individu normal, la CE représente 25% de la CT ; chez l'hémodialysé, les valeurs rapportées sont supérieures. Le ratio CE/CL, normalement inférieur à 0,4, est fortement augmenté [103], avec une élévation des acylcarnitines à chaîne courte, ceux à chaîne longue restant dans les limites normales (tableau 11) [104].

Patients	CT (μM)	CL (μM)	ACCC (μM)	ACCL (μM)
Hémodialysés	48,3 \pm 9,5	28,7 \pm 5,4	13,8 \pm 4,5	5,8 \pm 1,9
Témoins	54,7 \pm 7,2	42,2 \pm 8,3	6,5 \pm 6,4	6,0 \pm 1,4

Tableau 11 : Concentrations plasmatiques en carnitine et acylcarnitines chez l'hémodialysé (d'après Hiatt [104])

(ACCC = Acylcarnitines à chaîne courte – ACCL = Acylcarnitines à chaîne longue)

Les anomalies du métabolisme de la carnitine chez l'hémodialysé ne sont donc pas uniquement dues à un déficit en CL. En effet la CT est le plus souvent normale ou élevée, la CL diminuée, et la CE augmentée de façon marquée. On observe, de ce fait, une augmentation significative du ratio CE/CL [105] [106].

Remarque :

La carnitine a été étudiée chez des patients en dialyse péritonéale continue ou intermittente. Comme chez l'hémodialysé, les taux de carnitine totale et libre sont normaux alors que les taux d'acylcarnitines sont significativement élevés.

Des concentrations plasmatiques basses reflètent le plus souvent des stocks musculaires bas. En revanche, des concentrations plasmatiques normales peuvent masquer un déficit musculaire en carnitine [17]. La détermination des taux sériques peut, par conséquent, ne pas être un fidèle reflet du statut de carnitine. L'idéal, pour évaluer ce dernier, serait donc d'étudier le contenu musculaire en carnitine [107].

II.1.2 - Taux musculaires

Devant le caractère invasif des prélèvements musculaires, les études évaluant le pool musculaire de carnitine chez l'hémodialysé sont plus rares.

En 1983, Savica et al. [108] mesurent les taux musculaires de carnitine chez 14 hémodialysés ayant entre 5 et 58 mois de dialyse. Les valeurs moyennes des taux de CL et de CE sont respectivement 9,88 \pm 1,09 et 1,13 \pm 0,27 $\mu\text{mol/g}$ NCP (protéines non collagéniques) chez les hémodialysés alors que celles du groupe témoin sont 19,34 \pm 1,19 et 2,41 \pm 0,36 $\mu\text{mol/g}$ NCP. Savica et al. [108] montrent en outre qu'il existe une corrélation entre les taux plasmatiques et les taux musculaires de carnitine libre. A l'inverse, ils n'ont mis en évidence aucune

corrélation entre les acylcarnitines et la carnitine totale. Depuis, l'abaissement significatif du contenu musculaire chez l'hémodialysé a été confirmé par d'autres auteurs [109] [110].

Ainsi, les deux paramètres permettant de définir un déficit en carnitine chez un patient hémodialysé sont [111] :

- l'augmentation plasmatique du rapport CE/CL
- et l'abaissement des taux musculaires de carnitine.

Cependant, tous les patients en hémodialyse ne sont pas déficitaires en carnitine : des taux musculaires de carnitine normaux ont été trouvés chez certains d'entre eux [107]. L'analyse des causes du déficit en carnitine chez l'hémodialysé peut expliquer, au moins en partie, cette contradiction.

II.2 - CAUSES DU DEFICIT EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE

II.2.1 - La dialyse

Les membranes utilisées en hémodialyse étant très perméables aux molécules de poids moléculaire inférieur à 300 Da, les patients hémodialysés présentent des déficits en différents composants. Ils sont particulièrement prédisposés à un déficit en carnitine, compte tenu de son faible poids moléculaire (PM=161), de ses acides aminés précurseurs (lysine : PM=146 ; méthionine : PM=149) et des cofacteurs nécessaires à sa synthèse (ascorbate : 176 ; pyridoxine : 205) [109].

En 1996, Selçuk et al. [112] ont mesuré les taux sériques de carnitine de 12 patients avant et après une session d'hémodialyse. Ils décrivent, avant dialyse, un taux moyen de $62 \pm 24 \mu\text{M}$ qui, après dialyse, chute à $26 \pm 24 \mu\text{M}$, soit une perte per dialytique de $60 \pm 33\%$. Ces résultats confirment des données plus anciennes :

- 1982 : Rumpf et al. [113] rapportent une perte de l'ordre de 75%
- 1985 : Panzetta et al. [114] trouvaient une perte de 49,27% par rapport aux taux initiaux.

Il faut cependant relativiser ces pertes per dialytiques importantes. En effet, la perte hebdomadaire de carnitine totale chez l'hémodialysé est comparable à l'excrétion urinaire hebdomadaire de sujets témoins en bonne santé [115].

La dialyse n'est pas un processus sélectif (à l'inverse de la fonction rénale), car elle entraîne indifféremment la perte de la carnitine libre et des acylcarnitines [105]. Mais les pertes

perdialytiques en CL sont relativement plus importantes que les pertes urinaires de CL des patients sans maladie rénale [116]. Wanner et Hörl [115] rapportent une diminution de 75% de la CL après 4 heures d'hémodialyse, la baisse en acylcarnitines à chaîne courte (ACCC) et longue (ACCL) n'étant respectivement que de 65 et 50%.

Si de nombreuses études précisent l'état du contenu plasmatique en carnitine après une séance d'hémodialyse, plus rares sont celles qui analysent l'évolution de ces taux au cours de la dialyse.

Panzetta et al. [114] relèvent toutes les 40 minutes les concentrations plasmatiques en CL et CT pendant une dialyse de 4 heures chez 14 hémodialysés. L'observation des taux plasmatiques avant et après dialyse montre un abaissement moyen d'environ 50%. Mais cette baisse perdialytique n'est pas constante dans le temps. Chez tous les patients, on observe une augmentation transitoire durant la séance de dialyse. Ces phénomènes de rebond éliminent l'hypothèse d'une élimination simple et irréversible à partir d'un pool constant. Ils indiquent au contraire que durant la dialyse, de la carnitine peut rejoindre le pool plasmatique à un taux supérieur à la fuite perdialytique. L'origine de cette augmentation plasmatique pourrait être une augmentation de la synthèse et/ou un apport exogène de la molécule, mais en fait seul un relargage de carnitine des tissus vers le sang peut expliquer l'augmentation aussi rapide et marquée des taux plasmatiques de carnitine. En d'autres termes, lorsque les concentrations plasmatiques sont élevées, on observe une simple fuite perdialytique de la carnitine sérique, alors que, lorsqu'elles sont basses, il y a un relargage de la carnitine tissulaire vers le milieu sérique. Ce même phénomène participera à la restauration des taux sériques entre deux séances de dialyse.

Voyons maintenant comment influent les caractéristiques du filtre, du bain de dialyse et de l'ancienneté du traitement sur les taux de carnitine.

- **Influence du filtre de dialyse**

Les membranes de dialyse sont conçues pour reproduire au mieux les caractéristiques de perméabilité de la membrane basale glomérulaire. Elles sont produites à partir d'une très large variété de polymères et copolymères d'origine naturelle (cellulose : Cuprophan®, Hemophan®, di- et triacétate de cellulose) ou synthétique (polysulfone, polyacrylonitrile...), et se caractérisent par leur résistance à la diffusion des solutés, par leur perméabilité hydraulique et par leur perméabilité aux solutés, mesurées par leur coefficient de tamisage [95].

Diverses équipes[117] [118] ont comparé les taux de carnitine avec différents types de membrane et concluent que le type de membrane de dialyse n'a pas d'influence significative sur l'élimination de la carnitine.

▪ **Influence du bain de dialyse**

Le dialysat est une solution électrolytique dont la composition est très proche de celle du liquide extracellulaire normal. Deux types de tampons sont disponibles : l'acétate et le bicarbonate. L'acétate, à l'inverse du bicarbonate, ne précipite pas en présence de calcium et magnésium, mais il peut provoquer des hyperacétatémies. Le bicarbonate procure donc une correction plus physiologique de l'acidose métabolique [95].

Grossi et al. [117] (dosant la carnitine libre et estérifiée chez trois patients dialysés avec un tampon acétate puis un tampon bicarbonate) concluent que les taux de carnitine ne sont pas influencés par la composition du bain. En 1992, cependant, Novak et al. [119] rapportent des résultats légèrement différents : ils observent une baisse significative des taux plasmatiques de carnitine libre dans le groupe acétate, suggérant ainsi des besoins métaboliques en carnitine différents selon que la dialyse recourt à un tampon acétate ou bicarbonate.

Quoiqu'il en soit, la carnitine a un rôle protecteur dans le métabolisme de l'acétate contenu dans le dialysat. En effet, la carnitine tamponne les réactions intramitochondriales à coenzyme A permettant le métabolisme de l'acétate et une reconstitution permanente de CoA libre (acétylCoA + carnitine → acétylcarnitine + CoA avec pour enzyme la CPT). Un défaut de carnitine chez l'hémodialysé empêche l'oxydation de l'acétate, cause l'accumulation d'acétylCoA et la déplétion du coenzyme A dans la mitochondrie. Or, l'acétylCoA est un inhibiteur d'enzymes catalysant des réactions importantes de l'organisme (adényl translocase, pyruvate déshydrogénase, glutamine déshydrogénase) et le coenzyme A un cofacteur indispensable pour plusieurs voies métaboliques.

De ce fait, la perte chronique de carnitine pourrait contribuer au phénomène d'intolérance à l'acétate observée chez certains hémodialysés. Le fait de restaurer les stocks de carnitine améliorerait par conséquent l'oxydation de l'acétate et des acides gras par l'augmentation de la disponibilité du CoASH [118] [120].

▪ **Influence de l'ancienneté de la dialyse**

Comme nous l'avons vu auparavant, au cours des années de dialyse, le relargage tissulaire de carnitine induit une baisse progressive de son contenu musculaire.

Bazzi et al. [121] constatent une diminution des taux musculaires de CL et CE chez des patients hémodialysés depuis plus de 10 ans mais pas chez ceux traités depuis moins de 3 ans.

Ces données suggèrent qu'une déplétion en carnitine apparaît au cours du temps, seulement après plusieurs années d'hémodialyse.

Hiatt et al. [104] dosant la carnitine musculaire chez des patients dont l'ancienneté de la dialyse était variable, ont mis en évidence une corrélation inverse entre l'ancienneté de l'hémodialyse et le contenu musculaire en carnitine.

II.2.2 - Le patient

▪ L'état nutritionnel

La limitation de l'apport protidique dans l'alimentation est le seul moyen de diminuer la génération d'urée et son accumulation dans l'organisme. Toutefois, cette réduction ne peut descendre au-dessous de la fourniture du besoin minimal quotidienne en acides aminés essentiels, non synthétisables par l'organisme et contenue dans les protéines animales (viande, poisson, volaille, œufs). Ce besoin minimal est couvert par un apport de 0,6 g/kg/j de protéines. L'apport en protéines ne doit pas excéder 1,2 g/kg/j, mais ne doit jamais devenir inférieur à 0,7 g/kg/j, afin d'éviter toute dénutrition protidique. Un apport voisin de 0,7 g/kg/j est spontanément adopté par la plupart des patients au stade d'IRC avancée, du fait d'un régime pauvre en sel, d'une anorexie fréquente et de nausées.

Chazot et al. [102] ont associé un dosage plasmatique de carnitine au bilan nutritionnel de 194 hémodialysés et ont montré que les taux plasmatiques de CT sont positivement corrélés avec les apports protéiques. De plus, ils remarquent une corrélation des CT et CL plasmatiques avec l'urée, la créatinine et l'albumine sériques mais pas avec la CRP. Ceci indique que la carnitine plasmatique n'est pas influencée par l'inflammation, et qu'elle pourrait être un marqueur intéressant de malnutrition protéique. En outre, un apport de carnitine (1 g/j per os pendant 3 ans) a permis une élévation des taux sériques d'albumine et de protéine totale [122].

On pourrait penser qu'une diminution de l'absorption intestinale pourrait être à l'origine d'un déficit en carnitine. Mais Leschke et al. [123] ont suivi pendant 24 heures les concentrations plasmatiques de la L-carnitine après administration orale de 3 g chez 4 patients dialysés et chez 4 individus normaux. Ils n'ont observé aucune différence entre les deux groupes et concluent donc que l'absorption intestinale de carnitine n'est probablement pas une cause potentielle de déficit.

Le manque d'apport alimentaire est donc un facteur important à considérer dans l'abaissement des taux sériques de carnitine [105].

▪ La synthèse endogène

La synthèse endogène de carnitine est particulièrement importante lorsque les apports alimentaires sont pauvres, et permet normalement une reconstitution des stocks compensant les pertes dialytiques [123].

Il est rapporté [98] que les taux de carnitine déclinent significativement au cours d'une séance de dialyse et ne sont pas restaurés avant la dialyse suivante. Au-delà de 25 semaines de dialyse, la carnitine sérique décline de façon exponentielle, leur permettant de conclure que la synthèse endogène de carnitine est incapable de combler totalement les pertes de la dialyse. Rappelons que le foie et les reins sont les sites majeurs de la synthèse de carnitine. Or le γ -butyrobétaïne, précurseur endogène de la carnitine, est principalement synthétisée dans les reins, puis elle est ensuite transportée au foie pour son hydroxylation finale en carnitine. Tout laisse à supposer que si l'intégrité structurelle et métabolique des reins est altérée, la synthèse de γ -butyrobétaïne, et par conséquent de carnitine, diminue, tandis que son précurseur, la 6-N-triméthyllysine (TML) s'accumule. Il est observé une élévation marquée de la TML chez l'insuffisant rénal avant la dialyse (taux multiplié par 4). Après dialyse, ce taux est significativement abaissé, mais il reste supérieur à celui d'individus normaux.

On peut ainsi conclure que la perte de parenchyme rénal chez l'insuffisant rénal diminue la capacité de synthèse endogène de la carnitine [116] [124].

▪ L'insuffisance rénale

Chez l'insuffisant rénal non dialysé, malgré de faibles apports alimentaires, les taux de carnitine augmentent. Les concentrations plasmatiques totales sont significativement plus hautes chez l'urémique non dialysé que chez l'individu normal ($92,5 \pm 37,5$ versus $53,3 \pm 8,4$ $\mu\text{mol/l}$), surtout en ce qui concerne les acylcarnitines ($28,7 \pm 16,5$ versus $6,2 \pm 2,4$ $\mu\text{mol/l}$) [125]. Ceci est dû au fait que la diminution du métabolisme des AG chez l'urémique conduit à la production de groupements acylés incomplètement métabolisés qui utilisent la carnitine libre pour former des esters de carnitine.

Chez le sujet sain, la carnitine circulante subit une filtration glomérulaire, et 90% de la CL est réabsorbée au niveau tubulaire. Cette forte réabsorption de la CL permet à l'inverse une forte excrétion urinaire des composés acylés [115]. Chez l'insuffisant rénal, l'élimination des acylcarnitines est moins efficace. La diminution du DFG diminue l'élimination de toutes les formes de carnitine, et conduit à l'élévation des concentrations plasmatiques. Lorsque la maladie rénale progresse, la fonction tubulaire est elle aussi altérée : la réabsorption préférentielle de la CL diminue entraînant une élévation du ratio CE/CL [116].

- **Le diabète**

La néphropathie diabétique est une des maladies conduisant à l'insuffisance rénale terminale qui connaît l'expansion la plus rapide aux USA et en Europe du Nord. Les néphropathies diabétiques secondaires à un diabète de type 2 représentent plus de 14% des causes d'IRT en France [95]. En comparant les taux plasmatiques en carnitine d'insuffisants rénaux chroniques d'étiologies variées, Gumprecht et al. [118] constatent des concentrations significativement plus basses lors de néphropathies diabétiques.

- **Traitements associés**

En dehors de toute dialyse, des déficits en carnitine sont observés chez des épileptiques traités par l'acide valproïque ou d'autres anticonvulsivants [126], chez des cancéreux traités par anthracyclines [47] et chez des sidéens traités ou non par la zidovudine [127]. Les hémodialysés épileptiques, cancéreux ou sidéens voient donc leurs facteurs de risque de déficit en carnitine augmentés.

A l'inverse, l'administration de L-carnitine chez de tels patients peut améliorer certains effets secondaires (troubles neurosensoriels, cardiomyopathies, myopathies) liés à la prise de ces médicaments [128].

II.3 - MANIFESTATIONS CLINIQUES DU DEFICIT EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE

Selon plusieurs auteurs [103] [115] [116], les manifestations cliniques pouvant être liées à un déficit en carnitine chez le dialysé sont :

- **Symptômes neuromusculaires :**
 - asthénie post-dialytique
 - fatigabilité musculaire
 - crampes musculaires
 - pathologies musculaires non spécifiques
 - réduction de la capacité d'exercice

- **Symptômes cardio-vasculaires :**
 - Anomalies à l'ECG (dont les arythmies)
 - cardiomyopathie
 - hypotension per dialytique
 - angor

En parallèle, on observe certaines **anomalies du bilan biologique** :

- Anémie, répondant pas ou peu à de fortes doses d'érythropoïétine recombinante (rEPO)
- Intolérance au glucose
- Dyslipidémies
- Perte protéique

III - TRAITEMENT DES HEMODIALYSES PAR LA CARNITINE

Pour corriger le déficit en carnitine observé chez l'hémodialysé, et ses conséquences cliniques, les cliniciens disposent aujourd'hui d'une thérapeutique adaptée.

Jusqu'en 1989, la carnitine était disponible uniquement sous la forme DL dont le nom commercial était BICARNESINE[®]. Depuis, l'avancée des connaissances scientifiques et cliniques sur la molécule a conduit les laboratoires à la commercialisation du seul isomère actif : la L-carnitine. La dénomination commune internationale (DCI) devient alors lévocarnitine et son nom commercial sur le marché français LEVOCARNIL[®].

Le traitement des déficits en carnitine repose exclusivement sur ce principe actif, qui existe sous deux formes : une forme buvable dosée à 1 g/10mL et une forme injectable dosée à 1 g/5mL.

Les posologies les plus communément utilisées sont :

- pour la voie per os : 2 à 6 g par jour [129]
- pour la voie intraveineuse (IV) : une injection de 20 mg/kg [130] après chaque séance de dialyse (soit 1 à 2 g par séance [109]), 3 fois par semaine
- pour le bain de dialyse : une incorporation à celui-ci de 2 à 4 g de façon à obtenir une concentration dans le bain de 100 à 150 μ M [131].

Les deux dernières solutions semblent être les mieux adaptées au patient hémodialysé.

La durée du traitement est à adapter au degré du déficit en carnitine et à son évolution (cependant, si aucune amélioration n'est observée après 8 à 12 semaines de traitement, un arrêt peut être envisagé [129]). Les bénéfices apparaissent en général après 8 semaines de traitement. La durée du bénéfice est positivement corrélée à celle du traitement [130]. Une supplémentation en carnitine augmente à la fois la CL et la CE ; cependant, le ratio CE/CL est très peu modifié par cette supplémentation. Bien qu'élevant les taux plasmatiques et musculaires à des valeurs très supérieures à la normale [109], une supplémentation prolongée n'entraîne aucun effet indésirable.

IV - LES EFFETS BENEFIQUES D'UNE SUPPLEMENTATION EN CARNITINE CHEZ L'HEMODIALYSE

Les principaux signes cliniques et symptômes d'un déficit en carnitine chez les insuffisants rénaux sont l'anémie, les cardiomyopathies, une faiblesse musculaire, la fatigue, et les dyslipidémies. Certains de ces signes sont également retrouvés lors de déficits secondaires en carnitine. Au dosage habituellement prescrit, le traitement améliorerait plusieurs de ces signes cliniques [132] [133].

▪ **L'anémie :**

Le traitement par Lévocarnil® améliore la fragilité osmotique et la survie érythrocytaires [134], augmente l'hématocrite et le taux de réticulocytes [122], et diminue les besoins en érythropoïétine [134], [135].

▪ **Le muscle :**

Une nette amélioration des crampes est observée sous Lévocarnil® [116] [136] [137].

De même, certains auteurs rapportent une amélioration de la fonction musculaire [136] [138], en réduisant la fatigabilité musculaire de certains hémodialysés. Il faut cependant noter que ce n'est pas la solution thérapeutique de toutes les fatigues [109].

Il est également rapporté une corrélation directe entre les taux de carnitine (sérique et musculaire) et le diamètre moyen des fibres de type I [139] [140].

En revanche les effets bénéfiques de la carnitine sur la VO₂ max sont assez peu documentés ; certains auteurs cependant la trouvent améliorée sous carnitine [136] [138].

▪ **Le cœur :**

Un traitement par L-carnitine améliore la fraction d'éjection : il est donc conseillé de supplémenter en L-carnitine les patients présentant des épisodes d'hypotension récurrents d'origine inconnue et/ou des fractions d'éjection basses [141] [142].

Ce traitement améliore également la cardiomégalie et diminue les arythmies [143] ainsi que l'hypotension intradialytique [136].

▪ **Les anomalies lipidiques :**

A ce jour les données rapportées dans la littérature ne permettent pas de définir le mode de traitement optimal ni de sélectionner les patients dont les paramètres lipidiques peuvent être améliorés par la carnitine [132] [144].

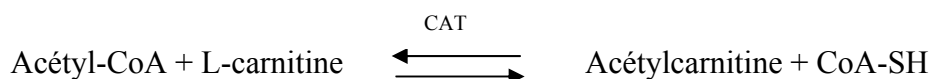
TROISIÈME PARTIE :
MISE AU POINT DU DOSAGE DE LA
CARNITINE SUR
X-PAND® DIMENSION

I - MATERIELS ET METHODES

La société Dade-Behring nous ayant suggéré de mettre au point le dosage de la carnitine sur l'automate X-Pand[®] Dimension, et aucune étude n'ayant été menée dans la région pour évaluer le statut des patients hémodialysés en carnitine, nous avons décidé de mettre au point ce dosage sur X-Pand[®]. Pour cela nous nous sommes inspirés du mode opératoire de l'équipe d'Angers (laboratoire du Professeur Malthiery), qui dose la carnitine libre et totale sur l'automate Cobas Mira[®] (annexe 1).

I.1 - PRINCIPE

Le principe du dosage spectrophotométrique de la carnitine est basé sur la réaction suivante catalysée par la carnitine acétyl transférase (CAT) [70] [71] :



La réaction, facilement réversible, est rendue unidirectionnelle par la neutralisation du coenzyme A (CoA-SH) avec le réactif d'Ellman ou DTNB = acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) pour former du 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB). La concentration de TNB est mesurée de manière spectrophotométrique à 405 et 700 nm (700 nm étant la longueur d'onde utilisée pour corriger les absorbances non spécifiques observées à 405 nm).

Cependant cette réaction ne permet que le dosage de la carnitine libre. Pour le dosage de la carnitine acylée, une hydrolyse alcaline préalable est nécessaire pour libérer la carnitine. Après hydrolyse alcaline, le dosage de la carnitine totale (CT) correspondant à la somme carnitine libre (CL) et carnitine estérifiée (CE) est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment.

I.2 - APPAREILLAGE

L'automate utilisé est le Dimension[®] X-Pand de la société Dade-Behring (Dade Behring S.A. Paris la Défense, France).

Le système de chimie clinique Dimension[®] X-Pand est un système de chimie intégré discret contrôlé par microprocesseur, qui permet le dosage de nombreux composés, ainsi que la mesure de diverses activités enzymatiques dans les liquides organiques. Il utilise des cartouches de réactifs multitest Dade Behring Flex[®], des cuvettes de réaction à usage unique, la technologie "multidécteur" intégrée (IMT, Integrated Multisensor Technology), ainsi qu'un module d'immunodosage en phase hétérogène (HM) pour le traitement des immunodosages. Il peut ainsi effectuer jusqu'à 250 tests photométriques et jusqu'à 83 immunodosages par heure.

Cet automate peut également traiter des méthodes définies par l'utilisateur sur canaux ouverts, c'est-à-dire que l'utilisateur peut définir ses propres méthodes à l'aide de réactifs non commercialisés par Dade Behring. L'automate peut mémoriser jusqu'à 10 méthodes sur canaux ouverts.

C'est le cas du dosage de la carnitine que nous avons adapté sur cet automate.

I.3 - REACTIFS

Les principaux réactifs utilisés sont répertoriés dans le tableau 12 :

	DTNB ou 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)	Acétyl Coenzyme A	Ethylène- glycol bis (EGTA)	CAT (carnitine acétyltrans- férase)	TRIS ou (hydroxy- méthyl)- aminométhane	L-Carnitine hydrochloride (PM ≈ 200)
Référence	D8130	A2056	E4378	103241	8332	C7518
Fournisseur	SIGMA	SIGMA	SIGMA	ROCHE	MERCK	SIGMA
Condition- nement	1 g	25 mg et 125 mg	10 g	5 mg (1ml)	100 g	100 mg
Conservation	Température ambiante.	-20°C	Température ambiante	4°C	Température ambiante	-20°C

Tableau 12 : Réactifs utilisés pour le dosage de la carnitine

Les autres réactifs utilisés sont : eau distillée stérile pour irrigation (BAXTER Ref. UKF7114), KOH 1N et HCl 1N.

I.3.1 - Préparation des solutions de travail :

→ Le tampon TRIS-HCl 100 mM est préparé par dissolution de 60,5 g de TRIS dans 4500 mL d'eau distillée stérile. Après ajustement du pH à 7,5 par addition de HCl N, le volume est complété à 5000 mL avec de l'eau distillée. Une partie du tampon sert à la reconstitution des

solutions de DTNB et d'EGTA, le reste est fractionné par volumes de 3350 μL et congelé à -20°C .

