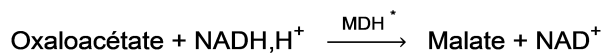
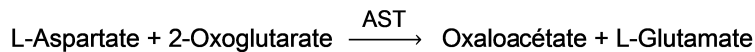


EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N°5 (40 points)****Enoncé**

La concentration en activité aspartate aminotransférase (ASAT = AST, EC 2.6.1.1) dans le sérum est augmentée dans un certain nombre de situations (hépatites, atteintes hépatobiliaires, infarctus du myocarde, pathologies musculaires, hémolyse, ...).

Pour sa détermination, la méthode recommandée par l'*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) à 37 °C, à pH 7,65, en présence de phosphate de pyridoxal (PP, cofacteur des aminotransférases), utilise le principe réactionnel suivant (*Clin Chem Lab Med* 2002; 40:