→ **La solution de DTNB 2 mM** est préparée par dissolution de 1586 mg de DTNB dans 2000 mL de tampon TRIS-HCl. Cette solution de DTNB est fractionnée par volumes de 1800 μL qui sont congelés à -20°C .

→ **La solution d'EGTA 3 mM** est préparée par dissolution de 2280 mg de poudre dans 2000 mL de tampon TRIS-HCl. Cette solution d'EGTA est fractionnée par volumes de 2000 μL puis congelée à -20°C .

→ **La solution d'acétyl coenzyme A 3M** est préparée par dissolution de 500 mg de poudre dans 200 mL d'eau distillée, fractionnée par volumes de 200 μL et congelée à -20°C .

→ **La solution commerciale de CAT (5 mg/mL)** est prête à l'emploi.

I.3.2 - Préparation des réactifs A et B

Le réactif A est préparé par mélange de 1,8 mL de DTNB 2 mM, 2 mL d'EGTA 3mM et 200 μL d'acétylCoA 3M. Le réactif B est reconstitué par mélange de 267 μL d'enzyme CAT et d'une fraction aliquote de TRIS-HCl 100 mM.

Ces deux types de réactifs A et B sont stockés à l'intérieur de l'appareil dans des cartouches vides appelées "flex" (DF 99 Dade Behring). Chaque "flex" dispose de 6 puits, 4 sont remplis avec le réactif A et 1 puits avec le réactif B. Ainsi, chaque "flex" introduit dans l'automate permet de réaliser 40 tests. La stabilité dans le temps des réactifs A et B a été testée et sera décrite ultérieurement.

I.4 - CALIBRATEURS ET CONTROLES

I.4.1 - Calibrateurs

Les calibrateurs sont préparés à partir d'une solution primaire de carnitine. La poudre de L-Carnitine étant très hygroscopique, sa pesée est très difficile, et la concentration de la solution mère préparée assez inexacte. Pour pallier à ce problème pratique, nous avons décidé de reconstituer la totalité d'un flacon de 100 mg de L-carnitine dans 25 mL d'eau distillée stérile. Cette solution concentrée à 20 mM est ensuite fractionnée par volumes de 1 mL et congelée à -20°C .

A chaque calibration, une fraction est décongelée et diluée au $1/100^{\text{ème}}$ dans de l'eau distillée stérile, afin d'obtenir une solution de L-Carnitine à 200 μM . Les autres calibrateurs sont

préparés par dilutions successives de cette solution à 200 μM . Ainsi une calibration à 5 points est réalisée : 0, 25, 50, 100 et 200 μM , chaque point étant dosé deux fois.

La stabilité du calibrateur (20 mM) a été évaluée après un mois de congélation à -20°C .

I.4.2 - Contrôles

Concernant la carnitine libre, trois niveaux de contrôle sont utilisés :

- Contrôle bas = QC 1 : solution à 12,5 μM de L-carnitine.
- Contrôle moyen = QC 2 : pool de 50 ultrafiltrats de plasmas normaux.
- Contrôle haut = QC 3 : solution à 200 μM de L-carnitine.

Pour la carnitine totale, un seul contrôle (QC 4) est passé : il s'agit du pool de 50 ultrafiltrats ayant subi une hydrolyse alcaline puis une neutralisation.

Tous ces contrôles sont fractionnés et congelés à -20°C . Ils sont utilisés à chaque série de dosages.

I.5 - ECHANTILLONS : RECUEIL ET PREPARATION

I.5.1 - Recueil des échantillons :

Les échantillons récoltés sont obtenus à partir de 123 adultes volontaires apparemment sains provenant soit des centres de prélèvements du CHU de Brest, soit des personnels des différents laboratoires. Tous ont été informés de l'objet de l'étude et ont donné leur consentement oral. Les prélèvements ont été réalisés après un jeûne d'au moins 12 heures.

I.5.2 - Préparation des échantillons :

Les échantillons sanguins sont recueillis dans des tubes de 10 ml vacutainer[®] avec comme anticoagulant l'héparinate de lithium (Becton Dickinson 368484). Dès leur arrivée au laboratoire, les tubes sont centrifugés à 3500 tours/min pendant 15 min, décantés et les plasmas aussitôt utilisés ou congelés à -20°C en attendant leur traitement.

Ultrafiltration :

Deux millilitres de plasma frais ou congelés à -20°C sont placés dans un filtre Centricon Ultracel YM10 (Millipore Corp., Bedford, MA) et centrifugés à 8450 tours/min (2000 g), pendant 1 heure à 25°C . L'ultrafiltrat est ensuite recueilli et prêt pour l'analyse.

Carnitine libre :

Un minimum de 180 μL de cet ultrafiltrat (ou de contrôle) est nécessaire pour réaliser le dosage en double de la carnitine libre.

Carnitine totale :

Les échantillons de carnitine sont préparés en faisant subir à l'ultrafiltrat une hydrolyse alcaline : un mélange de 200 µL d'ultrafiltrat et de 100 µL de NaOH 0,15N est hydrolysé pendant une heure à 37°C. Cet hydrolysate est ensuite neutralisé par de l'HCl 0,15N, jusqu'à obtenir un pH entre 7,2 et 7,8 (contrôle au moyen de papier pH de type Merck ou Prolabo).

Un minimum de 180 µL de cet hydrolysate est également nécessaire pour le dosage en double de la carnitine totale. Les résultats devront tenir compte de la dilution réalisée lors de l'hydrolyse et de la neutralisation.

I.6 - PARAMETRES DU PROGRAMME

La méthode utilise un canal ouvert en mode absorbance ; c'est une méthode en point final. La programmation a été réalisée par la société Dade-Behring. Les paramètres de la programmation sont répertoriés dans le tableau 13. Le temps d'analyse est de 16 min.

PRODUIT	TEMPS (SEC)	VOLUME (µl)	VOLUME DE CHASSE (µl)
R1	-76.4	225	20
ECHANTILLON	0	75	10
R2	450.4	20	20

Tableau 13 : Paramètres de la programmation
(les lectures se font à 400 et 940 secondes)

En mode de calcul logit, comme c'est le cas ici, le système Dimension[®] utilise l'équation suivante pour convertir une valeur d'absorbance en concentration de l'analyte :

$$\text{Conc} = C_3 \left(\left[\frac{C_1}{\Delta \text{Abs} - C_0} - 1 \right] \right)^{1/C_2 - 4}$$

I.7 - ETUDE DES PARAMETRES DU DOSAGE

La réalisation de cette étude suit le protocole rédigé par les membres de la commission «Validation de techniques» de la Société Française de Biologie Clinique et les recommandations édictées par celle-ci quant aux coefficients de variations (CV) [83] [145]

Les caractéristiques analytiques suivantes ont été étudiées :

- précision (répétabilité et reproductibilité)
- linéarité
- limite de détection
- interférences liées à la bilirubine, à l'hémolyse, à la turbidité (hyperlipidémie), à la présence d'acide urique
- Exactitude (test de surcharge)
- comparaison avec la méthode de référence (spectrométrie de masse)

Nous avons également testé l'influence de la congélation sur un échantillon, la stabilité dans le temps et en fonction de la température des réactifs et des calibrateurs. Ensuite nous avons établi nos propres valeurs de référence et nous avons réalisé une étude de coût de ce dosage au laboratoire.

I.7.1 - Répétabilité

L'essai de répétabilité a été réalisé à trois niveaux de concentration (bas, moyen, élevé), à partir de solutions de L-carnitine, nommés QC1, S50 (50 μ M), QC3, en réalisant 20 mesures de chaque niveau en une seule série.

I.7.2 - Reproductibilité

Nous avons testé la reproductibilité à différents niveaux.

Un essai de reproductibilité (essai 1) a été réalisé pendant 5 jours consécutifs sur les solutions de contrôle à trois niveaux de concentration. Chaque jour, deux mesures de chaque échantillon ont été réalisées. Dans chaque série figurent un étalon (Et) utilisé normalement dans la technique, les 3 niveaux de contrôle et 2 spécimens d'eau distillée utilisés pour évaluer la limite de détection.

Un second essai de reproductibilité (essai 2) a ensuite été réalisé. Afin d'évaluer une éventuelle variation due à l'ultrafiltration, nous prenons un "pool" de plasmas que nous fractionnons et congelons. Chaque jour et pendant 15 jours, une fraction est décongelée, ultrafiltrée et le taux de carnitine libre et totale est évalué. Cette étude de reproductibilité est réalisée à raison de deux séries par jour.

I.7.3 - Limite de détection

Les contraintes de l'automate ne nous permettant pas d'obtenir des valeurs de blanc (eau distillée), nous n'avons pu déterminer ce paramètre selon le protocole de la SFBC qui utilise la formule suivante : $LdD = S_b / p$ (S_b = écart-type des blancs exprimés en signal, P = pente initiale de la fonction étalonnage).

La limite de détection a donc été déterminée simultanément à celle de la linéarité, en exploitant les dosages du blanc et des deux dernières dilutions inclus dans la série précédente. Nous avons ainsi observé ce que rendait l'automate pour de faibles concentrations de carnitine.

I.7.4 - Linéarité

La linéarité a été étudiée grâce à une gamme de dilution géométrique (1,1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128) à partir d'une valeur de concentration élevée estimée à 250 μ M de carnitine. Trois gammes sont passées chaque jour sur l'automate, pendant trois jours consécutifs. Tous les points de gamme ont été déterminés en double.

I.7.5 - Etude des interférences

L'étude des interférences habituelles (hémolyse, turbidité, bilirubine), et de celle de l'acide urique (couramment citée pour la carnitine) n'a pas été réalisée ici. En effet, le dosage de la carnitine s'effectue sur l'ultrafiltrat et non sur le plasma directement : les filtres Amicon retenant toutes les molécules supérieures à 10 000 Da, on ne retrouve donc dans l'ultrafiltrat aucune de ces substances susceptibles d'interférer.

I.7.6 - Exactitude (test de surcharge)

Les solutions utilisées ici sont celles préparées pour l'étude de linéarité. Les concentrations s'étendent donc de 250 à 3,91 μ M, l'eau distillée étant utilisée pour le point 0.

Deux types de surcharge ont été réalisés :

- la surcharge sur un pool réalisé à partir de 20 plasmas, que l'on ultrafiltre ensuite, appelée S1
- la surcharge sur l'ultrafiltrat obtenu à partir du même pool, appelée S2.

Pour chaque dosage (réalisé en double) un mélange à volume égal de la solution de concentration connue et de l'échantillon S1 ou S2 est réalisé et les taux de carnitine libre et totale sont déterminés à chaque fois.

I.7.7 - Comparaison avec la technique de référence (corrélation)

Les taux de carnitine libre et totale de quarante-trois échantillons ont été mesurés par spectrométrie de masse à l'hôpital Debrousse à Lyon. Ces mêmes échantillons ont été dosés à Brest sur l'automate X-Pand[®] par méthode spectrophotométrique. Les résultats obtenus par ces deux techniques ont été comparés afin d'établir une corrélation.

I.7.8 - Stabilité de l'échantillon à la congélation

Nous avons testé l'effet de la congélation d'un échantillon sur les taux carnitine. Pour cela, nous dosons la CL et la CT de 5 ultrafiltrats obtenus à partir de plasmas frais, que nous congelons. Après décongélation des ultrafiltrats, la CL et la CT sont dosées. Puis nous comparons les résultats obtenus avant et après congélation.

I.7.9 - Stabilité des réactifs

La stabilité des réactifs A et B reconstitués et placés dans un "flex" a été testée. Pour cela, le "flex" est mis en place dans l'automate et laissé pendant 18 jours. Le taux de carnitine libre d'un pool de plasmas est ainsi évalué deux fois par jour.

I.7.10 - Stabilité des calibrateurs

L'éventuelle altération de la solution concentrée de L-carnitine servant à reconstituer les calibrateurs sous l'effet de la congélation à -20°C a été étudiée. Pour cela, un mois après congélation des fractions de solution à 20 µM, nous avons reconstitué à partir d'une fraction les différents points de gamme correspondant aux calibrateurs. Ces solutions ont été passées sur l'automate avec la calibration du moment. Chaque point de gamme est dosé en double.

I.7.11 - Intervalles de référence

Les résultats de CL et CT obtenus pour les 123 volontaires sains, considérés comme étant le reflet de la population générale, nous ont permis d'établir des valeurs moyennes de référence.

I.7.12 - Etude de coût

Nous avons étudié pour le laboratoire le prix de revient d'un dosage de CL et CT chez un patient, sachant que cette analyse (CL+CT) est cotée B120 par la Sécurité Sociale (prix du B=0,27 €)

I.8 - STATISTIQUES

Différents tests statistiques (logiciel Excel) ont été utilisés afin d'analyser les résultats obtenus au cours de notre étude :

Droite de régression linéaire

Coefficient de corrélation

Test de Student de 3 types : apparié, à variances égales ou à variances inégales

Test de Fisher pour une analyse de variance

Intervalle de confiance pour calculer le CV limite

Pour tous les tests statistiques, le seuil de significativité a été choisi à 5%.

II - RESULTATS

II.1 - Paramètres du dosage.

II.1.1 - Répétabilité

La répétabilité a été testée à 3 niveaux de concentration par 20 mesures. Les résultats figurent dans le tableau 14. Des CV inférieurs à 5% sont observés aux trois niveaux de concentration (bas, moyen, élevé).

Compte tenu du nombre de dosages ($n = 20$) et du risque α choisi à 5%, le calcul de l'intervalle de confiance du CV (obtenu sur tableur Excel) donne une limite d'acceptabilité à 3,71% pour QC1, 1,48% pour S50 et 1,28% pour QC3. La répétabilité calculée aux trois niveaux de concentration répond donc aux critères de validation.

Contrôles (n=20)	Moyenne (μM)	Ecart-type (μM)	Coefficient de variation (%)
QC 1	12,475	0,439	3,517
S50	49,880	0,607	1,216
QC 3	200,545	1,369	0,682

Tableau 14 : Etude de la répétabilité

II.1.2 - Reproductibilité

▪ Premier essai (sur les solutions de contrôle)

La reproductibilité a été testée sur 3 niveaux de contrôle différents, QC1, QC2 et QC3 à raison de 2 séries par jour pendant 5 jours.

Compte tenu du nombre de dosages ($n = 10$) et du risque α choisi (5%), l'intervalle de confiance du CV (calculé sur tableur Excel) donne un CV limite calculé de 8,59% pour QC1, 2,92% pour QC2 et 1,52% pour QC3. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 15 et sont donc satisfaisants.

Contrôles (n=5x2)	Moyenne (µM)	Ecart-type (µM)	Coefficient de variation
QC 1	11,32	0,908	8,023
QC 2	33,495	0,810	2,419
QC 3	201,405	1,363	0,677

Tableau 15 : Essai de reproductibilité sur des solutions de contrôle (essai 1)

▪ **Deuxième essai (après décongélation d'un plasma et préparation d'un ultrafiltrat) :**

Au cours de cet essai, nous avons observé des coefficients de variation inférieurs à 5% pour les dosages de CL et CT, indiquant que l'ultrafiltration influe peu sur les résultats obtenus. Les CV limites calculés sur tableur Excel sont de 4,13% pour la CL et 6,38% pour la CT.

Contrôles (n=15x2)	Moyenne (µM)	Ecart-type (µM)	Coefficient de variation (%)
CL	43,390	1,486	3,424
CT	60,891	2,989	4,909

Tableau 16 : Essai de reproductibilité sur ultrafiltrat (essai 2)

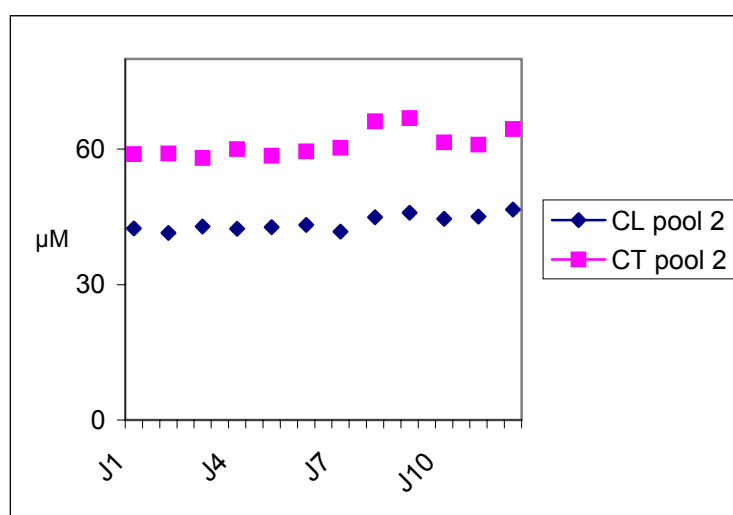


Figure 12 : Etude de la reproductibilité sur ultrafiltrat (essai 2)

II.1.3 - Limite de détection

L'automate ne rendant aucune valeur pour les blancs (eau distillée), et rendant des valeurs aléatoires pour le point 1,955 de la gamme de linéarité, nous regardons ce que rend l'automate pour la solution à 3,91 μM diluée au 1/3 et au 2/3. Pour la solution diluée au 1/3, comme pour la valeur 1,955, nous n'obtenons aucune valeur ; en revanche pour la solution diluée au 2/3 (soit environ 2,61 μM), l'automate rend des valeurs tout à fait répétables (CV = 8,9%). Ainsi, nous avons fixé à 4 μM la valeur de la limite de détection. Cette valeur est cohérente par rapport à celle obtenue par Ghoshal et al.. [69] (5 μM) et la littérature, quelle que soit la méthode automatisée.

II.1.4 - Linéarité

La linéarité a été testée pour des valeurs théoriques comprises entre 1,955 et 250 μM . Pour la valeur la plus basse, c'est à dire 1,955 μM , l'automate rend soit des valeurs, soit le message suivant « résultat inférieur au domaine de calcul ». Nous décidons donc de ne garder les valeurs qu'à partir de 3,91 μM , arrondi à 4 μM . Ainsi l'observation des résultats et la courbe obtenue permettent de conclure à une bonne linéarité de 4 à 250 μM , comme le montre la figure 13.

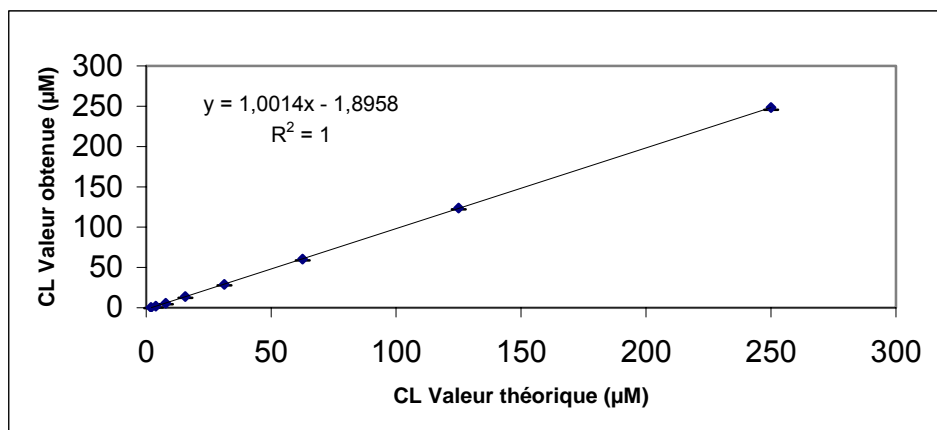


Figure 13 : Etude de la linéarité

II.1.5 - Exactitude (test de surcharge)

Pour chacun des deux tests (CL et CT), une droite de régression linéaire est établie entre les valeurs théoriques et les valeurs mesurées. Les valeurs théoriques sont indiquées en abscisse et les valeurs mesurées pour la série S1 (surcharge sur pool de plasma) ou S2 (surcharge sur ultrafiltrat) sont indiquées en ordonnées. Les résultats sont présentés dans la figure 14.

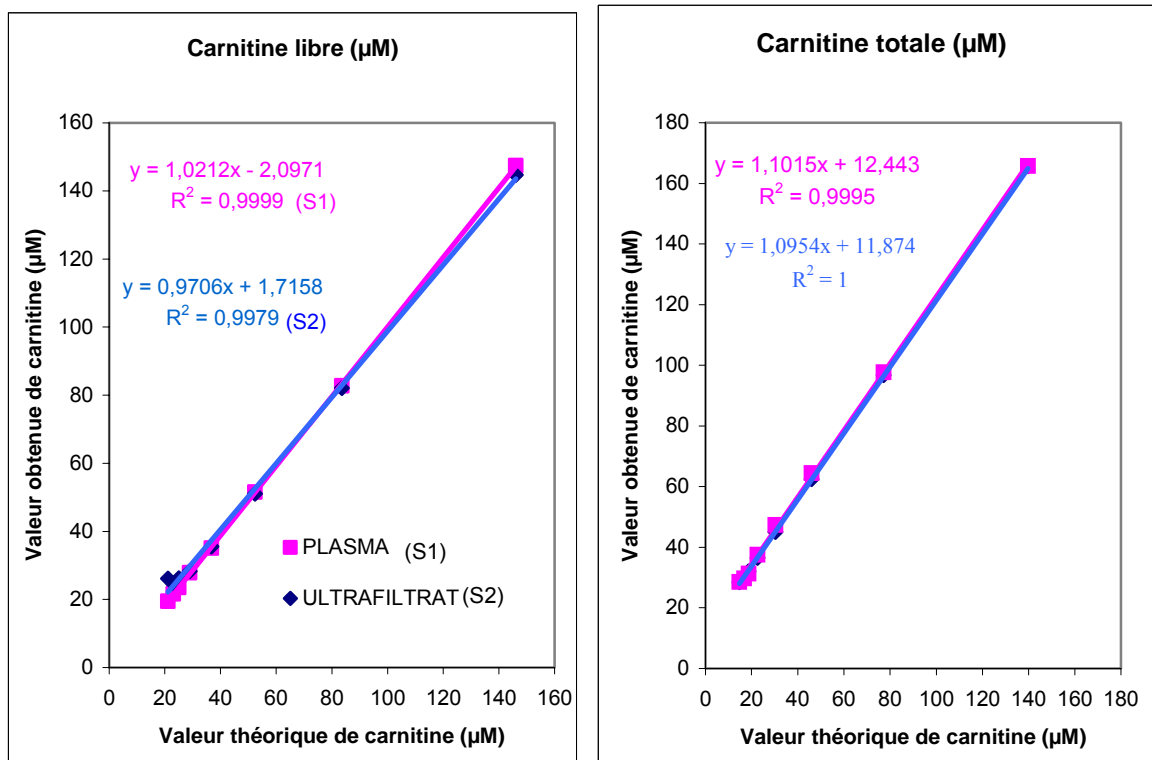


Figure 14 : Test de surcharge (CL et CT)

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les résultats de carnitine libre obtenus avec les surcharges sur plasma (S1) ou sur ultrafiltrat (S2). Le coefficient de corrélation entre les deux tests est de 0,998. De la même façon, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les résultats obtenus pour la carnitine totale avec un coefficient de corrélation entre les deux tests de 0,9996 (tableau 17). Nous en concluons que l'exactitude est la même pour les valeurs de CL et CT sur plasma (S1) et sur ultrafiltrat (S2).

En revanche, si nous comparons les valeurs (CL et CT) de S1 et S2 aux valeurs théoriques, nous constatons qu'il existe une différence significative concernant la CL de S1 et les CT de S1 et S2 (tableau 17). Pour ces dernières, les valeurs obtenues sont en moyenne 10% supérieures aux valeurs théoriques.

VALEURS OBTENUES						
CL			CT			
Valeurs théoriques	Plasma	Ultra-filtrat	Valeurs théoriques	Plasma	Ultra-filtrat	
21,14	19,50	26,15	14,74	28,5	28,6	
23,09	21,65	24,6	16,70	29,7	29,8	
25,04	23,5	26,25	18,65	32,1	31,3	
28,95	27,8	28,3	22,56	36,5	37,6	
36,76	35,05	35,55	30,37	45,1	47,4	
52,39	51,55	51	46,00	62,5	64,5	
83,64	82,75	82,1	77,24	96,7	97,7	
146,14	147,4	144,65	139,74	168,4	165,8	
P (Student)		< 0,005		0,83	< 0,0001	

Tableau 17 : Test de Student comparant les valeurs théoriques et obtenues de CL et CT sur le plasma (S1) et l'ultrafiltrat (S2)

II.1.6 - Comparaison avec la méthode de référence

La spectrométrie de masse [146] et la méthode spectrophotométrique ont été utilisées pour le dosage de la CL et de la CT de quarante-trois échantillons de patients. Les résultats sont présentés dans la figure 15.

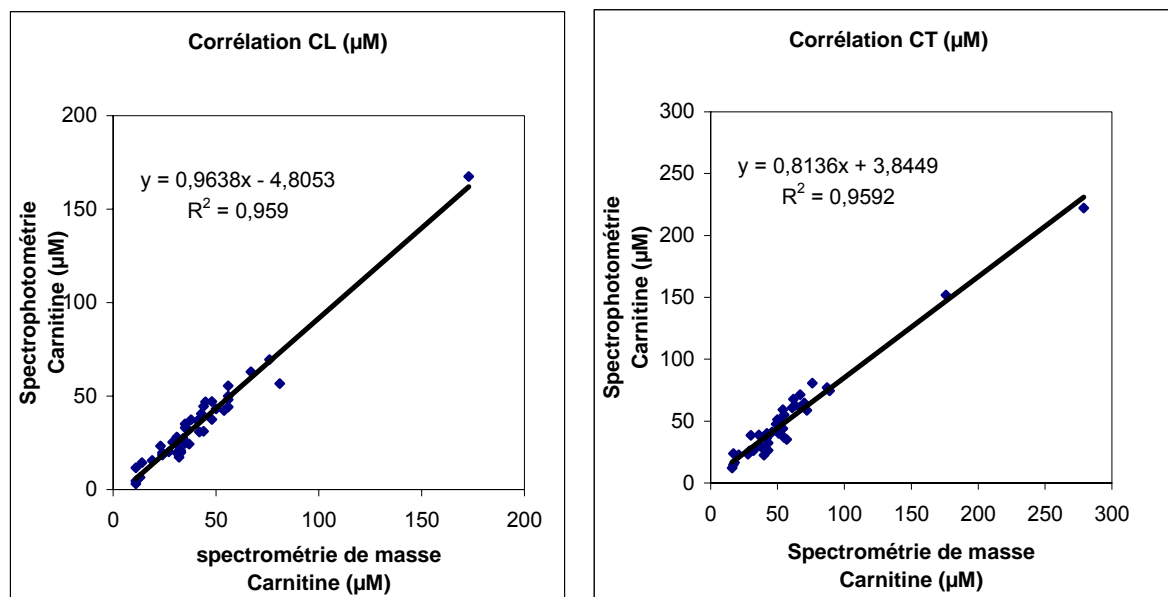


Figure 15 : Corrélation CL et CT (n=43) entre la spectrométrie de masse (méthode de référence) et la méthode spectrophotométrique

Pour la CL, le coefficient de corrélation obtenu est égal à 0,979 et la droite d'allométrie à $y = 0,9638x - 4,8053$. De même, pour la CT, le coefficient de corrélation obtenu est égal à 0,979

et la droite d'allométrie à $y = 0,8136 x + 3,8449$. Ce qui nous donne un biais négatif pour la méthode sur X-Pand[®] de 15,3% pour la CL et de 11,7% pour la CT.

En réalisant un test de Student sur séries appariées, nous mettons en évidence une différence significative uniquement entre les taux de CT obtenus par spectrophotométrie et ceux obtenus par spectrométrie de masse (Tableau 18).

	CL		CT		CE		CE/CL	
	SM	SPM	SM	SPM	SM	SPM	SM	SPM
Moyenne	41,12	34,83	55,76	49,21	14,64	14,39	0,339	0,604
Ecart-type	26,53	26,11	44,40	36,89	20,81	14,84	0,241	0,992
P (Student)	0,28		p < 0,001		0,88		0,06	

Tableau 18 : Test de Student comparant les moyennes des valeurs de carnitine obtenues par spectrophotométrie de masse (méthode de référence) (SM) et par spectrophotométrie (SPM)

II.1.7 - Stabilité de l'échantillon

Nous avons testé l'effet de la congélation sur 5 échantillons sanguins.

Nous ne mettons pas en évidence de différence significative sur les taux de CL et CT entre les plasmas frais ou congelés (Tableau 19).

	CL		CT	
	Frais	Congelé	Frais	Congelé
Plasma 1	26,7	25,75	33,5	34,8
Plasma 2	45,85	44,75	60,6	60,8
Plasma 3	27,15	25,15	33,5	32,9
Plasma 4	39,2	37,8	47,9	44,9
Plasma 5	12,2	11,6	20,1	21,7
P (Student)	0,09		0,91	

Tableau 19 : Test de Student comparant les plasmas frais et congelés

II.1.8 - Stabilité des réactifs

Nous avons testé la stabilité des réactifs A et B à bord de l'automate pendant 18 jours en passant quotidiennement 2 échantillons d'un pool.

Nous obtenons les résultats suivants (Figure 16) :

Perte à J+5 : 9,36%

Perte à J+10 : 17,30%

Perte à J+15 : 22,39%

Perte à J+18 : 26,73%

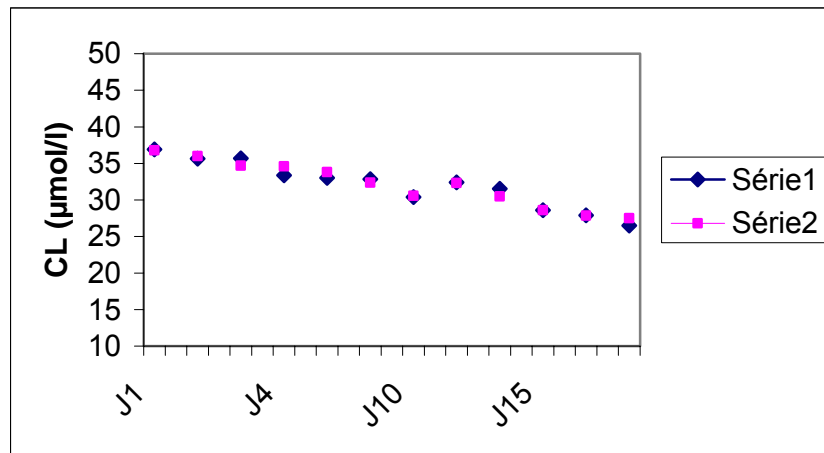


Figure 16 : Stabilité des réactifs à bord

Une perte inférieure à 10%, jugée comme acceptable, est observée après 5 jours de reconstitution du "flex".

Nous fixons donc à 5 jours la durée de vie maximale à bord de l'automate, ce qui est tout à fait satisfaisant. En effet, nous obtenons des résultats similaires sur les échantillons frais et congelés, ce qui nous permet de conserver les prélèvements congelés, jusqu'à obtenir une série suffisamment grande pour consommer la totalité des réactifs du "flex". Ainsi, le "flex" reconstitué lors de chaque série ne restera que très peu de temps à bord de l'automate, et un nouveau "flex" sera utilisé à chaque série.

II.1.9 - Stabilité des calibrateurs :

A la congélation

Après un mois de congélation, la solution de calibration donne, pour la carnitine libre, les résultats suivants (Tableau 20 et Figure 17) :

Valeur théorique (µM)	CL (µM) à J0	CL (µM) à J 30	Perte (%)
200	200,1	199,5	3,0
100	99,45	98,35	1,11
50	50,55	48,95	3,17
25	25,2	24,8	1,59

Tableau 20 : Stabilité du calibrateur à la congélation

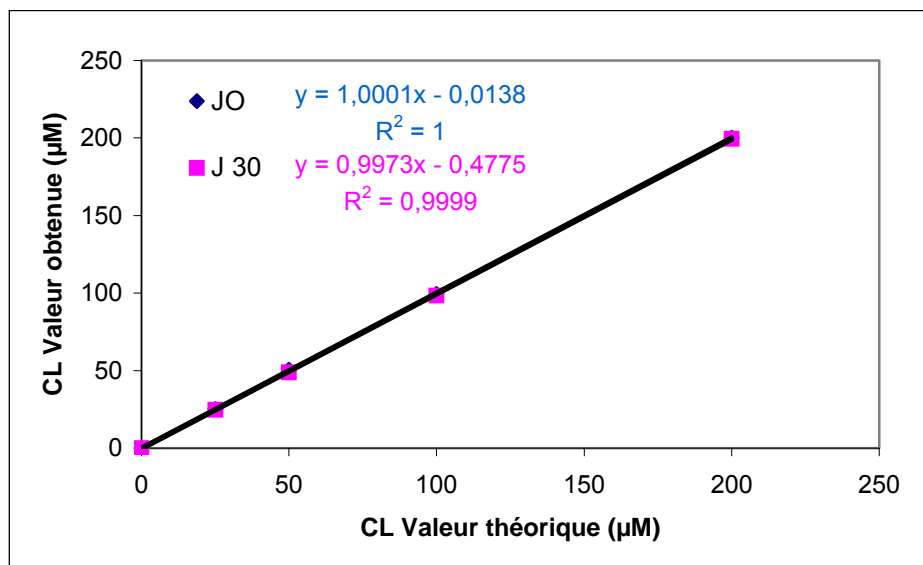


Figure 17 : étude de la stabilité des calibrateurs

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les valeurs trouvées à J0 et celles trouvées à J30. La solution de calibration est donc considérée comme étant stable un mois à -20°C.

▪ **A bord de l'automate** :

Voici le suivi des quatre contrôles de qualité passés chaque jour pendant un mois (figure 18 et tableau 21) :

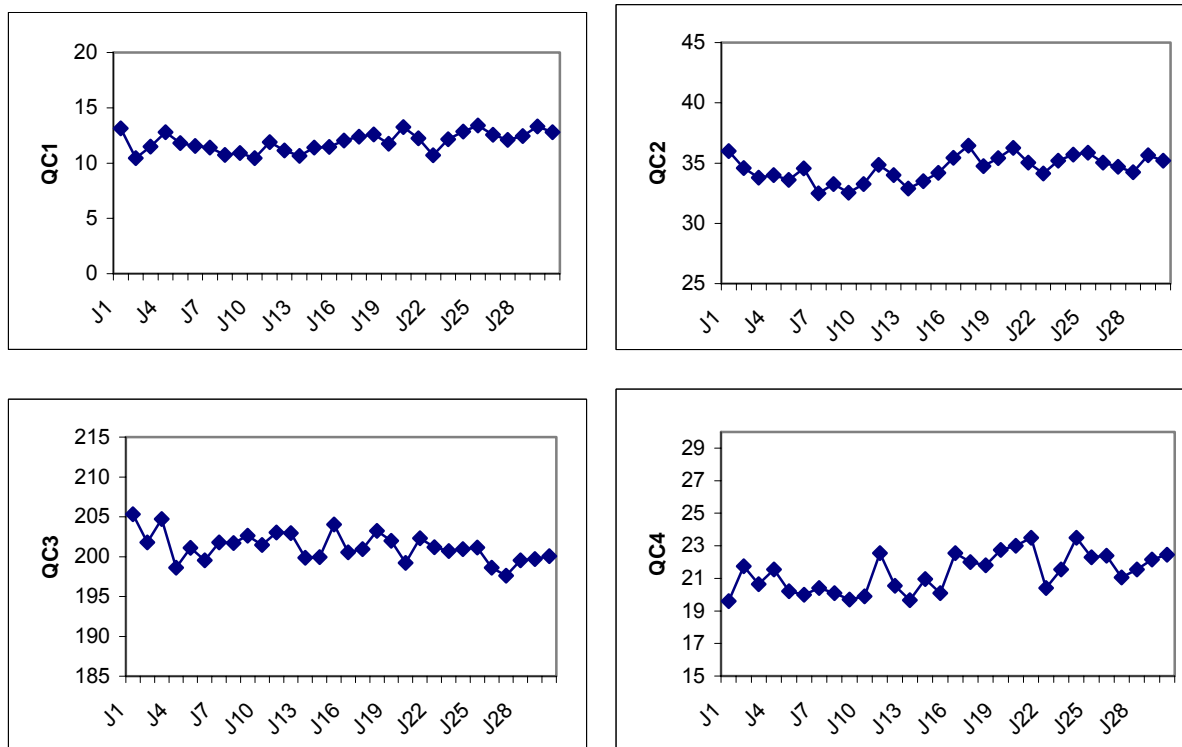


Figure 18 : Suivi des contrôles de qualité passés quotidiennement pendant un mois.

	QC1	QC2	QC3	QC4
Moyenne (µM)	11,64	34,22	201,54	21,12
Ecart-type (µM)	0,77	1,12	1,63	1,23
Coefficient de variation (CV) %	6,58	3,29	0,81	5,83

Tableau 21 : Caractéristiques des contrôles de qualité

Un mois après la calibration, les contrôles passés quotidiennement rendent toujours des valeurs correctes, avec des CV inférieurs aux CV limites calculés à partir de l'intervalle de confiance du CV (6,85% pour QC1, 3,69% pour QC2, 1,40% pour QC3 et 6,27% pour QC4), ce qui signifie que la calibration est stable un mois au minimum.

II.2 - Intervalles de référence :

Les valeurs de carnitine libre et totale ont été mesurées dans le plasma de 123 volontaires adultes (47 hommes et 76 femmes). L'âge moyen est de 42 ans (16 à 81 ans). Les résultats figurent dans le tableau 22.

	CL (μM)	CT (μM)	CE (μM)	CE/CL
Moyenne	33,77	46,62	12,84	0,397
Médiane	33,40	46,90	12,50	0,398
Min.	10,80	15,30	0,10	0,0031
Max.	58,4	75,70	26,40	0,833
Ecart-type	9,62	12,08	4,65	0,143
Intervalle	24,15 – 43,39 33,77 ± 9,62	34,54 – 58,70 46,62 ± 12,08	8,19 – 17,49 12,84 ± 4,65	0,254 – 0,540 0,397 ± 0,143

Tableau 22 : Taux de carnitine chez des volontaires sains

Les intervalles de référence que nous obtenons sont en accord avec les données de la littérature (cf. 1^{ère} partie VII).

II.3 - Etude de coût

En recensant les prix de tous les matériels et réactifs nécessaires au dosage, nous arrivons à un prix moyen de 2,92 euros par test. Or nous réalisons au minimum 4 tests par patient (dosage en double de la CL + dosage en double de la CT). Le total est donc de $2,92 \times 4 = 11,68$ euros par patient, plus un filtre Amicon nécessaire à l'ultrafiltration (4 euros), ce qui fait un total de **15,68 euros par patient** (en tenant compte des contrôles passés à chaque série, il faut rajouter 1,46 euros par patient pour une série de 16 patients).

Rappelons que ce dosage est coté B120 à la nomenclature (prix du B= 0,27 €) soit 32,40 €.

III - DISCUSSION

Nous décrivons ici une méthode pour la détection de la carnitine libre et totale dans le plasma, mise au point sur l'automate X-Pand[®] Dimension (société Dade-Behring). L'automate utilise une réaction colorimétrique bien connue désormais, basée sur la mesure de la fonction SH du coenzyme A libre. Dans la mesure où les protéines sont une source importante de résidus thiols, elles peuvent interférer avec cette réaction. Cette interférence protéique est éliminée par ultrafiltration des échantillons de plasma. L'ultrafiltration s'avère être plus appropriée que la précipitation acide, la dénaturation par la chaleur ou la congélation-décongélation, car c'est une méthode simple, précise et stable quant à des variations de pH [147]. De plus, c'est une technique de déprotéinisation très efficace qui élimine plus de 99% des protéines plasmatiques [67] [148]. Enfin, son utilisation est particulièrement adaptée à des dosages pratiqués en routine. L'ultrafiltration a un coût supérieur à celui des autres techniques de déprotéinisation, mais elle permet de limiter le coût en personnel et la durée totale de l'analyse.

Notre procédure est la deuxième méthode décrite pour le dosage de la carnitine libre et totale sur le X-pand[®] Dimension, après celle de Ghoshal et al.. [69] en juin 2005. Les résultats obtenus pour la validation technique sont tout à fait satisfaisants : cette méthode spectrophotométrique est précise, simple et rapide (les résultats sont obtenus en moins de 20 minutes). En revanche c'est une méthode moins sensible que la méthode radioisotopique (10 nM versus 50 à 100 pM) [149]).

Les caractéristiques du dosage de CL et CT mis au point sur le X-Pand[®] (rassemblées dans le tableau 23) apparaissent très concluantes. La limite de détection et la linéarité sont acceptables par rapport au domaine de mesure habituellement exploité. La limite de détection (4 μ M) peut parfois être atteinte dans le cadre des dosages en biologie clinique, lors de déficits en carnitine, notamment chez l'hémodialysé. Cette valeur est cohérente par rapport à celle obtenue par Ghoshal et al.. [69] (5 μ mol/l) et par les autres auteurs, quelle que soit la méthode automatisée.

Répétabilité	Reproductibilité	Limite de détection	Linéarité	Coefficient de corrélation
CVmax= 3,517 %	CVmax= 8,023 %	3 µM	3,91-250 µM	0,979 (CL et CT)
Stabilité des réactifs à bord	Stabilité des calibrateurs	Prix de revient par test	Prix de revient par patient	Valeurs de référence
5 jours	1 mois au minimum	2,92 €	15,68 €	CL=24,15-43,39 CT=34,54-58,70

Tableau 23 : Récapitulatif des résultats analytiques de l'évaluation

En revanche l'exactitude semble être le point faible de cette méthode, notamment en ce qui concerne la CT, pour laquelle la méthode sur X-Pand[®] donne des valeurs en moyenne 10% supérieures aux valeurs théoriques. Il est possible que cette inexactitude provienne de l'étape d'hydrolyse que nous faisons subir à l'ultrafiltrat. En effet, nous multiplions (à défaut) par 2 les résultats de CT rendus par l'automate, compte tenu de la dilution effectuée lors de l'hydrolyse. Or, en réalité, le facteur de dilution est plus proche de 1,8, dans la mesure où le volume d'acide chlorhydrique servant à neutraliser l'échantillon n'est pas exactement de 100 µL, mais plutôt 75 µL.

La stabilité des réactifs à bord (5 jours), et celle de la solution de calibration (un mois au minimum) sont largement compatibles avec une utilisation en routine, d'autant que les dosages peuvent être réalisés par séries, sur des échantillons dont la stabilité n'est pas altérée par la congélation.

Les interférences habituelles telles que l'hémolyse, la bilirubine et les triglycérides n'interviennent pas ici du fait de l'ultrafiltration.

La comparaison avec la méthode par spectrométrie de masse montre une bonne corrélation. Cependant, il est observé un biais négatif pour la méthode sur X-Pand[®] respectivement de 15,3% et de 11,7% pour la CL et la CT. Il est difficile de comparer ces résultats à ceux de la littérature car les auteurs comparent le plus souvent la méthode spectrophotométrique à la méthode radioenzymatique. Cependant, il est possible que la solution de calibration soit à l'origine des moindres valeurs obtenues par notre méthode. L'étape d'ultrafiltration pourrait également jouer un rôle. Il serait également intéressant de comparer par la suite la méthode spectrophotométrique sur Cobas Mira[®] à celle sur X-Pand[®] Dimension.

Les intervalles de référence sont comparables à ceux obtenus dans la littérature (tableau 24). Cette méthode est caractérisée par sa fiabilité et son automatisation et donc sa capacité à être employée dans un laboratoire de routine.

REFERENCES	n	CL ($\mu\text{mol/l}$)	CT ($\mu\text{mol/l}$)	CE ($\mu\text{mol/l}$)	CE/CL
<u>Lennon et al. (1986) [100]</u> Hommes Femmes	28 14 14	33.4 \pm 7.8 35.4 \pm 8.8 33.4 \pm 7.8	41.4 \pm 12.0 43.0 \pm 12.3 39.9 \pm 12.0	8.2 \pm 7.1 7.6 \pm 7.3 8.7 \pm 7.3	
<u>Schmidt-Sommerfeld et al. (1988) [20]</u> Hommes Femmes (min – max)	21 20	43.8 \pm 7.3 34.2 \pm 7.1 (25.4 – 54.1)	61.5 \pm 10.7 46.1 \pm 9.3 (33.8 – 77.5)	17.7 \pm 7.5 12.0 \pm 5.2 (5.4 – 30.1)	0.41 \pm 0.18 0.36 \pm 0.15 (0.11 – 0.78)
<u>Harper et al. (1993) [79]</u> Hommes Femmes (min – max)	13 16	41.3 \pm 4.9 36.7 \pm 8.3 (22.7 – 52.2)	47.0 \pm 5.4 42.7 \pm 10.3 (22.6 – 62.3)	5.7 \pm 4.1 6.0 \pm 4.2 (0 – 14.1)	
<u>Boulat et al. (1993) [80]</u> Hommes Femmes (min – max)	160 180	37.8 \pm 6.6 31.7 \pm 6.9 (14 – 53)	43.6 \pm 7.3 38.1 \pm 7.6 (18 – 60)	5.8 \pm 4.9 6.47 \pm 3.3 (1 – 21)	0.159 \pm 0.1 0.214 \pm 1.12 (0.02 – 0.65)
<u>Güneral (1995) [81]</u> Hommes et Femmes (min – max)	18	52.2 \pm 11.9 (33.5 – 67.1)	59.6 \pm 11.9 (40.9 – 74.5)	7.6 \pm 0.6 (7.4 – 9.3)	0.19 \pm 0.03 (0.14 – 0.22)
<u>Seccombe et al. (1976) [70]</u> Hommes et Femmes (min – max)	47		49.4 \pm 12.2 (25.0 – 73.8)		
<u>Cerderblad et al. (1971) [2]</u> Hommes et Femmes (min – max)	33		46.2 \pm 14.2 (17.8 – 74.6)		
<u>Böhmer et al. (1974) [3]</u> Hommes et Femmes (min – max)	30		43.1 \pm 8.9 (25.3 – 60.9)		
<u>Di Mauro et al. (1973) [12]</u> Hommes et Femmes (min – max)	23		46.0 \pm 13.0 (20.0 – 72.0)		
<u>Dragsholt et al. (1987) [150]</u> Hommes et Femmes (min – max)	33		52.1 \pm 10.2 (31.9 – 72.3)		
<u>Kühn et al. (1981) [151]</u> Hommes et Femmes (min – max)	35		50.5 \pm 7.0 (36.5 – 64.5)		

Tableau 24 : Intervalles de références des différentes fractions de carnitine selon les données de la littérature

QUATRIÈME PARTIE :
ETUDE DE LA CARNITINE
CHEZ LE PATIENT HEMODIALYSE

I - INTERVALLES DE REFERENCE

I.1 - RECRUTEMENT DE TEMOINS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les témoins utilisés dans cette étude sont les 123 volontaires sains. La CL et CT ont été dosés comme décrit précédemment (cf. 3^{ème} partie)

I.2 - RESULTATS

I.2.1 - Intervalles de référence

Les valeurs moyennes de CL et CT obtenues pour les 123 volontaires sains, hommes et femmes confondus, sont reportées dans le tableau 22 de la 3^{ème} partie.

I.2.2 - Intervalles en fonction du sexe

Les valeurs de CL, CT, CE et CE/CL ont été analysées en fonction du sexe. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 25 et la figure 19.

	CL		CT		CE		CE/CL	
	H (n = 47)	F (n = 75)	H (n = 47)	F (n = 75)	H (n = 47)	F (n = 75)	H (n = 47)	F (n = 75)
Moyenne	39,15	30,45	53,11	43,13	13,96	12,68	0,375	0,429
Médiane	38,7	30,7	52,2	43	13,05	12,4	0,335	0,424
Min.	20,65	10,8	28,3	15,3	6,15	0,1	0,14	0,003
Max.	58,4	55,2	75,7	65,6	27,15	26,4	0,889	0,833
Ecart-type	8,92	8,5	10,64	11,51	5,08	4,9	0,166	0,15
Intervalle	30,23- 48,07	21,95- 38,95	42,47- 63,75	31,62- 54,64	8,88- 19,04	7,78- 17,58	0,209- 0,541	0,279- 0,579
	39,15 ± 8,92	30,45 ± 8,5	53,11 ± 10,64	43,13 ± 11,51	13,96 ± 5,08	12,68 ± 4,9	0,375 ± 0,166	0,429 ± 0,15
P (Student)	<0,0001		<0,0001		0,17		0,06	

Tableau 25 : Taux de carnitine chez les témoins : variations en fonction du sexe

(Hommes = H ; Femmes = F)

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

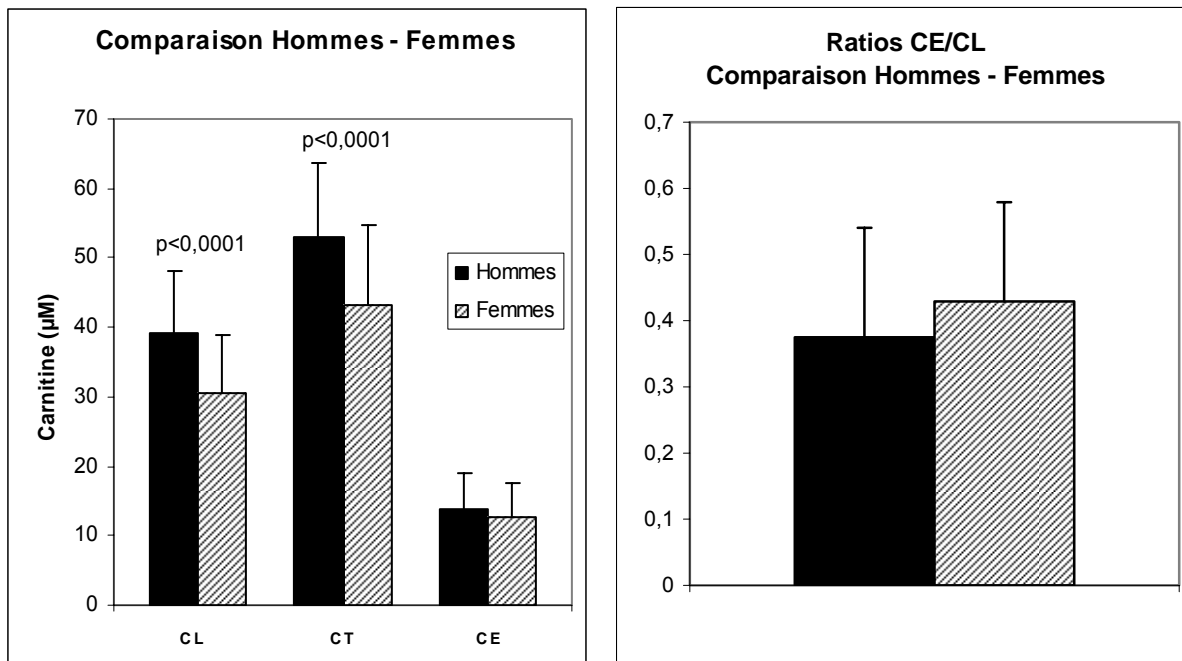


Figure 19 : Taux de carnitine (μM) et ratio CE/CL en fonction du sexe

Une différence significative est observée entre l'homme et la femme en ce qui concerne la CL et la CT, à l'inverse de la CE et du rapport CE/CL pour lesquels il n'a été observé aucune différence significative.

I.2.3 - Intervalles en fonction de l'âge

La répartition des valeurs a été analysée en fonction de l'âge (tableaux 26 et 27 et figure 20).

Pour cela, nous avons distingué trois tranches d'âge :

≤ 45 ans (n= 72)

$> 45 - \leq 60$ ans (n= 38)

> 60 ans (n= 13)

	CL (μM)			CT (μM)			CE (μM)			CE/CL (μM)		
	≤ 45 ans	45-60 ans	>60 ans	≤ 45 ans	45-60 ans	>60 ans	≤ 45 ans	45-60 ans	>60 ans	≤ 45 ans	45-60 ans	>60 ans
Moyenne	32,11	35,31	38,5	44,06	50,42	52,78	11,95	15,10	14,28	0,393	0,438	0,403
Médiane	20,67	21,6	26,24	27,71	30,57	34,47	8,24	10,15	9,69	0,275	0,292	0,299
Min.	10,8	19,3	12,25	17,5	28,5	15,3	0,1	6,45	3,05	0,003	0,165	0,173
Max.	56,3	54,25	58,4	67,6	75,7	74,0	26,4	27,15	22,55	0,833	0,773	0,889
Ecart-type	9,232	7,892	13,970	11,360	10,720	16,154	4,533	5,203	5,112	0,156	0,146	0,195

Tableau 26 : Variation des taux de carnitine en fonction de l'âge

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

p (Student)	CL		CT		CE		CE/CL	
	45-60 ans	> 60 ans	45-60 ans	> 60 ans	45-60 ans	> 60 ans	45-60 ans	> 60 ans
≤ 45 ans	0,07	0,13	p < 0,01	0,08	p < 0,01	0,14	0,15	0,86
45-60 ans	X	0,45	X	0,63	X	0,62	X	0,56

Tableau 27 : Test de Student (p) comparant les trois tranches d'âge de témoins

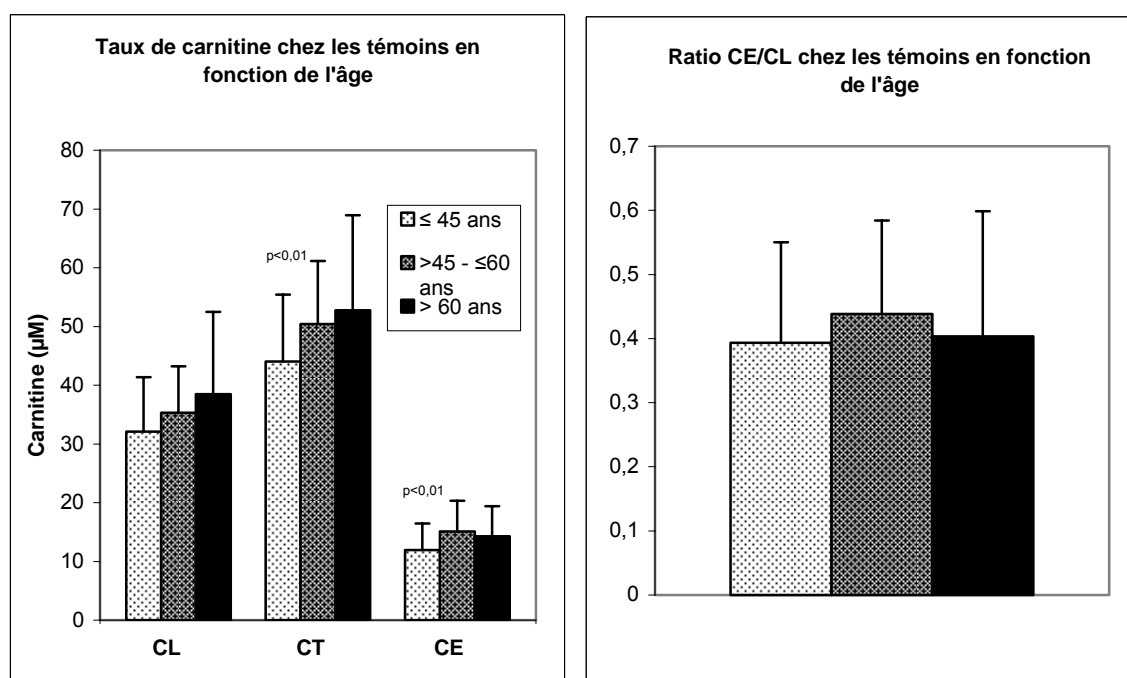


Figure 20 : Taux de carnitine (µM) et rapport CE/CL chez les témoins en fonction de l'âge

Nous observons une augmentation progressive des taux de carnitine avec l'âge (figure 20), mais cette variation n'est significative (tableau 28) qu'entre 45 et 60 ans pour CT et CE. En revanche le ratio CE/CL est relativement constant avec l'âge, ce que confirme le test de Student qui ne met pas en évidence de différence significative pour ce paramètre.

II - ETUDE DES PATIENTS HEMODIALYSES

II.1 - RECRUTEMENT

Notre étude a porté sur 81 patients au total :

- 32 patients du service d'hémodialyse du CHU de Brest
- 49 patients de l'AUB (Association des Urémiques de Bretagne)

La moyenne d'âge est de 64,5 ans, et le ratio Homme/Femme est égal à 1,22.

Un échantillon sanguin a été prélevé avant la dialyse de milieu de semaine, afin d'évaluer leur statut en carnitine.

Pour les patients du CHU, nous avons prélevé un deuxième échantillon sanguin après cette même séance de dialyse. Ce deuxième échantillon a été prélevé avant que ne soit ajouté au dialysat, si le patient est traité, une dose de Lévocarnil[®]. Pour ces mêmes patients, nous avons également recensé les types de membranes utilisées pour la dialyse.

Pour tous les patients, le tampon utilisé lors des dialyses est du tampon bicarbonate.

II.2 - VALEURS DE CARNITINE LIBRE ET TOTALE AVANT DIALYSE : STATUT DES PATIENTS EN CARNITINE

II.2.1 - Valeurs globales

II.2.1.1 - Valeurs de carnitine chez 65 patients hémodialysés

Sont exclus ici les patients traités par [®] ou ayant arrêté ce même traitement depuis moins de trois mois. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant (tableau 28) :

	CL (μM)	CT (μM)	CE (μM)	CE/CL
Moyenne	23,98	43,13	19,15	0,902
Médiane	20,35	36,1	15,1	0,793
Min.	6,1	16	4,55	0,244
Max.	93,75	211,2	117,45	4,377
Ecart-type	15,73	30,00	16,13	0,59
Intervalle	8,25 – 39,71 23,98 \pm 15,73	13,13 – 73,13 43,13 \pm 30,00	3,02 – 35,28 19,15 \pm 16,13	0,312 – 1,492 0,902 \pm 0,59

Tableau 28 : Taux en carnitine chez des patients hémodialysés (n=65)

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

II.2.1.2 – Analyse comparée Patients – Témoins

Nous avons comparé les résultats observés chez les patients à ceux trouvés chez les témoins (tableau 29 et figure 21).

	CL (μM)		CT (μM)		CE (μM)		CE/CL	
	Témoins (n=123)	Patients (n=65)	Témoins (n=123)	Patients (n=65)	Témoins (n=123)	Patients (n=65)	Témoins (n=123)	Patients (n=65)
Moyenne	33.77	23.98	46.62	43.13	12,84	19.15	0.397	0.902
Médiane	33.4	20.35	46.90	36.10	12.50	15.1	0.398	0.793
Min.	10.8	6.1	15.3	16	0.1	4.55	0.0031	0.244
Max.	58.4	93.75	75.7	211.2	26.40	117.45	0,833	4.377
Ecart-type	9.62	15.73	12.08	30.00	4.65	16.13	0.143	0.59
Différence	- 29,0%		- 7,49%		+ 49,1%		+ 127,2%	
p (Student)	p < 0,0001		0.33		p < 0,01		p < 0,0001	

Tableau 29 : Comparaison Témoins – Patients avant dialyse

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

La concentration de CT est pratiquement identique pour les Témoins et pour les Hémodialysés. Cependant si nous n'avons pas mis en évidence de différence significative, la CT est légèrement inférieure (8 %) chez les patients (soit 92,5 % de la valeur trouvée chez les témoins).

En revanche, concernant la CL, une différence très significative est observée entre les deux groupes, puisque la CL est de 29 % plus basse chez les patients que chez les témoins (elle représente environ 71 % de la valeur retrouvée chez les témoins). De même, les taux de CE et

les ratios sont significativement plus élevés dans le groupe « patients » (+ 45 % pour la CE, et + 127 % pour le ratio CE/CL).

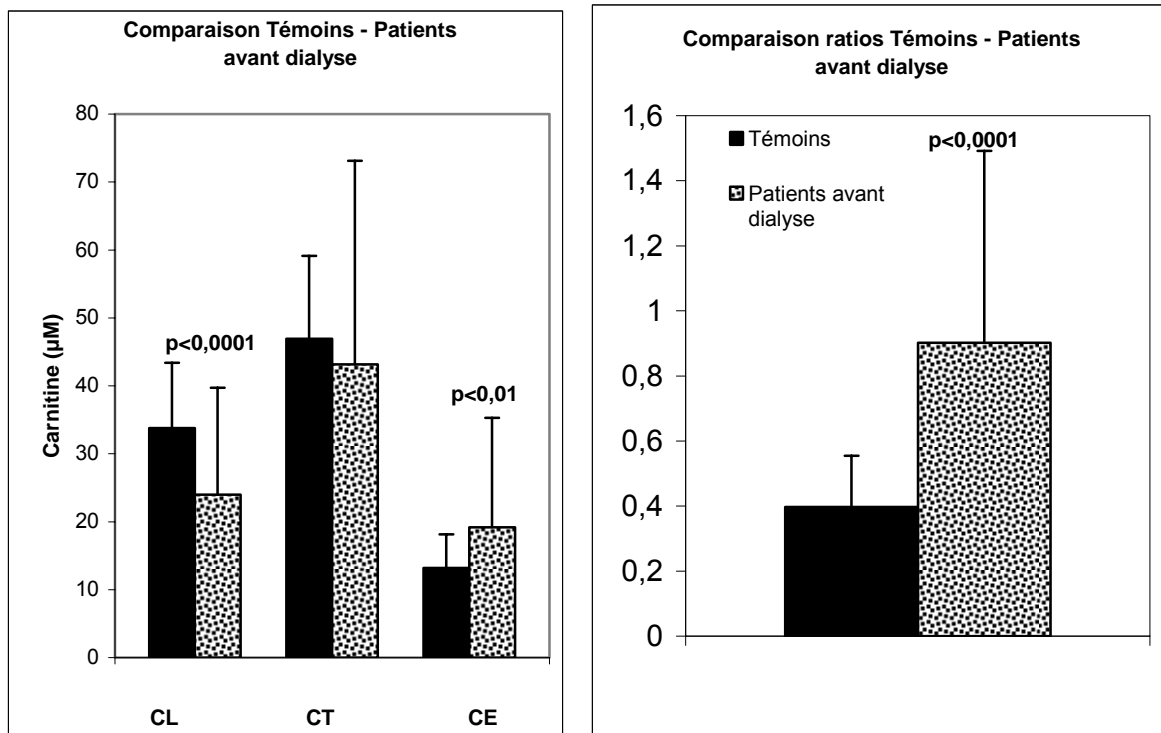


Figure 21 : Comparaison des taux et ratios de carnitine des patients avant dialyse et des témoins

II.2.1.3 - Influence d'un traitement par Lévocarnil® sur le statut en carnitine des patients

Selon le statut nutritionnel du patient, son état hémodynamique et son degré de résistance à l'érythropoïétine (EPO), le clinicien décide de lui administrer de la L-carnitine en ampoule injectable, directement dans le bain de dialyse, juste avant la fin de la séance. Nous avons analysé le statut de chacun du groupe supplémenté en L-carnitine par rapport au groupe témoin.

	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL	
	Témoins (n = 123)	Lévo + (n = 15)	Témoins (n = 123)	Lévo + (n = 15)	Témoins (n = 123)	Lévo + (n = 15)	Témoins (n = 123)	Lévo + (n = 15)
Moyenne	33,77	294,31	46,62	433,42	12,84	139,10	0,397	0,6247
Médiane	33,4	311,3	46,9	449,4	12,5	132,2	0,398	0,5886
Min.	10,8	10,35	15,3	24,5	0,1	14,15	0,0031	0,2332
Max.	58,4	495,1	75,7	786,5	26,4	291,4	0,8326	1,3671
Ecart-type	9,62	166,49	12,08	227,44	4,65	74,33	0,1434	0,3314
Différence de taux	+ 772%		+ 830%		+ 983%		+ 57%	
p Student	p < 0,001		p < 0,0001		p < 0,0001		p < 0,05	

Tableau 30 : Comparaison du statut des témoins et des patients sous Lévocarnil® (Lévo +)
(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

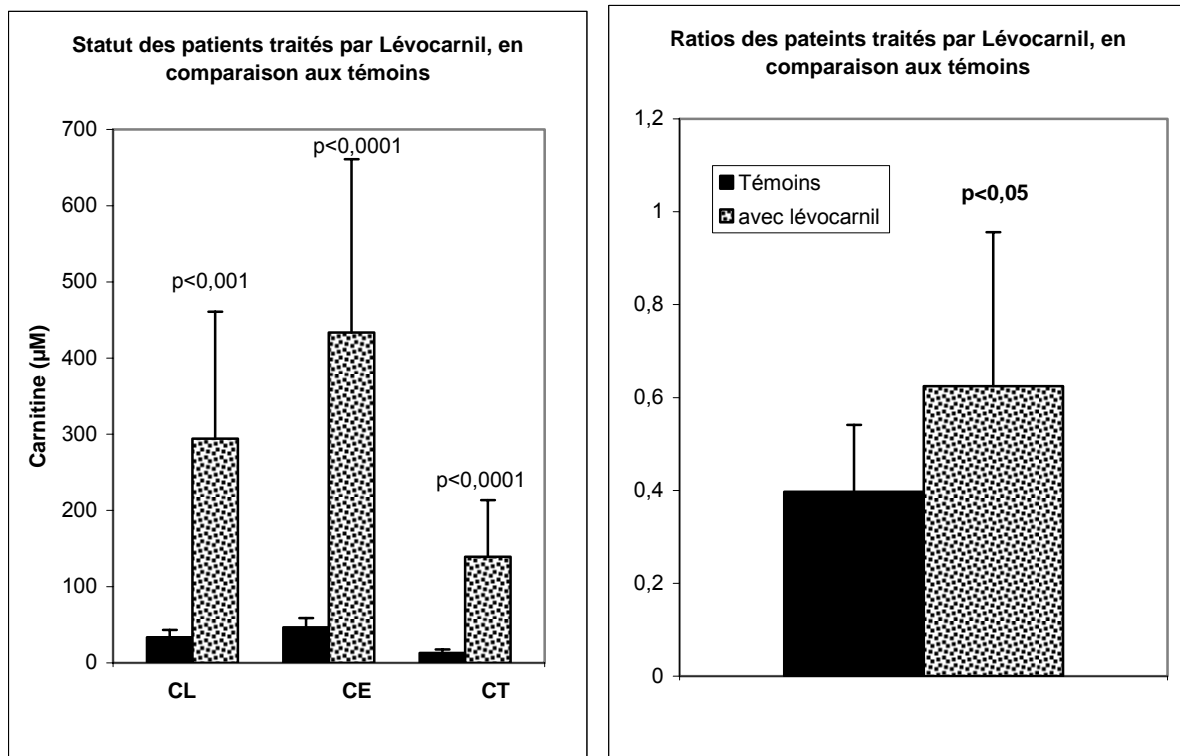


Figure 22 : Comparaison des taux de carnitine des patients traités par Lévocarnil® à ceux des témoins

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

Une différence très significative est observée entre les taux de carnitine des patients traités par Lévocarnil® et les témoins (tableau 30 et figure 22). Contrairement aux patients non traités (qui présentent des taux de carnitine nettement abaissés par rapport aux témoins), les patients

supplémentés ont des carnitinémies nettement supérieures à celles des témoins (plus de 700 % supérieure), alors que le ratio, lui est d'environ 50 % plus élevé.

II.2.1.4 - Comparaison entre patients traités et non traités

	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL	
	Lévo - (n=65)	Lévo + (n=15)	Lévo - (n=65)	Lévo + (n=15)	Lévo - (n=65)	Lévo + (n=15)	Lévo - (n=65)	Lévo + (n=15)
Moyenne	23,98	294,31	43,13	433,42	19,15	139,10	0,622	0,624
Médiane	15,73	311,3	36,1	449,4	15,1	132,2	0,574	0,589
Min.	6,1	10,35	16	24,5	4,55	14,15	0,186	0,233
Max.	93,75	495,1	211,2	786,5	17,45	291,4	1,768	1,367
Ecart-type	15,73	166,49	30,0	227,44	16,13	74,33	0,254	0,331
Différence de taux	132%		905%		626%		0,3%	
P (Student)	p < 0,001		p < 0,0001		p < 0,0001		0,88	

Tableau 31 : Taux de carnitine chez les patients, traités (Lévo +) ou non (Lévo -) par Lévocarnil®

Nous mettons en évidence une différence très significative entre les patients traités (environ 1/5^{ème} des patients) et les patients non traités : les taux de carnitine chez les patients traités sont nettement supérieurs à ceux des patients non traités. Par contre le ratio CE/CL reste extrêmement stable entre ces deux groupes (tableau 31 et figure 23).

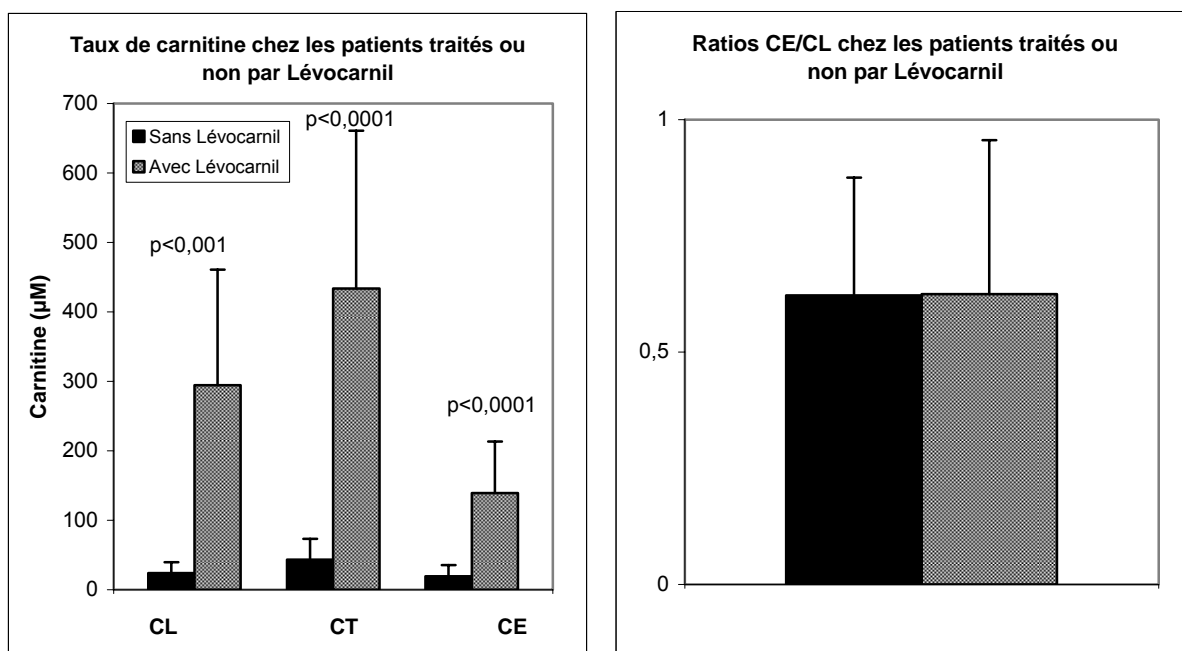


Figure 23 : Taux de carnitine chez les patients, traités ou non par Lévocarnil®
(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

II.2.2 - Influence du sexe

Sur 65 patients non traités par L-carnitine, 34 sont des hommes et 31 des femmes.

▪ Influence du sexe sur les taux de carnitine chez les patients hémodialysés.

	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL	
	H (n = 34)	F (n = 31)	H (n = 34)	F (n = 31)	H (n = 34)	F (n = 31)	H (n = 34)	F (n = 31)
Moyenne	26,16	21,59	46,87	39,03	20,71	17,44	0,909	0,894
Médiane	22,33	18,05	42,1	31,7	15,53	15,05	0,746	0,854
Min.	6,1	8,5	16,6	16,0	4,8	4,55	0,391	0,244
Max.	93,75	78,4	211,2	154,5	117,45	76,1	4,377	2,064
Ecart-type	16,87	14,26	33,63	25,36	18,59	13,01	0,700	0,451
Intervalle	9,29– 43,03	7,33– 35,85	13,24– 80,5	13,67– 64,39	2,12– 39,30	4,43– 30,45	0,209– 1,609	0,443– 1,345
	26,16 ± 16,87	21,59 ± 14,26	46,87 ± 33,63	39,03 ± 25,36	20,71 ± 18,59	17,44 ± 13,01	0,909 ± 0,700	0,894 ± 0,451
P (Student)	0,24		0,30		0,42		0,91	

Tableau 32 : Taux de carnitine chez les patients hémodialysés : différences Hommes (H) – Femmes (F)

Nous ne mettons pas en évidence de différence significative entre l'homme et la femme traités par hémodialyse, quelle que soit la fraction de carnitine étudiée (tableau 32 et figure 24).

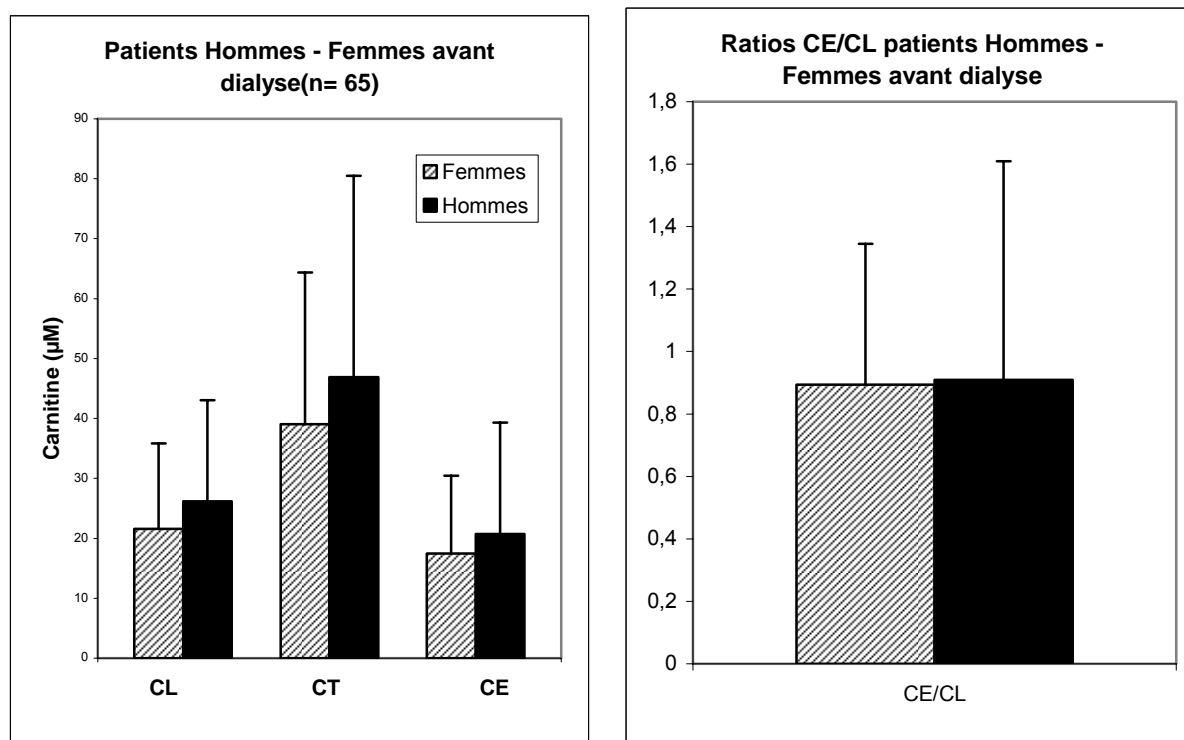


Figure 24 : Taux de carnitine (μM) chez les patients hémodialysés en fonction du sexe

▪ Analyse comparée Patients-Témoins en fonction du sexe :

HOMMES	CL (μM)		CT (μM)		CE (μM)		CE/CL	
	Témoins (n=47)	Patients (n=34)	Témoins (n=47)	Patients (n=34)	Témoins (n=47)	Patients (n=34)	Témoins (n=47)	Patients (n=34)
Moyenne	39,15	26,16	53,11	46,87	13,96	20,71	0,375	0,909
Médiane	38,7	22,33	52,2	42,1	13,05	15,53	0,335	0,746
Min.	20,65	6,1	28,3	16,6	6,15	4,8	0,14	0,391
Max.	58,4	93,75	75,7	211,2	27,15	117,45	0,889	4,377
Ecart-type	8,92	16,87	10,64	33,63	5,08	18,59	0,166	0,700
Intervalle	30,2-48,1	9,3-43,0	42,5-63,8	13,2-80,5	8,9-19,0	2,1-39,3	0,21-0,54	0,21-1,61
	39,2 \pm 8,9	26,2 \pm 16,9	53,1 \pm 10,6	46,9 \pm 33,6	13,9 \pm 5,1	20,7 \pm 18,6	0,38 \pm 0,17	0,91 \pm 0,70
p (Student)	p < 0,0001		0,30		p < 0,05		p < 0,0001	

Tableau 33 : Comparaison des témoins (n=47) et des patients avant dialyse (n=34) de sexe masculin

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

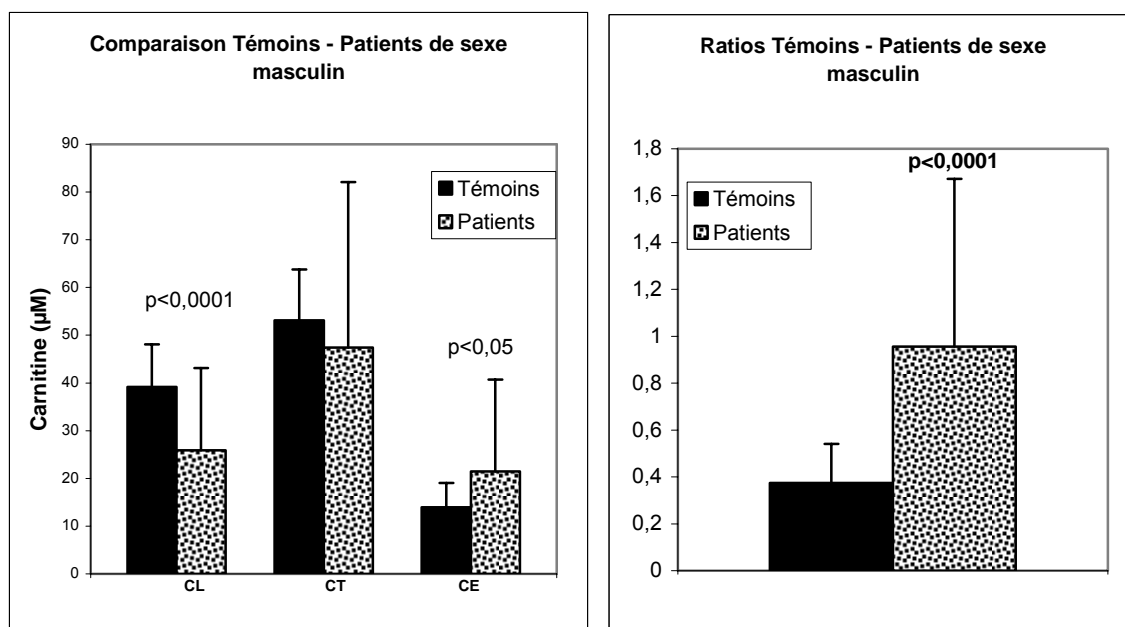


Figure 25 : Comparaison Témoins – Patients de sexe masculin

Nous ne mettons pas en évidence de différence significative en ce qui concerne la carnitine totale. En revanche pour les autres fractions de carnitine, comme finalement pour la comparaison globale, la CL est significativement abaissée chez les patients, alors que la CE et le ratio CE/CL sont significativement augmentés (tableau 33 et figure 25).

FEMMES	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL	
	Témoins (n=76)	Patients (n=31)	Témoins (n=76)	Patients (n=31)	Témoins (n=76)	Patients (n=31)	Témoins (n=76)	Patients (n=31)
Moyenne	30,45	21,59	43,13	39,03	12,68	17,44	0,429	0,894
Médiane	30,7	18,05	43	31,7	12,4	15,05	0,424	0,854
Min.	10,8	8,5	15,3	16,0	0,1	4,55	0,003	0,244
Max.	55,2	78,4	65,6	154,5	26,4	76,1	0,833	2,064
Ecart-type	8,5	14,26	11,51	25,36	4,9	13,01	0,15	0,451
Intervalle	21,9-38,9	7,33-35,85	31,62-54,64	13,67-64,39	7,78-17,58	4,43-30,45	0,279-0,579	0,443-1,345
	30,5 ± 8,5	21,59±14,26	43,13±11,51	39,03±25,36	12,68±4,9	17,44±13,01	0,429±0,15	0,894±0,451
P (Student)	p < 0,01		0,39		p ≈ 0,05		p < 0,0001	

Tableau 34 : Comparaison des témoins (n=76) et des patients avant dialyse (n=31) de sexe féminin

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

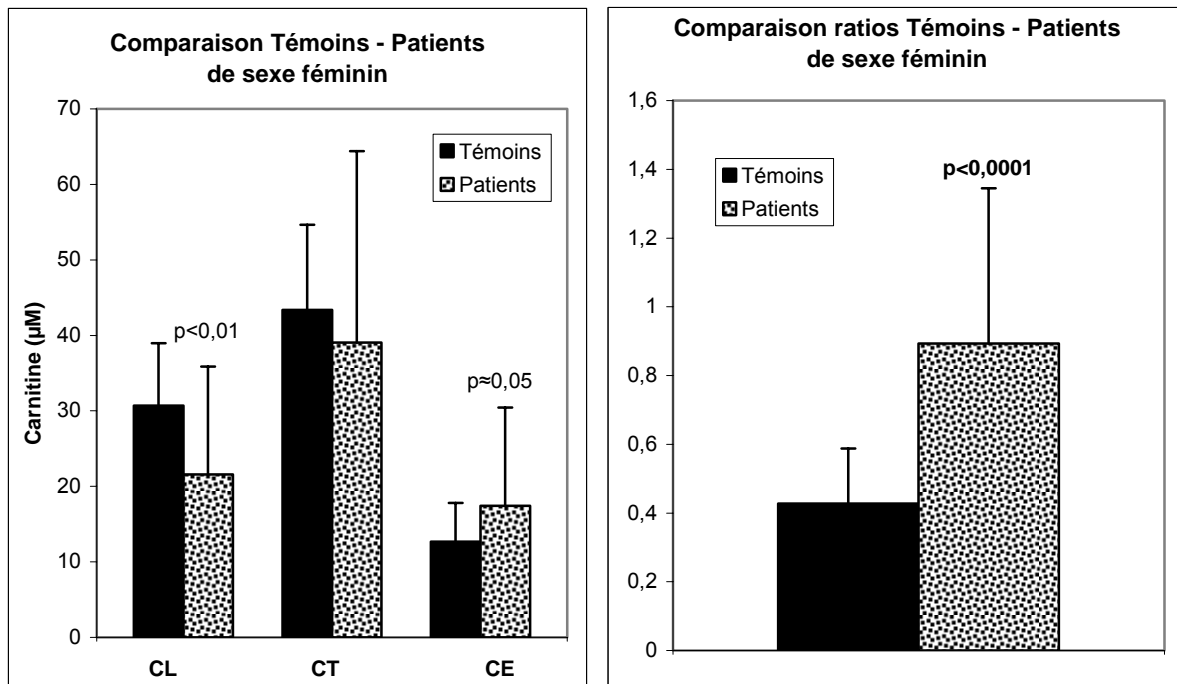


Figure 26 : Taux de carnitine des Témoins et des Patients de sexe féminin

Les taux de carnitine trouvés chez la femme sont inférieurs à ceux de l'homme.

Nous trouvons pour la femme les mêmes résultats comparatifs que pour l'homme, si ce n'est pour la CE, pour laquelle la valeur du p est à la limite de la significativité (tableau 34 et figure 26).

II.2.3 - Influence de l'âge des patients

Pour déterminer s'il existe des différences concernant les taux de carnitine chez les patients hémodialysés en fonction de leur âge, trois tranches d'âge ont été choisies (tableaux 35 et 36 et figure 27) :

≤ 45 ans : n= 7

>45 - ≤ 60 ans : n= 18

> 60 ans : n= 40

	CL (μM)			CT (μM)			CE (μM)			CE/CL		
	≤ 45 ans	45-60 ans	> 60 ans	≤ 45 ans	45-60 ans	> 60 ans	≤ 45 ans	45-60 ans	> 60 ans	≤ 45 ans	45-60 ans	> 60 ans
Moyenne	39,59	25,24	18,00	73,63	45,51	29,36	34,03	20,27	11,36	0,782	0,938	0,358
Médiane	31,05	22,25	16,3	56,5	41,9	28,2	22,2	16,6	11,3	0,750	0,897	0,920
Min.	18,15	8,4	8,5	31,7	21,9	18	10,4	13,5	5,35	0,433	0,554	0,283
Max.	93,75	54,6	32,5	211,2	84,9	45,2	117,4	30,3	15	1,252	1,607	1,117
Ecart-type	26,15	14,30	8,28	62,27	19,54	9,070	37,26	6,423	3,315	0,319	0,897	0,920

Tableau 35 : Taux de carnitine en fonction de l'âge des patients
(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

p (Student)	CL		CT		CE		CE/CL	
	45-60 ans	>60 ans	45-60 ans	>60 ans	45-60 ans	>60 ans	45-60 ans	>60 ans
≤ 45 ans	0,19	0,09	0,36	0,15	0,45	0,23	0,34	0,65
45-60 ans		0,13		0,08		0,07		0,81

Tableau 36 : Test de Student comparant les trois tranches d'âge de patients

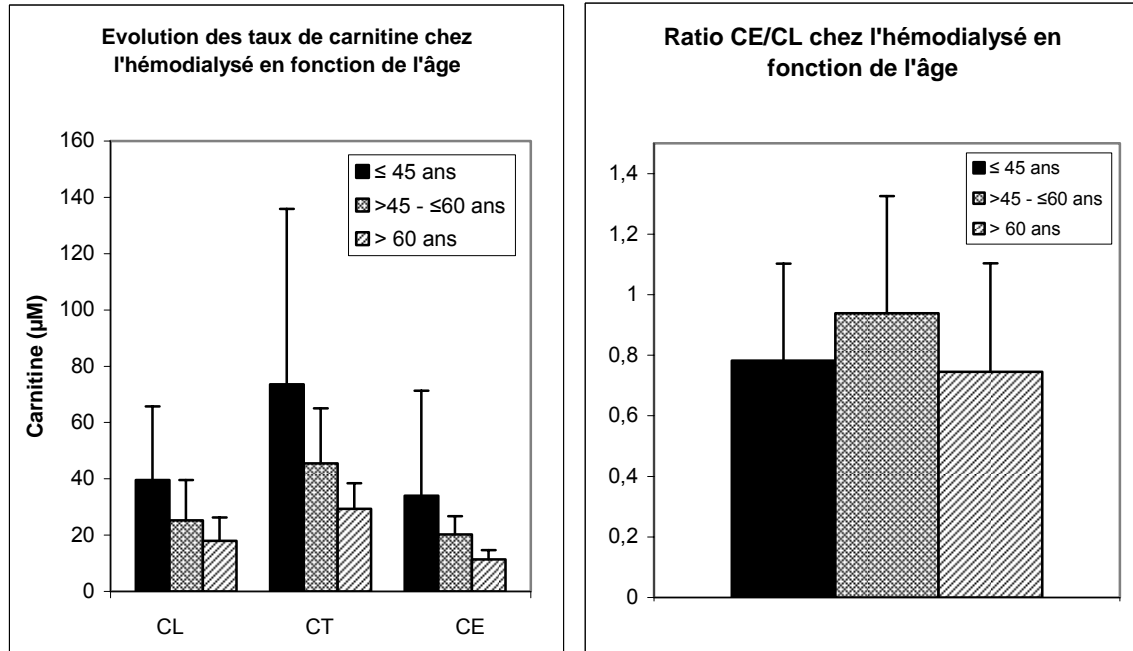


Figure 27 : Taux de carnitine (μM) chez l'hémodialysé en fonction de l'âge

Nous avons observé une baisse progressive des taux de carnitine au fur et à mesure du vieillissement des patients, mais cette baisse n'est pas significative.

Les ratios, eux, restent globalement inchangés.

II.2.4 - Influence de l'ancienneté de la dialyse

L'ancienneté du traitement par hémodialyse n'est pas la même chez tous les patients : elle s'étend de moins de 6 mois à plus de 20 ans.

Nous avons voulu savoir si l'ancienneté de la dialyse chez ces patients avait une influence sur les taux de carnitine. Les résultats sont donnés dans le tableau 37 et la figure 28.

Ancienneté de dialyse		CL (μM)	CT (μM)	CE (μM)	CE/CL
≤ 6 mois (n=17)	Moyenne	29,11	47,53	18,42	0,7029
	Médiane	26,15	46,2	19,03	0,6037
	Min.	7,65	17,4	6,04	0,3975
	Max.	54,6	85,7	36,7	1,3114
	Ecart-type	14,63	21,74	8,21	0,2855
≤ 36 mois (n=14)	Moyenne	24,56	40,81	16,26	0,7620
	Médiane	22,88	42	14,88	0,6318
	Min.	11,6	22,9	10,6	0,3908
	Max.	44,3	62,6	27,2	1,4878
	Ecart-type	10,15	11,84	4,98	0,3655
≤ 60 mois (n=14)	Moyenne	17,86	33,03	15,16	0,9230
	Médiane	15,95	28,65	13,33	0,8381
	Min.	8,4	16,00	4,55	0,2438
	Max.	34,25	58,9	37,25	2,0637
	Ecart-type	8,53	14,36	9,37	0,5259
≤ 120 mois (10 ans) (n=8)	Moyenne	16,76	32,36	15,6	0,9851
	Médiane	17,55	29,95	15,8	0,9005
	Min.	8,5	18	7,5	0,3968
	Max.	25,2	47,2	26,3	1,7882
	Ecart-type	5,41	10,27	6,55	0,4251
≤ 240 mois (20 ans) (n=7)	Moyenne	27,66	56,99	29,32	1,4385
	Médiane	22,25	38,8	23,55	1,0143
	Min.	6,1	30,3	15,35	0,7438
	Max.	78,4	154,5	76,1	4,3770
	Ecart-type	23,54	43,98	21,23	1,2996
> 240 mois (>20 ans) (n=3)	Moyenne	12,08	26,67	14,18	1,2071
	Médiane	11,2	29,1	13,4	1
	Min.	9,35	18,7	9,35	0,8535
	Max.	15,7	31	19,8	1,7679
	Ecart-type	3,27	6,62	5,27	0,4911

Tableau 37 : Etude des taux de carnitine en fonction de l'ancienneté de la dialyse
(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

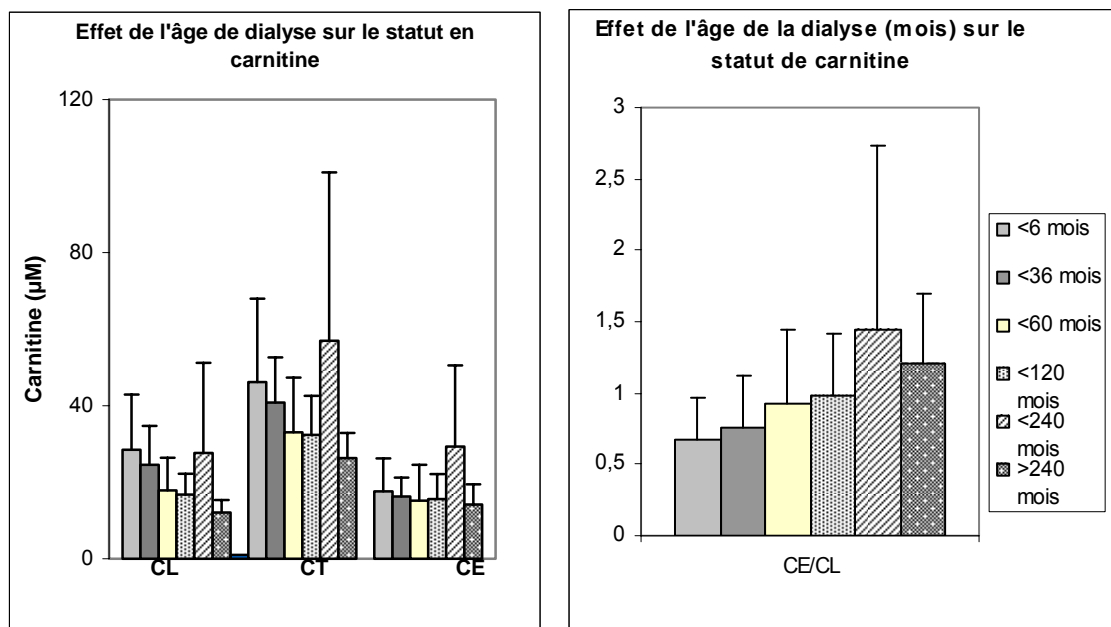


Figure 28 : Effet de l'ancienneté de la dialyse sur les taux de carnitine (CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

Le groupe <240 mois mis à part, les figures montrent assez nettement que, plus la dialyse est ancienne, plus les taux de CL, CT et CE chutent. Mais les taux de CL et CE n'évoluent pas tout à fait de la même manière, car le ratio CE/CL, lui, augmente progressivement au fur et à mesure que les années de dialyse s'accumulent. La CL chute plus vite que la CE.

En comparant les patients hémodialysés depuis moins de 12 mois à ceux hémodialysés depuis plus de 12 mois, nous observons une différence significative entre les valeurs de CL des deux groupes (tableau 38 et figure 29). De même, le ratio du second groupe de patients (hémodialyse depuis plus de 12 mois) est significativement plus élevé que le premier. Pour les autres fractions, aucune différence significative n'est mise en évidence.

	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL	
	≤ 12 mois (n = 16)	>12 mois (n = 46)	≤ 12 mois (n = 16)	>12 mois (n = 46)	≤ 12 mois (n = 16)	>12 mois (n = 46)	≤ 12 mois (n = 16)	>12 mois (n = 46)
Moyenne	28,51	20,82	46,16	38,47	17,65	17,66	0,6782	0,9818
Médiane	24,1	18,1	45,4	35,4	18,95	15,02	0,5858	0,9091
Min.	7,65	6,1	17,4	16	5,35	4,55	0,2838	0,2438
Max.	54,6	78,4	85,7	154,5	36,7	76,1	1,3114	4,3770
Ecart-type	14,38	12,33	21,80	21,38	8,56	11,21	0,2946	0,6591
P (Student)	p < 0,05		0,21		0,99		p < 0,01	

Tableau 38 : Taux de carnitine (µM) en fonction de l'ancienneté de la dialyse

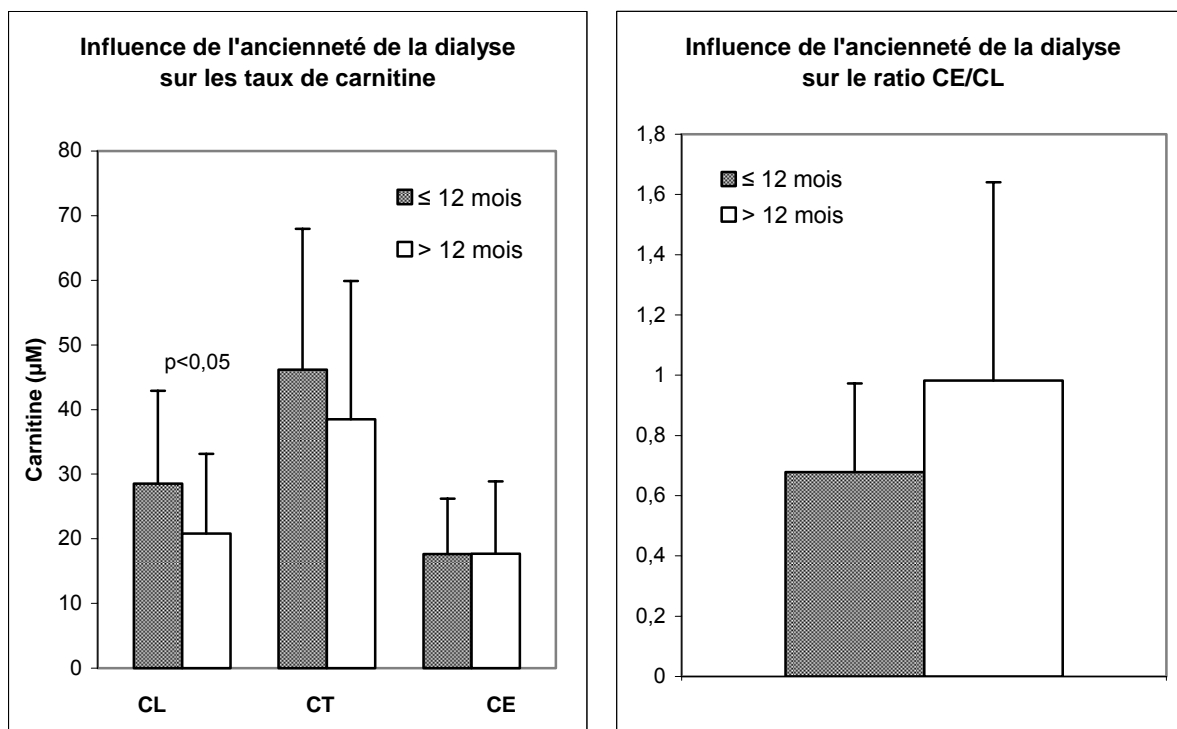


Figure 29 : Influence de l'ancienneté de la dialyse sur les taux de carnitine (μM) (seuil d'ancienneté = 12 mois)

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

II.3 - EVOLUTION DES TAUX AVANT ET APRES DIALYSE : PERTES PERDIALYTIQUES

II.3.1 - Pertes perdialytiques globales

Nous évaluons les pertes perdialytiques globales, tous patients confondus (n=31).

	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL	
	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse
Moyenne	133,47	27,88	200,37	52,42	66,9	24,54	0,7346	2,021
Médiane	33,65	6,6	58,9	18,6	22,95	7,55	0,6216	0,937
Min.	8,5	0,6	18	1,9	5,35	0,65	0,2332	0,134
Max.	495,1	152,7	786,5	231,9	291,4	94,5	1,7679	14,50
Ecart-type	166,0	39,34	235,68	64,65	74,80	29,59	0,3737	3,247
Différence de taux	79%		74%		63%		+ 175%	

Tableau 39 : Taux de carnitine avant et après dialyse : étude des pertes per dialytiques globales (CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

Nous observons une perte per dialytique moyenne de 79%, 74% et 63% respectivement pour la CL, CT et CE. Par contre le ratio CE/CL, lui, augmente de 175% sous l'effet de la dialyse (tableau 39).

Les valeurs de carnitine sont très variables par rapport à la médiane, cela est probablement dû au fait que certains patients sont traités par carnitine, d'autres non.

II.3.2 - Influence d'un traitement par Lévocarnil® sur les pertes per dialytiques

Parmi les 31 patients étudiés, 12 patients reçoivent du Lévocarnil® (solution de L-carnitine injectable) en fin de séance de dialyse, 1 gramme, ou 2 grammes le plus souvent, dans le bain de dialyse.

Voyons comment le traitement par Lévocarnil® influence les pertes per dialytiques de carnitine (tableau 40 et figure 30).

	% perte CL		% perte CT		% perte CE		Evolution ratio CE/CL	
	Lévo - (n=17)	Lévo + (n=12)	Lévo - (n=17)	Lévo + (n=12)	Lévo - (n=17)	Lévo + (n=12)	Lévo - (n=17)	Lévo + (n=12)
Moyenne	-0.792	-0.806	-0.805	-0.748	-0.848	-0.660	+0.095	+0.759
Médiane	-0.810	-0.914	-0.812	-0.763	-0.868	-0.668	+0.347	+1.000
Min.	-0.991	-0.926	-0.972	-0.840	-1.62	-0.875	-2.93	-0.359
Max.	-0.514	-0.692	-0.606	-0.630	0.486	-0.467	+3.00	+3.86
Ecart-type	0.131	0.073	0.105	0.067	0.243	0.148	1.218	1.199
P (Student)	0.74		0.17		0.06		0.10	

Tableau 40 : Pertes perdiaalytiques chez des patients traités ou non par Lévocarnil[®]

Nous ne mettons pas en évidence de différence significative entre les taux de carnitine des patients traités par Lévocarnil[®], et ceux des patients non traités : La supplémentation en Lévocarnil[®] n'a aucune influence sur les pertes perdiaalytiques de carnitine.

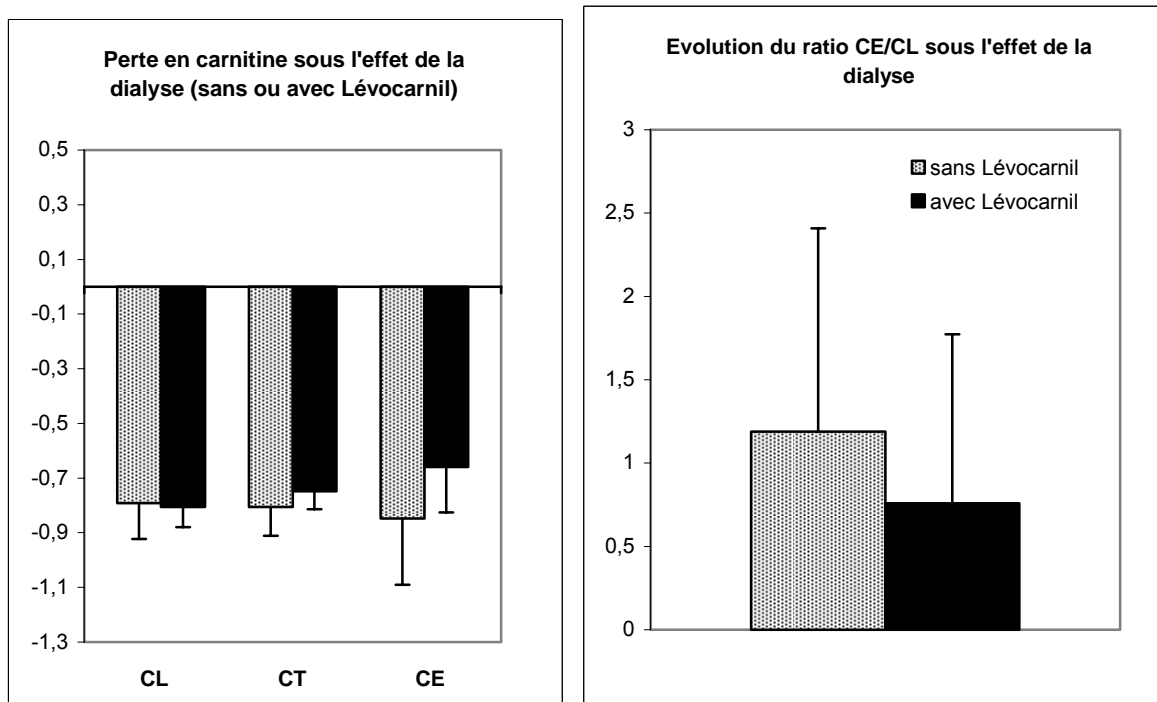


Figure 30 : Effet de la dialyse sur les taux de carnitine (μM)

II.3.3 - Statut avant et après dialyse des patients traités et non traités par Lévocarnil[®]

II.3.3.1 – Patients non traités par Lévocarnil[®] (n=19)

Nous avons étudié les pertes perdiaalytiques chez les patients non supplémentés en lévocarnitine (tableau 41 et figure 31).

SANS LEVOCARNIL (n = 17)	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL (µM)	
	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse
Moyenne	28,04	6,21	49,38	10,21	21,33	4,00	0,8424	0,9730
Médiane	22,45	5	42,1	8,5	18,95	2,3	0,9036	0,6338
Min.	8,5	0,65	18	1,9	5,35	0,65	0,2838	0,1340
Max.	78,4	16,2	154,5	24,1	76,1	9,8	1,7679	3,1538
Ecart-type	18,61	4,64	33,14	6,31	15,98	3,12	0,3759	0,8992
Différence de taux	78%		79%		81%		16%	
P (Student)	p < 0,0001		p < 0,0001		p < 0,001		0,51	

Tableau 41 : Teneur plasmatique en carnitine avant et après dialyse des patients non traités par Lévocarnil®

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

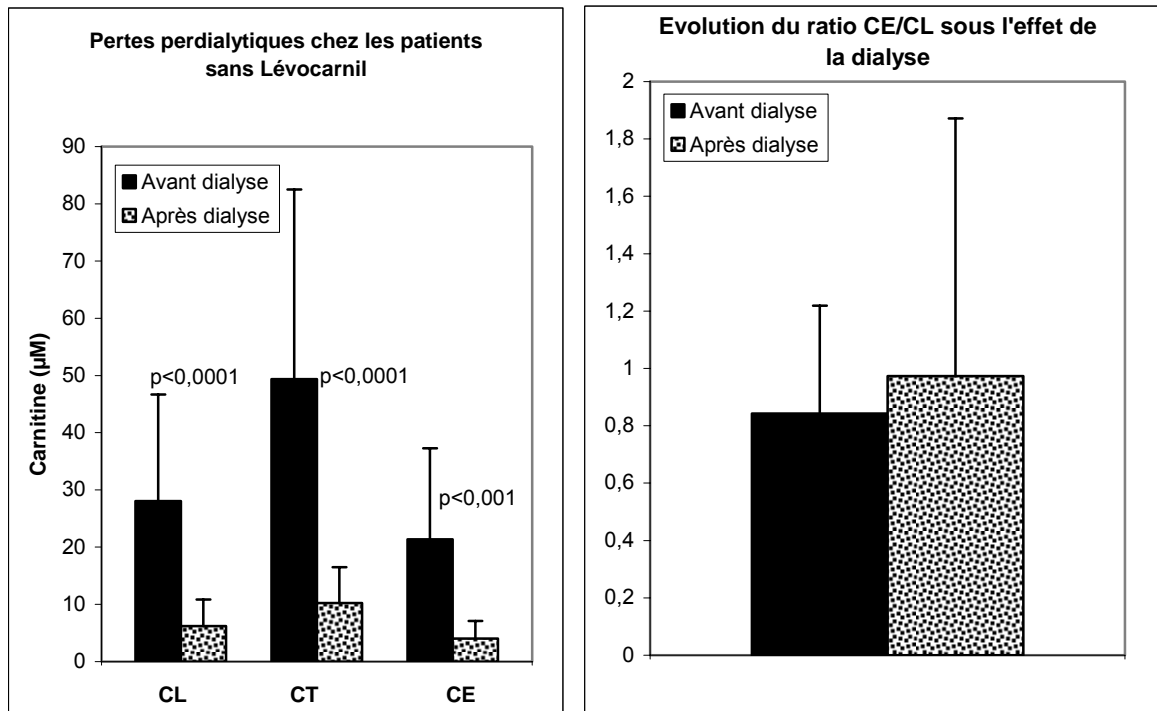


Figure 31 : Pertes perdiaalytiques chez les patients sans traitement par Lévocarnil®

Nous observons une différence très significative entre les taux avant et après dialyse chez les patients non supplémentés en lévocarnitine. Le ratio quant à lui augmente de manière non significative au cours d'une séance de dialyse.

II.3.3.2 – Patients traités par Lévocarnil®

La même étude a été réalisée chez les patients recevant une supplémentation en Lévocarnil® (tableau 42 et figure 32).

AVEC LEVOCARNIL (n = 12)	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL (µM)	
	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse
Moyenne	294,31	71,33	433,42	121,75	139,10	50,43	0,6247	1,079
Médiane	311,3	77,95	449,4	121,3	132,2	47,1	0,5886	0,846
Min.	10,35	1,3	24,5	5	14,15	3,7	0,2332	0,373
Max.	495,1	152,7	786,5	231,9	291,4	94,5	1,3671	2,846
Ecart-type	166,49	46,51	227,44	67,31	74,33	28,03	0,3314	0,833
% de perte	- 75,8%		- 71,9%		- 63,7%		+ 72,7%	
p (Student)	p < 0,0001		p < 0,0001		p < 0,001		0,10	

Tableau 42 : Teneur plasmatique en carnitine avant et après dialyse des patients traités par Lévocarnil®

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

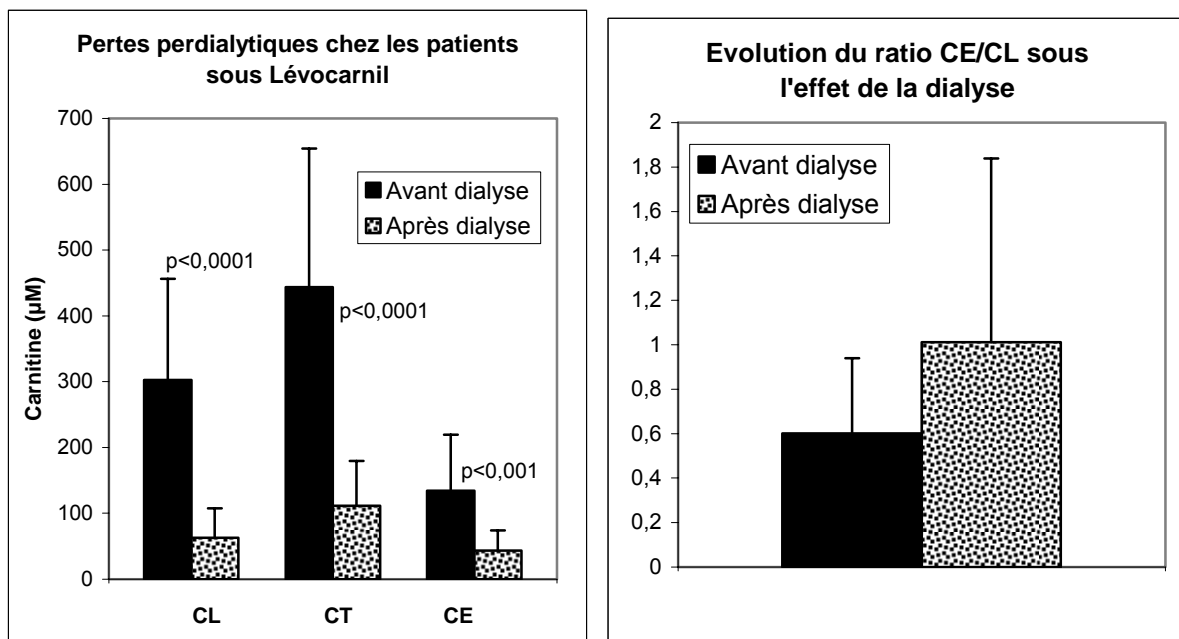


Figure 32 : Pertés per dialytiques chez les patients sous Lévocarnil®

Comme pour les patients non traités, nous mettons en évidence chez les patients supplémentés en Lévocarnil® une différence très significative entre les taux avant et après dialyse de CL, CT et CE, mais pas de différence significative sur le rapport CE/CL

II.3.4 - Statut des patients après dialyse vis-à-vis des témoins

II.3.4.1 – Patients non traités par Lévocarnil®

	CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL (µM)	
	Témoins (n=123)	Après dialyse (n=17)	Témoins (n=123)	Après dialyse (n=19)	Témoins (n=123)	Après dialyse (n=19)	Témoins (n=123)	Après dialyse (n=19)
Moyenne	33,77	6,21	46,62	10,21	12,84	4,00	0,397	0,9730
Médiane	33,4	5	46,9	8,5	12,5	2,3	0,398	0,6338
Min.	10,8	0,65	15,3	1,9	0,1	0,65	0,0031	0,1340
Max.	58,4	16,2	75,7	24,1	26,4	9,8	0,8326	3,1538
Ecart-type	9,62	4,64	12,08	6,31	4,65	3,12	0,1434	0,8992
Différence de taux	- 81,6%		- 78,1%		- 68,8%		+ 145%	
P (Student)	p < 0,0001		p < 0,0001		p < 0,0001		p < 0,05	

Tableau 43 : Comparaison Témoins – Patients traités par Lévocarnil®

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

La CT est la seule fraction de carnitine pour laquelle aucune différence significative n'est observée entre les témoins et les patients non supplémentés par Lévocarnil®. Les autres fractions, sont, elles, significativement abaissées chez les patients par rapport aux témoins (tableau 43 et figure 33).

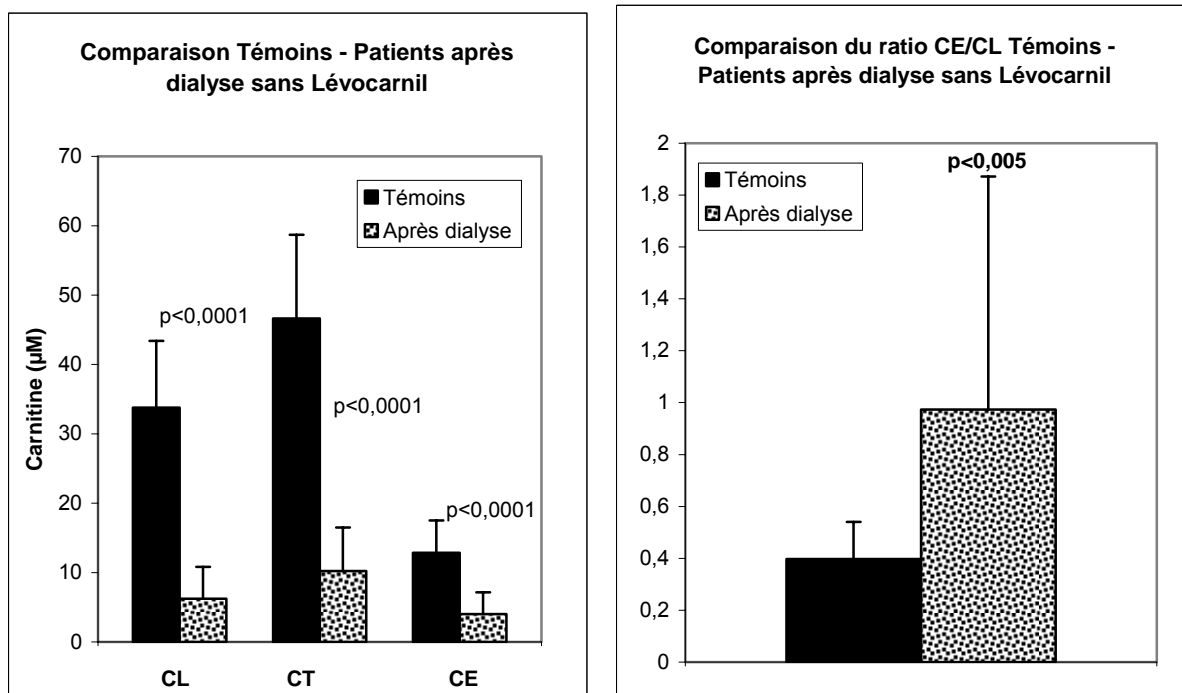


Figure 33 : Comparaison des taux de carnitine (μM) des témoins et des patients après dialyse non traités par Lévocarnil[®]

II.3.4.2 – Patients traités par Lévocarnil[®]

	CL (μM)		CT (μM)		CE (μM)		CE/CL (μM)	
	Témoin (n=123)	Après dialyse (n=12)	Témoin (n=123)	Après dialyse (n=12)	Témoin (n=123)	Après dialyse (n=12)	Témoin (n=123)	Après dialyse (n=12)
Moyenne	33,77	71,33	46,62	121,75	12,84	50,43	0,397	1,079
Médiane	33,4	77,95	46,9	121,3	12,5	47,1	0,398	0,846
Min.	10,8	1,3	15,3	5	0,1	3,7	0,0031	0,373
Max.	58,4	152,7	75,7	231,9	26,4	94,5	0,8326	2,846
Ecart-type	9,62	46,51	12,08	67,31	4,65	28,03	0,1434	0,833
Différence de taux (%)	+ 111%		+ 161%		+ 290%		+171%	
p (Student)	p < 0,05		p < 0,05		p < 0,001		p < 0,05	

Tableau 44 : Comparaison Témoin – patients traités par Lévocarnil[®]

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

Une différence très significative peut être observée pour toutes les fractions de carnitine, entre les témoins et les patients après dialyse traités par Lévocarnil[®] (tableau 44 et figure 34).

Les patients ont des taux plus de 100 fois supérieurs aux témoins, même après dialyse, ce qui signifie que les patients traités par Lévocarnil[®] ont des concentrations supraphysiologiques en carnitine après dialyse.

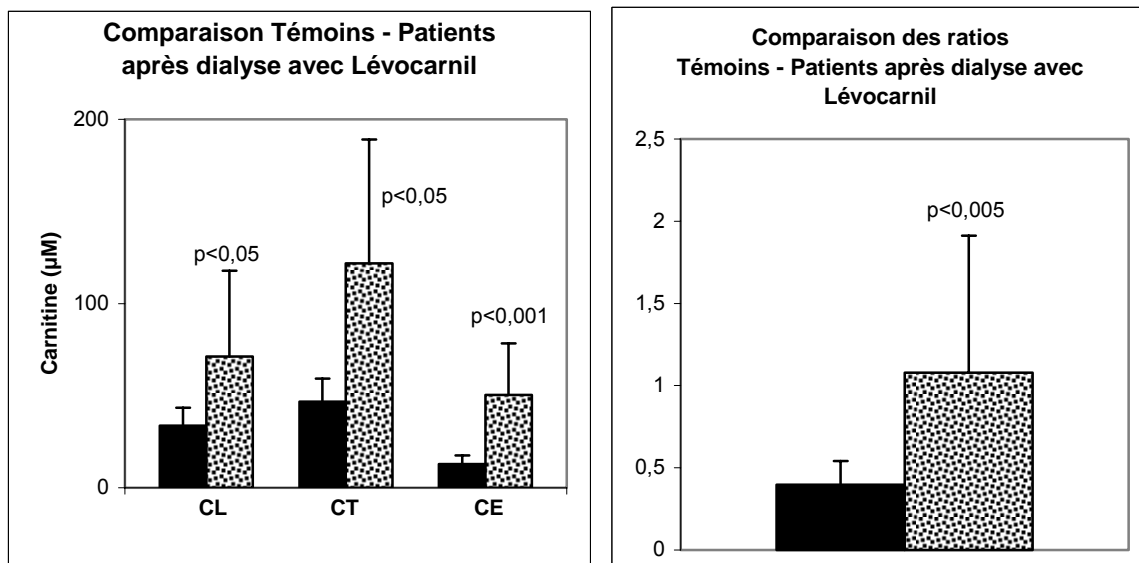


Figure 34 : Comparaison des taux de carnitine (µM) des témoins et patients après dialyse sous Lévocarnil[®]

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

II.3.5 - Influence du type de membrane de dialyse utilisée

Nous avons cherché à savoir si le type de membrane utilisée intervient sur la fuite dialytique de carnitine.

Sur les 26 patients dont nous connaissons le type de membrane employée,

- 11 requièrent la membrane de type 1 (Crystal 4000 en copolymère d'acrylonitrile et de méthallyl sulfonate de sodium)
- 4 ont utilisé la membrane de type 2 (Filtrizer BK 1,6 U en polyméthylméthacrylate)
- 4 ont utilisé le type 3 (SMC - NC 1485)
- 3 ont utilisé le type 4 (AN 4000/plaque)
- 3 ont utilisé le type 5 (FDX 180 GW en polyethersulfone-polyarylate)

Nous avons calculé les pertes perdialytiques en fonction du type de membrane utilisée. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableaux 45.

		CL (µM)		CT (µM)		CE (µM)		CE/CL	
		Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse	Avant dialyse	Après dialyse
Membrane 1 : CRYSTAL 4000 (n=11)	Moyenne	169,6	33,66	248,2	57,34	78,63	23,68	0,6214	0,8902
	Médiane	51,2	14,75	85,7	20,4	36,7	7,2	0,5564	0,6339
	Min.	10,35	1,3	22,5	4,4	6,4	0,9	0,2687	0,1494
	Max.	454,1	111,7	643,2	206,2	189,75	94,5	1,3671	2,8462
	Ecart-type	187,0	39,24	258,2	66,43	75,56	30,59	0,3124	0,8701
	Différence	80%		77%		47%		17%	
Membrane 2 : FILTRYZER BK 1,6 U (n=4)	Moyenne	80,8	24,62	125,78	48,93	44,98	24,31	0,7986	1,7401
	Médiane	25,75	3,75	49,3	9,5	19,8	5,53	0,5114	1,4351
	Min.	11,2	0,65	16	2,7	4,55	2,05	0,3974	0,9366
	Max.	311,3	89,85	470,5	174	159,2	84,15	1,7678	3,1538
	Ecart-type	129,56	43,53	193,5	83,45	64,25	39,93	0,5818	0,9818
	Différence	71%		61%		46%		118%	
Membrane 3 : SMC - NC 1485 (n=4)	Moyenne	14,7	3,41	25,08	13,48	10,38	10,06	0,7915	4,6917
	Médiane	15,73	3,225	24,45	8,35	8,6	4,75	0,7853	3,2091
	Min.	8,5	0,6	18	1,9	5,35	0,95	0,2838	0,3485
	Max.	18,85	6,6	33,4	35,3	18,95	29,8	1,3114	12,00
	Ecart-type	4,51	3,08	6,33	14,87	5,96	13,43	0,4997	5,3675
	Différence	77%		46%		4%		490%	
Membrane 4 : AN 4000/plaque (n=3)	Moyenne	224,82	58,13	377,8	96,5	152,98	38,37	0,8098	0,9629
	Médiane	162,75	18,55	315,3	52,8	152,55	34,25	0,9036	0,5238
	Min.	16,6	3,15	31,6	4,8	15	1,65	0,5886	0,5187
	Max.	495,1	152,7	786,5	231,9	291,4	79,2	0,9373	1,8464
	Ecart-type	245,21	82,26	381,3	119,70	138,2	38,94	0,1924	0,7651
	Différence	74%		74%		75%		19%	
Membrane 5 : (n=3)	Moyenne	124,43	18,78	184,57	44,1	60,13	25,32	0,7298	1,2481
	Médiane	33,65	6,05	58,9	8,5	25,25	5,8	0,7504	1,4559
	Min.	22,45	2,7	45,4	6,9	22,95	0,85	0,4168	0,1404
	Max.	317,2	47,6	449,4	116,9	132,2	69,3	1,0222	2,1481
	Ecart-type	167,03	63,05	229,45	63,05	62,42	38,17	0,3032	1,0198
	Différence	85%		76%		58%		71%	

Tableau 45 : Taux de carnitine avant et après dialyse en fonction du type de membrane utilisée

(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

L'analyse de variance ne montre aucune différence significative entre les différents types de membrane ($p = 0,1556$).

III - DISCUSSION

Cette étude a consisté à évaluer les taux de carnitine plasmatiques chez 81 patients hémodialysés, et à interpréter ces résultats en fonction de différents paramètres, tels que le sexe, l'âge, la dialyse elle-même, l'ancienneté de la dialyse, le type de membrane de dialyse. Pour cela, il nous a fallu établir nos propres valeurs de référence, afin que nous puissions comparer nos patients à une population témoin.

❖ Groupe témoin

Dans le groupe témoin, nous avons mesuré des taux de carnitine totale (CT) variant de 35 à 59 μM et des taux de carnitine libre (CL) variant de 24 à 43 μM . Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux trouvés dans les études précédentes (cf. tableau 24 page 101).

Lorsque nous étudions les résultats en fonction du sexe, nous constatons que les taux de CL et CT sont significativement plus bas chez la femme (-10 μM en moyenne), ce qui est en accord avec les résultats de la littérature (- 5 μM en moyenne) [21]. Nous trouvons comme Rössle et al.. un ratio CE/CL plus important chez la femme que chez l'homme [82] (+ 0,054), mais cette légère différence n'est pas statistiquement significative.

Si nous considérons l'âge des sujets comme facteur de variation des taux de carnitine, nous constatons une augmentation progressive mais non significative des taux de CL et CT avec l'âge, contrairement à la CE et au ratio CE/CL qui restent relativement constants.

❖ Patients hémodialysés

➤ Valeurs globales

Les taux sériques de carnitine totale (CT), carnitine libre (CL) et estérifiée (CE) chez l'hémodialysé ont déjà été mesurées par différents auteurs, et nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature (tableau 46).

Les membranes utilisées en hémodialyse étant très perméables aux molécules de poids inférieur à 300 daltons, les patients hémodialysés présentent des déficits en différents composants. Ils sont particulièrement prédisposés à un déficit en carnitine, compte tenu de son faible poids moléculaire (PM 161), de ses acides aminés précurseurs (lysine : PM 146 ;

méthionine : PM 149) et des cofacteurs nécessaires à sa synthèse (ascorbate : 176 ; pyridoxine : 205) [109].

Nombre de dialysés	CT (μM)	CL (μM)	CE (μM)	CE/CL	Références
82	61 \pm 2	31 \pm 2	26,3	0,84	Golper et al.. (1990) [97]
54	62,7 \pm 22,3	39,3 \pm 16,5	23,4 \pm 10,9	0,60	Rodriguez-Segade et al.. (1986) [125]
31	60,2 \pm 19,9	32,4 \pm 12,8	27,7	0,85	Rössle et al.. (1986) [99]
8	50,8	25,9 \pm 7,9	24,0	0,93	Lennon et al.. (1986) [100]
113	50,6	36,2	20,5	0,57	Corsi (1986) [101]
81	43,1 \pm 30,0	23,98 \pm 15,7	19,2 \pm 16,1	0,90 \pm 0,59	Notre étude

Tableau 46 : Concentrations plasmatiques en carnitine chez l'hémodialysé
(CL : carnitine libre ; CT : carnitine totale ; CE : carnitine estérifiée)

Les patients n'étaient pas à jeun pour pratiquer leur séance de dialyse, ni lorsque le prélèvement a été réalisé pour l'étude. Cela n'a que peu d'influence sur les résultats que nous trouvons par rapport aux témoins : ce que démontrent De Sousa et al. [72].

➤ **Comparaison Patients - Témoins**

Si l'on compare les valeurs chez le sujet sain (situées entre 35 et 62 μM pour la CT, et 24 et 43 μM pour la CL) à celles chez le patient hémodialysé, il apparaît que chez l'hémodialysé, les taux plasmatiques de CT sont le plus souvent dans les limites hautes de la normale (il n'a d'ailleurs été mis ici pour la CT aucune différence significative par rapport aux témoins), alors que ceux de CL sont inférieurs ou dans les limites basses de la normale. Les valeurs de CL et CT représentent respectivement 71 et 92 % des valeurs obtenues chez les témoins, ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans la littérature [152].

En 2004, Evans [153] démontre que les taux de CL diminuent rapidement après l'instauration de la dialyse, contrairement aux acylcarnitines dont le taux persiste (voire augmente) même après une dialyse à long terme. La conséquence de valeurs plus basses de CL et de valeurs

plus élevées d'acylcarnitines est que les insuffisants rénaux hémodialysés ont des valeurs de CT dans les limites de la normale.

Tout comme Chazot et al. [102], nous avons recensé des patients ayant des taux très abaissés de CL et CT : presque 65% de nos patients ont une $CL < 25\mu\text{M}$, et 29% d'entre eux ont une $CT < 30\mu\text{M}$. Mais la différence la plus importante entre les patients et les témoins touche la carnitine estérifiée. Alors que la CE représente 27% de la CT chez le sujet sain, chez l'hémodialysé, nous trouvons des valeurs supérieures : 44%. Le ratio CE/CL, normalement inférieur à 0,4, se trouve en conséquence fortement augmenté chez l'hémodialysé [103] (+ 127% ici). Les résultats que nous obtenons pour ce ratio sont en accord avec ceux de la littérature [125]. Hiatt et al. [104] précisent que ces résultats sont la conséquence d'une élévation des acylcarnitines à chaîne courte, ceux à chaîne longue restant dans les limites normales.

Ainsi, un déficit global en carnitine n'est pas la seule étiologie du trouble du métabolisme de la carnitine chez l'insuffisant rénal hémodialysé. La CT étant le plus souvent normale, ce sont à la fois la CL diminuée et la CE augmentée qui entraînent une augmentation significative du ratio CE/CL.

Mais évaluer le statut des patients en carnitine uniquement avec les taux plasmatiques présente cependant des limites. En effet, des concentrations plasmatiques basses reflètent le plus souvent des stocks musculaires bas. Par contre, des concentrations plasmatiques normales peuvent masquer un déficit musculaire en carnitine [154]. La détermination des taux sériques peut, par conséquent, ne pas refléter fidèlement le statut de carnitine. L'idéal, pour évaluer ce dernier, serait donc d'étudier le contenu musculaire en carnitine [103].

➤ **Influence d'un traitement par Lévocarnil® sur les taux de carnitine**

Nous avons voulu distinguer le statut des patients non traités par Lévocarnil® de ceux qui l'étaient. Nous constatons que les patients non traités ont des taux significativement plus bas que le groupe témoin, indiquant un net déficit en carnitine plasmatique chez ces patients (- 29% pour la CL et - 7,5% pour la CT). Ce déficit s'explique entre autre par le fait que la dialyse elle-même entraîne une fuite de carnitine dans le dialysat qui n'est qu'en partie compensée par sa biosynthèse endogène. Une autre cause du déficit chez l'hémodialysé est une diminution de produits carnés dans le régime alimentaire (afin d'éviter une trop forte augmentation sanguine des déchets du métabolisme azoté), et une diminution de la prise alimentaire elle-même, du fait des nausées et de l'anorexie provoquées par l'urémie. Chazot et al. [102] mettent d'ailleurs en évidence une corrélation positive entre les taux plasmatiques de CT et les apports protéiques. Il serait aussi possible qu'une diminution de l'absorption

intestinale puisse être à l'origine d'un déficit en carnitine. Mais Leschke et al. [123], suivant les concentrations plasmatiques de la L-carnitine après administration orale de la molécule chez 4 patients dialysés et chez 4 individus normaux n'observent aucune différence entre les deux groupes concernant l'évolution des taux, et concluent donc que l'absorption intestinale de carnitine n'est probablement pas une cause potentielle de déficit.

Au contraire, chez les patients traités, les taux de carnitine sont très significativement augmentés par rapport aux témoins : un traitement substitutif par Lévocarnil[®] induit chez le patient un état d'hypercarnitinémie, à la fois de la CL (+ 772%) et de la CE (+ 983%), dans les mêmes proportions, si bien que le ratio CE/CL n'est pas profondément modifié par l'administration de carnitine (nous trouvons une différence entre les ratios des patients traités et non traités de 0,3% seulement) [138]. Ce traitement contribuerait, selon Brass et al. [129] et Calvani et al. [132], à normaliser le ratio CE/CL et l'homéostasie de la carnitine, et à améliorer les effets cliniques néfastes de l'hémodialyse, tels que l'anémie, l'hypotension intra-dialytique, les cardiomyopathies, et la fatigue musculaire. En effet, l'administration de carnitine en post-dialyse est capable de se substituer à la carnitine ôtée du pool d'équilibration rapide (surtout la circulation sanguine), et de ralentir la perte de carnitine du pool d'équilibration lent que constitue en grande partie le muscle squelettique ; ceci se fait conjointement en corrigeant le déficit en carnitine et en augmentant les taux de CL et d'acyl-carnitine [103].

➤ **Influence du sexe des hémodialysés sur les taux de carnitine**

Nous avons voulu savoir si, comme pour les témoins, il existait une différence des taux de carnitine en fonction du sexe. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre l'homme et la femme traités par hémodialyse. En revanche, en comparant le groupe témoin et les groupes patients de chaque sexe, une différence significative est observée au niveau de la CL et de la CE mais pas de la CT. Finalement, ces résultats sont les mêmes que ceux obtenus pour les patients pris dans leur globalité. Si nous n'observons aucune différence entre l'homme et la femme, peut-être est-ce un problème de choix de population : en effet, 89% des patients recrutés sont âgés de plus de 45 ans, et, parmi eux, 48% sont des femmes. Or Borum [155] indique que la différence observée en fonction du sexe s'estompe au-delà de 40 ans, car les taux plasmatiques de carnitine libre remontent pour atteindre les valeurs comparables à celles de l'homme. Une des explications justifiant ces résultats serait un déclin des concentrations d'oestradiol chez les femmes au-delà de 40 ans [85] [86].

➤ **Influence de l'âge des patients sur les taux de carnitine**

Si nous nous intéressons à présent à la variation des taux de carnitine en fonction de l'âge des patients, nous nous apercevons que les taux de carnitine décroissent avec l'âge des patients, mais de manière non significative. Ceci était déjà décrit ([156] et [157]). Plusieurs facteurs peuvent aboutir à ces résultats : il est possible que l'âge des patients aille de pair avec l'ancienneté de la dialyse, si l'on émet l'hypothèse que plus les patients sont âgés, plus l'hémodialyse est ancienne, ce qui pourrait contribuer fortement à une baisse des taux de carnitine. De plus, l'âge avancé du patient aggrave encore les difficultés d'un régime alimentaire correctement équilibré. Mais l'hypothèse la plus probable est que la masse musculaire chute chez les personnes âgées ; or, 97% de la carnitine est stockée dans le muscle squelettique. Ainsi, s'ils perdent du muscle, ils peuvent également perdre de leurs réserves en carnitine.

Quant aux ratios, ils restent globalement inchangés avec l'âge (cela est peut-être le signe indiquant que l'hémodialyse joue un rôle non négligeable dans cet abaissement des taux en fonction de l'âge des patients, dans la mesure où l'hémodialyse entraîne la fuite non sélective de toutes les fractions de carnitine). Par ailleurs, [152] met en évidence une corrélation négative entre la concentration de CL et l'âge chez les femmes, qui n'existe pas chez les hommes. Sans doute l'absence de distinction homme-femme en fonction de l'âge est-elle un biais important dans les résultats que nous obtenons pour le ratio.

➤ **Influence de l'ancienneté de la dialyse sur les taux de carnitine**

Nous avons ensuite voulu savoir si l'ancienneté de la dialyse modifiait les taux plasmatiques de carnitine. Nous avons observé une baisse progressive non significative des taux de CL, CT et CE, mais dans des proportions différentes puisque le ratio CE/CL, lui, augmente parallèlement à l'ancienneté de dialyse.

Il a déjà été rapporté à de nombreuses reprises que les taux de L-carnitine chez les insuffisants rénaux traités par hémodialyse étaient plus bas que dans la population générale. Cependant, peu de données sont disponibles sur la période à partir de laquelle ces taux baissent une fois que la dialyse est commencée. Evans [153] et Rodriguez-Segade [98] ont étudié ce phénomène et concluent que l'essentiel des changements dans les taux de carnitine se produit dans les douze premiers mois de l'hémodialyse. Au-delà la variabilité est nettement moins évidente. Nous avons donc comparé le statut en carnitine chez de « jeunes » hémodialysés (c'est-à-dire chez des patients dont l'ancienneté de dialyse est inférieure à 12 mois), à celles de patients traités depuis plus de 12 mois par hémodialyse. Il en ressort une valeur de CL significativement plus haute et un ratio significativement plus bas chez les jeunes hémodialysés. (Nous avons précédemment comparé les autres tranches d'âge entre elles sans

trouver de significativité dans les variations). Nos résultats confortent ceux trouvés par les équipes précédentes. Cette constatation permet de comprendre pourquoi Debska-Slizien et al. [158] ont échoué en tentant d'établir une corrélation entre les taux plasmatiques de carnitine et l'âge de dialyse chez des patients dont la grande majorité sont dialysés depuis plus de 12 mois.

Il semble que l'ancienneté de la dialyse soit davantage corrélée aux taux de carnitine au niveau musculaire. En effet, plusieurs auteurs ([41] [97] [102] [104] [153] [159]) rapportent une corrélation négative entre les taux musculaires de carnitine et l'ancienneté de la dialyse, cette corrélation étant statistiquement significative au-delà de 16 ans de dialyse [104] [153].

Alors que la réduction des taux dans le compartiment plasmatique se produit dans les 12 premiers mois de dialyse, la réduction la plus significative dans le muscle a lieu, elle, après 12 mois. Ceci confirme l'hypothèse que les taux musculaires de carnitine s'équilibrent très lentement avec ceux du plasma [160]. Ce décalage dans le temps entre les variations plasmatiques et musculaires explique pourquoi certains auteurs ont rencontré des difficultés à établir une corrélation entre les taux plasmatiques et musculaires [109] [158] [161]. Alors que le compartiment plasmatique est profondément déplété en CL durant une séance de dialyse [16], le déplacement de la carnitine du pool musculaire vers le pool plasmatique entre deux séances de dialyse sert à rétablir partiellement (et non totalement) les taux plasmatiques. Une longue période de dialyse provoque alors une déplétion progressive mais nette du tissu musculaire en carnitine libre. Concernant les taux d'acétylcarnitine, ils diminuent sous l'effet de la dialyse, mais restent cependant dans des valeurs normales. Quant aux autres esters de carnitine, ils s'accumulent progressivement lors d'hémodialyse au long cours. Tous ces phénomènes induisent un changement significatif dans le temps de la composition plasmatique en carnitine chez le patient hémodialysé [153].

➤ *Fuites per dialytiques de carnitine*

Après le statut en carnitine des patients, nous avons voulu évaluer l'impact d'une séance de dialyse sur les taux de carnitine. Pour cela, nous avons dosé la carnitine chez 31 patients, avant et après leur séance de dialyse. Nous observons une perte per dialytique moyenne de 79%, 74% et 63% respectivement pour la CL, CT et CE. Le ratio CE/CL, lui, augmente de 175% sous l'effet de la dialyse. Les résultats que nous obtenons sont en accord avec ceux de Rumpf [112], Selçuk [113], (perte de $60 \pm 33\%$), et Evans et al. [162]. Ces derniers trouvent une perte moyenne de 70% pour toutes les fractions. Cependant ces pertes per dialytiques importantes sont à relativiser. En effet, la perte hebdomadaire de carnitine chez l'hémodialysé est comparable à l'excrétion urinaire hebdomadaire de sujets témoins en bonne santé [115].

La dialyse n'est pas un processus sélectif (à l'inverse de la fonction rénale), car elle entraîne indifféremment la perte de la carnitine libre et des acylcarnitines [105]. Mais les pertes per dialytiques en CL sont relativement plus importantes que les pertes urinaires de patients sans maladie rénale [116].

De rares études [114] analysent l'évolution des taux de carnitine durant la dialyse : observant des taux plasmatiques avant et après dialyse, les auteurs montrent un abaissement moyen d'environ 50%. Mais cette baisse per dialytique n'est pas constante dans le temps. Chez tous les patients, on observe une augmentation transitoire durant la séance de dialyse. Ces phénomènes de rebond éliminent l'hypothèse d'une élimination simple et irréversible à partir d'un pool constant. Ils indiquent au contraire que durant la dialyse, de la carnitine peut rejoindre le pool plasmatique à un taux supérieur à la fuite per dialytique. L'origine de cette augmentation plasmatique pourrait être une augmentation de la synthèse et/ou un apport exogène de la molécule ; mais en fait seul un relargage de carnitine des tissus vers le sang peut expliquer l'augmentation aussi rapide et marquée des taux plasmatiques de carnitine. En d'autres termes, lorsque les concentrations plasmatiques sont élevées, une simple fuite per dialytique de la carnitine sérique est observée, alors que, lorsqu'elles sont basses, il y a un relargage de la carnitine tissulaire vers le milieu sérique. Ce même phénomène participera à la restauration des taux sériques entre deux séances de dialyse.

Pour affiner notre étude concernant les pertes per dialytiques, nous avons distingué deux groupes : les patients après dialyse supplémentés en L-carnitine et ceux qui ne l'étaient pas : nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les pertes en carnitine de chacun des deux groupes : la supplémentation en Lévocarnil[®] n'a aucune influence sur les pertes per dialytiques de carnitine, quelle que soit la fraction de carnitine étudiée. En comparant ces deux groupes au groupe témoin, nous constatons que le groupe « sans traitement » après dialyse présente des taux significativement plus bas que le groupe témoin (les patients ont une hypocarnitinémie : - 78% pour la CL et - 79% pour la CT). Le ratio, lui, est très significativement augmenté après la séance. Quant au groupe traité, il présente des taux significativement plus hauts que le groupe témoin (les patients traités sont en hypercarnitinémie franche, même après dialyse : + 772% pour la CL et + 830% pour la CT). Le ratio, comme pour le groupe non traité, est significativement augmenté sous l'effet de la dialyse. Des taux plus de 700 fois supérieurs aux témoins indiquent que, même après dialyse, les patients traités par Lévocarnil[®] ont des concentrations supraphysiologiques en carnitine.

Selon les auteurs [136] [139] [163], la dose de Lévocarnil[®] la plus communément administrée chez les patients varie de 2 à 6 g/jour par voie orale et de 10 à 30 mg/kg par voie

intraveineuse, directement dans le bain de dialyse après la séance. Les patients traités dans notre étude reçoivent 1g, ou 2g le plus souvent, dans le bain de dialyse.

La question qui se pose alors est : pourquoi administrer de telles doses de Lévocarnil[®] si, même après dialyse, les taux restent très nettement supérieurs aux taux physiologiques ?

De tels taux contribueraient à normaliser le ratio CE/CL et les taux de CE [162]. La L-carnitine administrée à ce dosage pourrait également améliorer divers signes cliniques associés à l'hémodialyse, tels que l'anémie (en améliorant l'hématocrite et le taux de réticulocytes et en diminuant la résistance à l'érythropoïétine recombinante), l'hypotension intradialytique, les cardiomyopathies [164], et la fatigue musculaire [132] [144]. C'est en effet dans cette fourchette thérapeutique que les effets du traitement se sont révélés bien tolérés et les plus bénéfiques pour le patient, sans effets secondaires évidents [165].

Une telle augmentation des taux sous l'effet du traitement, bien que sans toxicité connue pour le patient [109], a conduit certains auteurs à envisager une posologie plus faible : Wanner et Hörl proposent une posologie de l'ordre de 1 à 5 mg/kg [115], Bérard et al. proposent, eux, 2 à 3 mg/kg [111]. Cependant, l'efficacité de ces posologies n'est pas suffisamment contrôlée, à ce jour, pour être retenue.

Récemment, un groupe d'experts a rédigé un « guide de recommandations pratiques pour le traitement des hémodialysés par lévocarnitine » [166]. Ce guide indique que 6 à 8 semaines de L-carnitine administrée en intraveineuse à la posologie de 20 mg/kg à la fin de chaque séance de dialyse sont nécessaires pour que la carnitine plasmatique atteigne un plateau, qui pourrait rester constant pendant environ 6 mois. Mais une durée de traitement supérieure serait nécessaire pour restaurer les taux musculaires [129].

Le dosage de carnitine chez les patients traités par Lévocarnil[®] permettrait de connaître le statut et de suivre les taux plasmatiques de chacun. En effet, même si de fortes carnitinémies ne sont pas toxiques, il est montré qu'un apport en trop grand excès est directement éliminé dans les urines [16]. Le dosage permettrait d'atteindre les concentrations thérapeutiques sans pour autant dépasser excessivement les taux plasmatiques. En outre, par un meilleur ajustement thérapeutique, le dosage de la carnitine plasmatique permettrait sans doute un gain économique non négligeable. Ainsi, certains patients sont supplémentés en lévocarnitine, alors qu'ils sont non répondeurs [129] ; d'autres sont également supplémentés alors qu'ils ont déjà en « overdose » de carnitine (ce fut le cas d'un patient dans notre étude, que nous avons exclu). Or le coût d'un traitement mensuel par Lévocarnil[®] est de 84,96 euros, Les tarifs de Lévocarnil[®] étant les suivants : Solution buvable 1g/10 mL = 2,85 € ; Solution injectable 1g/5mL = 3,54 €. Le coût d'un dosage, lui est de 32,40 euros (B120).

➤ **Influence du type de membrane sur les pertes perdialytiques**

Les membranes de dialyse sont conçues pour reproduire au mieux les caractéristiques de perméabilité de la membrane basale glomérulaire. Elles sont produites à partir d'une très large variété de polymères et copolymères d'origine naturelle ou synthétique, et se caractérisent par leur résistance à la diffusion de certains solutés, par leur perméabilité à l'eau et à d'autres solutés, mesurée par leur coefficient de tamisage [94]. Dans une dernière partie, nous avons voulu savoir si le type de membrane de dialyse utilisée influençait les taux de carnitine après dialyse. Nous ne trouvons aucune différence significative entre les cinq types de membrane testés. La nature de la membrane de dialyse n'a aucune influence sur les pertes perdialytiques de carnitine : cela confirme les résultats trouvés par Grossi et al. [117] et Gumprecht et al. [118]. Il est cependant à noter que le faible nombre de patients pour chaque type de membrane peut constituer un biais non négligeable dans une telle étude.

CONCLUSION

L'insuffisance rénale chronique traitée par hémodialyse s'accompagne fréquemment d'un déficit en carnitine. Les concentrations sériques se caractérisent alors, par un abaissement de la carnitine libre (valeur normale : 30 à 55 μM) et par une élévation du ratio CE/CL (normalement inférieur à 0,4).

Ce déficit est multifactoriel : la dialyse élimine les molécules de faible poids moléculaire dont la carnitine (PM : 161) ; un régime souvent pauvre en viande diminue les apports exogènes ; la perte de parenchyme rénal empêche la synthèse endogène ; l'insuffisance rénale produit des groupes acyls modifiant le ratio CE/CL.

Les symptômes cliniques associés à ce déficit concernent essentiellement les muscles squelettiques, le muscle cardiaque et les érythrocytes.

Pour corriger ce déficit, un apport thérapeutique en L-carnitine sous forme buvable ou injectable est proposé. La durée du traitement doit être suffisante pour restaurer le pool musculaire de carnitine. Conjointement à l'apport de carnitine, des modifications de la fonction musculaire, de la fonction cardiaque et de l'anémie sont observées. Les bénéfices musculaires se traduisent par une amélioration des crampes à l'effort, l'activité sur la fonction cardiaque par la régression de certains signes de dysfonctionnement myocardiques, et l'influence sur l'anémie par une amélioration de l'hématocrite. Devant le coût de l'érythropoïétine, cette dernière indication est l'objet d'un regain d'intérêt. Des études rapportent une économie appréciable d'EPO (30 à 50%) chez certains patients. Cependant il n'existe aucune recommandation précise sur la méthode de traitement. La posologie la plus habituelle est, cependant, de 20 mg/kg administrés par voie IV après la dialyse.

Dans ce cadre, nous avons mis au point le dosage de la carnitine libre et totale sur l'automate X-Pand[®] Dimension. Les résultats obtenus pour la validation technique sont tout à fait satisfaisants : cette méthode spectrophotométrique est précise, simple et rapide (les résultats sont obtenus en moins de 20 minutes). En revanche c'est une méthode moins sensible que la méthode radioisotopique ou par spectrométrie de masse. Mais sa moindre sensibilité est contrebalancée par sa fiabilité et surtout son automatisation, et donc sa capacité à être employée dans un laboratoire de routine.

L'hémodialyse est une indication essentielle pour le dosage de carnitine libre et totale plasmatiques. Connaître ces taux chez l'hémodialysé permettrait une évaluation du statut de chaque patient (la population à traiter serait donc mieux ciblée), un maintien des taux plasmatiques assurant la normalisation du ratio CE/CL et de la CE, et un meilleur ajustement thérapeutique à l'origine d'un gain économique évident.

Depuis la découverte de la carnitine en 1905 et la première publication de déficit chez l'hémodialysé en 1974, les connaissances n'ont cessé d'évoluer. Aujourd'hui, la carnitine reste l'objet d'une recherche active. On peut noter quelques axes prometteurs telle qu'une activité protectrice de l'érythrocyte et du myocarde vis-à-vis d'agents agressants, des propriétés immunomodulatrices et un rôle dans l'apoptose.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974; 290:697-701.
2. Cederblad G, Lindstedt S. A method for the determination of carnitine in the picomole range. *Clinica Chimica Acta* 1972; 37:235-43.
3. Böhmer T, Rydning A, Solberg HE. Carnitine levels in human serum in health and disease. *Clin Chim Acta* 1974; 57:55-61.
4. Gulewitsch w, Krimberg R. Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln II: Milcherlung über das Carnitine. *Hoppe - Seylers, Z Physiol Chem* 1905; 45:326-30.
5. Tomita M, Sendju Y. Über die oxyaminoverbindungen welche die Biuretreaktion zeigen III. Spaltung der γ -amino β -oxybuttersäure in die optisch aktiven Komponenten. *Hoppe - Seylers, Z Physiol Chem* 1927; 169:263-77.
6. Fraenkel G. Isolation procedures and certain properties of vitamin B₁₂. *Arch Biochem* 1951; 34:468-77.
7. Carter AL, Bhattacharyya PK, Weidman KR, Fraenkel G. Chemical studies on vitamin B₁₂ isolation and characterisation as carnitine. *Arch Biochem Biophys* 1951; 38:405-16.
8. Friedman S, Fraenkel G. Reversible enzymatic acetylation of carnitine. *Arch Biochem Biophys* 1955; 59:491-501.
9. Fritz I. Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver. *Am J Physiol* 1959; 197:297-304.
10. Bremer J. Carnitine in intermediary metabolism. *J Biol Chem* 1963; 238:2774-9.
11. Engel AG, Angelini C. Carnitine deficiency of human skeletal muscle associated lipid storage myopathy: a new syndrome. *Science* 1973; 179:899-902.
12. Di Mauro S, Di Mauro PM. Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 1973; 182:929-30.
13. Chen SH, Lincoln SD. Increased serum carnitine concentration in renal insufficiency. *Clin Chem* 1977; 23:278-80.
14. Karpati G, Carpenter S, Engel AG. The syndrome of systemic carnitine deficiency. *Neurology* 1975; 25:16-24.
15. Perroy MD. Déficit en carnitine chez l'hémodialysé - Correction thérapeutique. 1-117. 1998. Ref Type: Thesis/Dissertation
16. Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-Carnitine. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42:941-67.
17. Borum PR, Bennett SG. Carnitine as an essential nutrient. *J Am Coll Nutr* 1986; 5:177-82.
18. Bach AC. Carnitine in human nutrition. *Z Ernährungswiss* 1982;257-65.

19. Lennon DL, Shrago ER, Madden M, Nagle FJ, Handson P. Dietary carnitine intake related to skeletal muscle and plasma carnitine concentrations in adult men and women. *Am J Clin Nutr* 1986; 43:234-8.
20. Schmidt-Sommerfeld E, Werner D, Penn D. Carnitine plasma concentrations in 353 metabolically healthy children. *Eur J Pediatr* 1988; 147:356-60.
21. Harpey JP. Le système carnitine. *Cah Nutr Diet* 1993; 28:274-85.
22. Scholte HR, De Jonge PC. Metabolism, function and transport of carnitine in health and disease. In: Gitzelmann R, Baerlocher K, Steinmann B, eds. *Carnitin in der medizin*. Stuttgart, New York: 1987.
23. Jacob C, Belleville F. L-Carnitine: Métabolisme, fonctions et intérêt en pathologie. *Path Biol* 1992; 40:910-9.
24. Fouchaux J. La carnitine. 1-291. 1991. Bordeaux II. Ref Type: Thesis/Dissertation
25. Borum PR. Carnitine. *Ann Rev Nutr* 1983; 3:233-59.
26. Nelson PJ, Pruitt RE, Henderson LL, Jenness R, Henderson LM. Effect of ascorbic acid deficiency on the in vivo synthesis of carnitine. *Biochim Biophys Acta* 1981; 672.
27. Dunn WA, Aronson NN, Englard S. The effects of 1-amino-D-proline on the production of carnitine from exogenous protein bound trimethyllysine by the perfused rat liver. *J Biol Chem* 1982; 257:7948-51.
28. Murray MT. The many benefits of carnitine. *Am J Nat Med* 1996; 3:6-14.
29. Hamilton JW, Li UK, Shug AL, Olsen WA. Carnitine transport in human intestinal biopsy specimens. Demonstration of an active transport system. *Gastroenterology* 1986; 91:10-6.
30. Brass EP. Carnitine transport. In: Ferrari R, Di Mauro S, Sherwood G, eds. *L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. 2005: 21-36.
31. Siliprandi N, Ciman M, Sartorelli L. Myocardical carnitine transport. In: Stam H, Van Der Vusse GJ, eds. *Lipid metabolism in the normoxic and ischemic heart*. Darmstadt: 1987: 53-62.
32. Siliprandi N, Di Lisa F, Menabo R, Ciman M, Sartorelli L. Transport and functions of carnitine in muscles. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28:303-6.
33. Sartorelli L, Ciman M, Siliprandi N. Carnitine transport in rat slices. The carnitine/desoxycarnitine antiport. *Ital J Biochem* 1985; 34:275-81.
34. Maebashi M, Kawamura N, Sato M, Yoshinaga K, Suzuki M. Urinary excretion of carnitine in man. *J Lab Clin Med* 1976; 87:760-6.
35. Bremer J. Carnitine metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 63:1420-80.
36. Rebouche CJ, Paulson DJ. Carnitine metabolism and function in humans. *Ann Rev Nutr* 1986; 6:41-6.

37. Rebouche CJ, Chenard CA. Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: identification and quantification of urinary and fecal metabolites. *J Nutr* 1991; 121:539-46.
38. Bremer J. The role of carnitine in intracellular metabolism. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28:297-301.
39. Mac Garry JD, Leatherman GF, Foster DW. Carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* 1978; 253:4128-36.
40. Murthy MS, Pands SV. MalonylCoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:37-8.
41. Mac Garry JD, Mills SE, LONG CS. Observations on the affinity for carnitine and malonylCoA sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. *Biochem J* 1983; 214:21-8.
42. Carter AL, Abney TO, Lapp DF. Biosynthesis and metabolism of carnitine. *J Child Neurol* 1995; 10 :2S3-7.
43. Yates DW, Garland PB. Carnitine palmitoyltransferase activity (EC 2.3.1) of rat liver mitochondria. *Biochem J* 1970; **119**:547-52.
44. Vianey-Saban C, Guibaud P. Les déficits héréditaires de l'oxydation mitochondriale des acides gras. In: Saudubray JM, ed. *Maladies métaboliques*. Paris: 1991: 193-209.
45. Hoppel CL. The physiological role of carnitine. In: Ferrari R, Di Mauro S, Sherwood G, eds. *L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. 1992: 5-19.
46. Battelli D, Bellei M, Arrigoni-Martelli E, Muscatello U, Bobyleva V. Interaction of carnitine with mitochondrial cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1992;33-6.
47. Monpoux F, Iordache A, Bérard E, Hass H, Sirvent N, Mariani R. Carnitine sérique chez l'enfant traité par chimiothérapie. *Arch Pediatr* 1995; 2 :119S.
48. Arduini A, Rossi M, Mancinelli G, Belfiglio M, Scurti R, Radatti G. Effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the human erythrocyte membrane stability and deformability. *Life Sci* 1990;2395-400.
49. Marquis NR, Fritz IB. Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues. *Journal of Lipid Research* 1964; 5:184-7.
50. Brooks DE. Carnitine in the male reproductive tract and its relation to the metabolism of the epididymis and spermatozoa. In: Frenkel R, Mc Garry JD, eds. *Carnitine biosynthesis metabolism and function*. New York: 1980: 219-35.
51. Marks DB. VI - Métabolisme des lipides. In: Marks DB, ed. *Biochimie*. Paris: 1994: 195-232.
52. Mac Garry JD, Foster DW. An improved and simplified radioisotopic assay for the determination of free and esterified carnitine. *Journal of Lipid Research* 1976; 17:277-81.

53. Odievre M, Labrune Ph. Influence des déficits en carnitine sur la céto-génèse. *Presse Med* 1989; 18:614-6.
54. Pilardeau P. Le métabolisme énergétique. In: *Biochimie et nutrition des activités physiques et sportives*. Paris: 1995: 187-96.
55. Bremer J. Carnitine-dependant pathways in heart muscle. In: De Jong JW, Ferrari R, eds. *The carnitine system - A new therapeutic approach to cardiovascular diseases*. 1995: 7-20.
56. Winter S, Jue K, Prochazka J, Francis P, Hamilton N, Linn L, Helton E. The role of L-carnitine in pediatric cardiomyopathy. *J Child Neurol* 1995; 10:2S45-51.
57. Tein I, Di Mauro S. Primary systemic carnitine deficiency manifested by carnitine-responsive cardiomyopathy. In: Ferrari R, Di Mauro S, Sherwood G, eds. *L-carnitine and its role in medicine*. 1992: 155-84.
58. Masumura Y, Kobayashi A, Yamakasi N. Myocardial free carnitine and fatty acylcarnitine levels in patients with chronic heart failure. *Jpn Circ J* 1990; 54:1471-6.
59. D'Estanques J. La carnitine: une molécule d'avenir dans l'insuffisance cardiaque. *Synth Med Cardiologie* 1991; 68:19-20.
60. Odievre M. La carnitine chez le sujet normal et en pathologie. *Arch Fr Pediatr* 1984; 41:721-6.
61. Krähenbühl S, Reichen J. Carnitine metabolism in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1997; 25:148-53.
62. Nalecz KA, Nalecz MJ. Carnitine - A known compound, a novel function in neural cells. *Acta Neurobiol Exp* 1996; 56:597-609.
63. Kimura S, Amemiya F. Brain and liver pathology in a patient with carnitine deficiency. *Brain Dev* 1990; 12:436-9.
64. Di Lisa F, Bieber LL, Kerner J, Menabo R, Barbato R, Siliprandi N. Methods for carnitine assay. In: Ferrari R, Di Mauro S, Sherwood G, eds. *L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. 1992: 37-62.
65. Kodo N, Millington DS, Norwood DL, Roe CR. Quantitative assay of free and total carnitine using tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 1989; 186:383-90.
66. Rodriguez-Segade S, Alonso De La Pena C, Paz JM, Del Rio R. Determination of L-Carnitine in serum, and implementation on the ABA-100 and CentrifChem 600. *Clinical Chemistry* 1985; 31:754-7.
67. Cederblad G, Harper P, Lindgren K. Spectrophotometry of carnitine in Biological Fluids and Tissue with a Cobas Bio Centrifugal Analyser. *Clinical Chemistry* 1986; 32:342-6.
68. Roe DS, Terada N, Millington DS. Automated Analysis for Free and Short-Chain Acylcarnitine in Plasma with a Centrifugal Analyser. *Clinical Chemistry* 1992; 38:2215-20.

69. Ghoshal AK, Soldin SJ. Determination of total and free plasma carnitine concentrations on the Dade Behring Dimension RxL: Integrated chemistry system. *Clin.Chim.Acta* . 2005. Ref Type: In Press
70. Seccombe DW, Dodek P, Frohlich J, Hahn P, Skala JP, Campbell DJ. Automated Method for L-Carnitine Determination. *Clinical Chemistry* 1976; 22:1589-92.
71. Wan L, Hubbard RW. Determination of free and total carnitine with a random-access chemistry analyser. *Automation and Analytical Techniques* 1998; 44:810-6.
72. De Sousa C, English NR, Stacey TE, Chalmers RA. Measurement of L-carnitine and acylcarnitines in body fluids and tissues in children and in adults. *Clinica Chimica Acta* 1990; 187:317-28.
73. Borum PR. Carnitine: Determination of total carnitine using a radioenzymatic assay. *J Nutr Biochem* 1990; 1:111-4.
74. Minkler PE, Kerner J, North KN, Hoppel CL. Quantification of long-chain acylcarnitines by HPLC/fluorescence detection: application to plasma and tissue specimens from patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Clin Chim Acta* 2005; 352:81-92.
75. Minkler PE, Brass EP, Hiatt WR, Ingalls ST, Hoppel CL. Quantification of carnitine, acetylcarnitine, and total carnitine in tissues by high-performance liquid chromatography: the effects of exercise on carnitine homeostasis in man. *Analytical Biochemistry* 1995; 231:315-22.
76. Mc Entyre CJ, Lever M, Storer MK. A high performance liquid chromatographic method for the measurement of total carnitine in human plasma and urine. *Clin Chim Acta* 2004; 344:123-30.
77. Mardones C, Vizioli N, Carducci C, Rios A, Valcarcel M. Separation and determination of carnitine and acyl-carnitines by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Anal Chim Acta* 1999; 382:23-31.
78. Tomita K, Sakurada S, Minami S. Enzymatic determination of acetylcarnitine for diagnostic applications. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2001; 24:1147-50.
79. Harper P, Wadström C, Cederblad G. Carnitine measurement in liver, muscle tissue and blood in normal subjects. *Clin Chem* 1993; 39:592-9.
80. Boulat O, Janin B, Francioli P, Bachmann C. Plasma carnitine: Reference values in an ambulatory population. *Eur J Clin Chem Biochem* 1993; 31:585-9.
81. Güneral F. Serum and urine total, free and acylcarnitine levels related to age: assessment of renal handling of carnitine. *Turk J Pediatr* 1995; 37:217-22.
82. Rössle C, Kohse KP, Frantz HE, Fürst P. An improved method for the determination of free and esterified carnitine. *Clin Chim Acta* 1985; 149:268.
83. Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, et al.. Protocole de validations de techniques. *Annales de Biologie Clinique* 1986; 44:686-745.

84. Costell M, O'Connar JE, Grisolia S. Age-dependant decrease of carnitine content in muscle of mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:1135-43.
85. Takiyama N, Matsumoto K. Age- and sex-related differences of serum carnitine in a Japanese population. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1808-13.
86. Borum PR. Regulation of the carnitine concentration in plasma. In: Frenkel R, Mac Garry JD, eds. *Carnitine Biosynthesis, Metabolism, and Function*. New York: 1985: 115-26.
87. Schoderbeck M, Auer B, Legenstein E, Genger H, Sevela P, Salzer P. Pregnancy related changes of carnitine and acylcarnitine concentrations of plasma and erythrocytes. *J Perinat Med* 1995; 23:477-85.
88. De Lany JP, Snook JT, Vivian JM, Cashmere K. Metabolic effects of a carnitine-free diet fed to college student. *Fed Proc* 1986; 45:815.
89. Cederblad G. Effect of diet on plasma carnitine levels and urinary carnitine excretion in humans. *Am J Clin Nutr* 1987; 45:725-9.
90. Nakano C, Takashima S, Takeshita K. Carnitine concentration during the development of human tissues. *Early Human Dev* 1989; 19:21-7.
91. Tamai I, Ohashi R, Nezu JI, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Molecular and functional identification of sodium ion-dependant, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 1998; 273:20378-82.
92. Tein I. Carnitine transport: Physiopathology and metabolism of known molecular defects. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26:147-69.
93. Méas H. L-carnitine: simple complément alimentaire ou médicament? De son importance biochimique à son potentiel thérapeutique. 1-85. 2003. 21-5-2003. Ref Type: Thesis/Dissertation
94. Man NK, Touam M, Jungers P. Causes et conséquences de l'urémie chronique. In: Man NK, Touam M, Jungers P, eds. *L'hémodialyse de suppléance*. Paris: 2003: 1-15.
95. Jungers P, Man NK, Legendre C. *L'insuffisance rénale chronique: prévention et traitement*. Flammarion Edn. Paris: 2004: 1-242.
96. Ang KS, Simon P. L'hémodialyse périodique. In: Masson, ed. *Dialyse rénale*. 1996: 18-32.
97. Golper TA, Wolfson M, Ahmad S, Hirschberg R, Kurtin P, Katz LA. Multicenter trial of L-carnitine in maintenance hemodialysis patients. I. Carnitine concentrations and lipids effects. *Kidney Int* 1990; 38:904-11.
98. Rodriguez-Segade S, Alonso De La Pena C, Paz JM. Carnitine deficiency in haemodialysed patients. *Clin Chim Acta* 1986; 159:249-56.
99. Rössle C, Kohse KP, Kapp W, Franz HE, Glöggler A, Bergström J. Disturbed carnitine metabolism in hemodialysed patients. *Clin Nutr* 1986; 5:136.

100. Lennon DL, Shrago ER, Madden M, Nagle FJ, Handson P, Zimmermann S. Carnitine status, plasma lipids profiles, and exercise capacity of dialysis patients: effects of submaximal exercise program. *Metabolism* 1986; 35:728-35.
101. Corsi M. Secondary carnitine deficiency in renal dialysis. In: Borum PR, ed. *Clinical aspects of human carnitine deficiency*. New York: 1986: 185-203.
102. Chazot C, Jean G, Vo Van C, Charra B, Terrat JC, Laurent G. Plasma carnitine as a marker of protein malnutrition. *J Am Soc Nephrol* 1997; 9:A230.
103. Guarnieri G, Situlin R, Biolo G. Carnitine Metabolism in Uremia. *American Journal of Kidney Diseases* 2001; 38:S63-S67.
104. Hiatt WR, Koziol BJ, Shapiro JI, Brass EP. Carnitine metabolism during exercise in patients on chronic hemodialysis. *Kidney Int* 1992; 41:1613-9.
105. Golper TA, Ahmad S. L-carnitine administration to hemodialysis patients: has its time come? *Sem Dial* 1992; 5:94-8.
106. Wanner C, Wieland H, Wackerle B, Bocckle H, Schollmeyer P, Hörl W. Ketogenic and antiketogenic effects of L-carnitine in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1989; 36:264-8.
107. Guarnieri G, Toigo G, Crapesi L, Situlin R, Del Bianco MA, Corsi M. Carnitine metabolism in chronic renal failure. In: Berlyne GM, Giovanetti S, eds. *contribution to nephrology*. Basel: 1988: 1-23.
108. Savica V, Bellingheri G, Di Stefano C, Corjava E, Consolo F, Corsi M. Plasma and muscle carnitine levels in haemodialysis patients with morphological ultrastructural examination of muscle samples. *Nephron* 1983; 35:232-6.
109. Siami G, Clinton ME, Mrak R, Griffis J, Stone W. Evaluation of the effects of intravenous L-carnitine therapy on function, structure and fatty acid metabolism of skeletal muscle in patients receiving chronic hemodialysis. *Nephron* 1991; 57:306-13.
110. Krol E, Kostro J, Debska-Slizien I, Wojnarowski K, Kisielmcka E, Kunicka D. Carnitine in muscles and serum of hemodialysed patients. 1996. Ref Type: Personal Communication
111. Bérard E, Iordache A, Barillon D, Bayle J. L-carnitine in dialysed patients: the choice of dosage regimen. *Int J Clin Pharmacol Res* 1995; 15:127-33.
112. Selçuk NY, San A, Tonbul HZ, Aksoy HII, Bakan E. Effects of nutritional status and oral essential amino-acid - Replacement on serum L-carnitine levels of chronically hemodialysed patients. *Nephron* 1996; 72:341-2.
113. Rumpf W, Leschke M, Eisenhauer T, Becker K, Köthe V, Scheler F. Quantitative assessment of carnitine loss during hemodialysis and haemofiltration. *Proc Europ Dial Transplant Assoc* 1982; 19:298-301.
114. Panzetta G, Bonadonna G, Giovane P, De Grandis D. Carnitine kinetics during dialysis. *Nephron* 1985; 41:234.

115. Wanner C, Hörl W. Carnitine abnormalities in patients with renal insufficiency. *Nephron* 1988; 50:89-102.
116. Ahmad S. Carnitine, kidney, and renal dialysis. In *L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. Academic Press 1992; 21:381-400.
117. Grossi C, Schiavone MG, Pellegrini L, Montanaro AA, Coratelli P, Colucci G. Serum L-carnitine levels during hemodialysis: relation with acetate, bicarbonate, type of filter and L-carnitine concentration in the dialysis fluid. *Curr Ther Res* 1985; 38:250-5.
118. Gumprecht J, Snit M, Zukowska-Szzechowska E, Grzeszczak W, Moczulski D, Jendryczko A. Total plasma carnitine level in uremic diabetic and other origin patients treated with haemodialysis. *Ann Acad Med Gedan* 1995; 25:59-65.
119. Novak M, Zilleruello G, Schneider N, Monkus E, Straunss J. Carnitine distribution in plasma and blood cells in uremic patients on acetate vs. bicarbonate dialysis. In: Carter AL, ed. *Current concept in carnitine research*. 1992.
120. Wanner C, Wöcherle B, Boeckle H, Schollmeyer P, Hörl W. Plasma and red blood cell carnitine and carnitine esters during L-carnitine therapy in hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr* 1990; 51:407-10.
121. Bazzi C, Di Donato S, Castiglione A, Corsi M, d'Amico G. Carnitine metabolism in short and long term maintenance hemodialysis. In: *Clinical Aspects of human carnitine deficiency*. New York: 1986: 245.
122. Trovato GM, Ginardi V, Di Marco V, Dell'Aira AE, Corsi M. Long term L-carnitine treatment on chronic anemia of patients with end-stage renal failure. *Curr Ther Res* 1982; 31:1042-9.
123. Leschke M, Rumpf W, Eisenhauer T, Fuchs C, Becker K, Köthe V. Quantitative assessment of carnitine loss during hemodialysis and hemofiltration. *Kidney Int* 1983; 24:S143-S146.
124. Bérard E, Barillon D, Iordache A, Bayle J, Cassuto-Viguiet E. Low doses of L-carnitine impairs membrane fragility of erythrocytes in hemodialysis patients. *Nephron* 1994; 68:145.
125. Rodriguez-Segade S, Alonso De La Pena C, Paz JM, Novoa D, Romero R, Arcocha V. Carnitine concentrations in dialysed and undialysed patients with chronic renal insufficiency. *Ann Clin Biochem* 1986; 25:671-5.
126. Matsumoto K, Ishibashi M, Takiyama N, Yuki H. Carnitine deficiencies associated with valproic acid and another anticonvulsivants therapy. *Jpn J Clin Chem* 1994; 23:20.
127. De Simone C, Tzantzoglou S, Jirillo E. L-carnitine deficiency in AIDS patients. *AIDS* 1992; 6:203-5.
128. Coulter DL. Carnitine deficiency in epilepsy: risk factors and treatment. *J Child Neurol* 1995; 10:2S32-9.
129. Brass EP. Pharmacokinetic considerations for the therapeutic use of carnitine in hemodialysis patients. *Clinical therapeutics* 1995; 17:176-85.

130. Gilgore GS, Hipp K. Physician's L-carnitine hemodialysis utilisation survey. *Dialysis Transplant* 1995; 24:513-6.
131. Vacha GM, Giorcelli G, D'Iddio S, Valentini G, Bagiella E, Procopio A. L-carnitine addition to dialysis fluid. *Nephron* 1989; 51:237-42.
132. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D'Iddio S, Giordano V, Koverech A, Amato A, Brass EP. Carnitine Replacement in End-Stage Renal Disease and Hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033:52-66.
133. Guarnieri G, Biolo G, Toigo G, Situlin R. Carnitine in renal failure. In: Lippincott Williams and Wilkins, ed. *Kopple and Massry's Nutritional Management of Renal Disease*. 200: 357-68.
134. Matsumura M, Hatakeyama S, Koni J, Mabuchi H, Muramoto H. Correlation between serum carnitine levels and erythrocyte osmotic fragility in hemodialysis patients. *Nephron* 1996; 52:295-9.
135. Labonia WD. L-carnitine effects on anemia in hemodialysed patients treated with erythropoietin. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:757-64.
136. Ahmad S, Robertson T, Golper TA, Wolfson M, Kurtin P, Katz LA. Multicenter trial of L-carnitine in maintenance hemodialysis patients. II. Clinical and biochemical effects. *Kidney Int* 1990; 38:912-8.
137. De Felice SL, Lyons P, Gaffar MC, Sheridan MJ. US - Italy L-carnitine hemodialysis utilization survey. *Dialysis Transplant* 1996; 25:368-73.
138. Brass EP, Adler S, Sietsema KE, Hiatt WR, Orlando AM, Amato A. Intravenous L-carnitine increases plasma carnitine, reduces fatigue, and may preserve exercise capacity in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 37:1018-28.
139. Spagnoli LG, Palmieri G, Mauriello A, Vacha GM, D'Iddio S, Giorcelli G. Morphometric evidence of the trophic effect of L-carnitine on human skeletal muscle. *Nephron* 1990; 55:16-23.
140. Giovelani P, Fenocchio D, Montanari G, Cancellotti C, D'Iuddio S, Buoncristiani U. Selective trophic effects of L-carnitine in type I and IIa skeletal muscle fibers. *Kidney Int* 1994; 46:1616-9.
141. Van Es A, Henry FC, Kooistra MP, Lobatto S, Scholte HR. Amelioration of cardiac function by L-carnitine administration in patients on hemodialysis. In: Guarnieri G, Panzetta G, Toigo G, eds. *Metabolic and nutritional abnormalities in kidney disease*. Basel Karger: 1992: 28-35.
142. Romagnoli GF, Naso A, Carraro G, Lidestri V. Beneficial effects of L-carnitine in dialysis patients with impaired left ventricular function: an observation study. *Curr Med Res Opin* 2002; 18:172-5.
143. Suzuki M, Narita M, Yamakasi N. Effects of L-carnitine on arrhythmias during hemodialysis. *Jpn Heart J* 1982; 23:349-58.

144. Hurot J-M, Cucherat M, Haugh M, Fouque D. Effects of L-Carnitine Supplementation in Maintenance Haemodialysis Patients: A Systematic Review. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; 13:708-14.
145. Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale: spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Annales de Biologie Clinique* 1999; 57:685-96.
146. Cheillan D, Cognat S, Vianey-Saban C, Maire I, Dorche C. La spectrométrie de masse en tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme: le point sur les utilisations actuelles. *Ann Biol Clin* 2004; 62:269-77.
147. Serdar MA, Ismail K, Bayraktar I, Kenar L, Ozcelik F, Onr I. Optimization of fluorimetric measurement of free and total carnitine in serum. *Turk J Med Sci* 2001; 31:309-16.
148. Millipore Corporation. Centrifree Micropartition Devices. Package insert 2004.
149. Rabier D. Carnitine. In: *Cahier de Formation Biochimie*. 1996: 79-86.
150. Yderstraede KB, Pederson FB, Dragsholt C, Trostman A, Laier E, Larsen HF. The effect of L-carnitine on lipid metabolism in patients on chronic hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1987; 1:238-41.
151. Kuhn HJ. Determination of L-carnitine in serum. *Z Med Lab Diagn* 1981; 22:56-7.
152. Constantin-Teodosiu D, Young S, Wellock F, Short AH, Burden RP, Morgan AG, Greenhaff PL. Gender and age differences in plasma carnitine, muscle strength, and exercise tolerance in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2002; 17:1808-13.
153. Evans AM, Faull RJ, Nation RL, Prasad S, Elias T, Reuter SE, Fornasini G. Impact of hemodialysis on endogenous plasma and muscle carnitine levels in patients with end-stage renal disease. *Kidney International* 2004; 66:1527-34.
154. Borum PR. Carnitine nutrition of dialysis patients. *J Am Diet Assoc* 1986; 86:644-7.
155. Borum PR. Plasma carnitine compartment and red blood cell carnitine compartment of healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1987; 46:437-41.
156. Caruso U, Leone L, Cravotto E, Nava D. Effects of L-carnitine on anemia in aged hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin: a pilot study. *Dialysis Transplant* 1998; 27:498-504.
157. Steiber AL, Weatherspoon LJ, Spry L, Davis AT. Serum carnitine concentrations correlated to clinical outcome parameters in chronic hemodialysis patients. *Clinical Nutrition* 2004; 23:27-34.
158. Debska-Slizien I, Kawecka A, Wojnarowski K. Correlation between plasma carnitine, muscle carnitine, muscle carnitine and glycogen levels in maintenance hemodialysis patients. *Int J Artif Organs* 2000; 23:90-6.

159. Bellingeri G, Savica V, Mallamace A, Di Stefano C, Consolo F, Spagnoli LG. Correlation between increased serum and tissue L-carnitine levels and improved muscle symptoms in hemodialysed patients. *Am J Diet Assoc* 1983; 86:644-7.
160. Rebouche CJ, Engel AG. Kinetic Compartmental Analysis of Carnitine Metabolism in the Human Carnitine Deficiency Syndromes; Evidence for alterations in tissue carnitine transport. *J Clin Invest* 1984; 73:857-67.
161. Böhmer T, Bergrem H, Eiklid K. Carnitine deficiency induced during intermittent hemodialysis for renal failure. *Lancet* 1978; january 21:126-8.
162. Evans AM, Faull RJ, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine in patients with end-stage renal disease undergoing long-term hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68:238-49.
163. Sakurauchi Y, Matsumoto K, Shinzato T, Takai I, Nakamura Y, Sato M, Nakai S, Miwa M, Morita H, Miwa T, Amano I, Maeda K. Effects of L-carnitine supplementation on muscular symptoms in hemodialysed patients. *Am J Kidney Dis* 1999; 34:400-1.
164. Pauly DF, Pepine CJ. The role of carnitine in myocardical dysfunction. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:S35-S43.
165. Evans AM. Dialysis-related carnitine disorder and levocarnitine pharmacology. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:S13-S26.
166. Eknoyan G, Latos DL, Lindberg J. Practice recommendations for the use of L-carnitine in dialysis-related carnitine disorder: National Kidney Foundation Carnitine Consensus Conference. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:868-76.

Nom - Prénoms : KERSPERN Hélène Nathalie

Titre de la Thèse : MISE AU POINT DU DOSAGE DE CARNITINE SUR
AUTOMATE X-PAND[®] DIMENSION : APPLICATION A
UNE POPULATION D'HÉMODIALYSÉS

Résumé de la Thèse :

La L-carnitine est une petite protéine jouant un rôle majeur dans le transport des acides gras à longue chaîne à travers la membrane interne mitochondriale ; elle permet leur β -oxydation, ainsi que la régulation du rapport acyl-CoA/CoA libre entre le cytosol et la mitochondrie. Ce travail s'articule en quatre parties : la première partie est consacrée à des données générales sur la carnitine, la seconde à la carnitine chez l'hémodialysé (statut et supplémentation). Une mise au point du dosage plasmatique de cette protéine a ensuite été réalisée sur l'automate multiparamétrique X-Pand[®] Dimension (Dade-Behring). Cela a permis d'étudier le statut en carnitine d'une population de patients hémodialysés suivie au C.H.U de Brest ou à l'A.U.B (Association des Urémiques de Bretagne), ainsi que l'influence de la dialyse et d'une supplémentation sur ce statut. Une diminution des taux de carnitine libre est observée chez les hémodialysés. Elle est d'autant plus importante que la dialyse est ancienne, et justifie chez certains d'entre eux une supplémentation en lévocarnitine.

MOTS CLES

Carnitine - β -oxydation - Méthode spectrophotométrique - Automate X-Pand[®]
Dimension (Dade-Behring) - Insuffisance rénale - Hémodialyse

JURY

PRESIDENT : M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. Jean-Luc CARRE, Professeur de Biochimie
Faculté de Médecine de Brest

M. Jacques DELARUE, Professeur de Nutrition
Faculté de Médecine de Brest

M. Tugdual TANQUEREL, Praticien Hospitalier
Service de Néphrologie (unité d'Hémodialyse), C.H.U de Brest

Mme Yolande AMET, Maître de Conférences de Biochimie
Faculté de Médecine de Brest

Adresse de l'auteur : Melle Hélène KERSPERN,
17 Rue Alex Inizan, 29480 – Le Relecq-Kerhuon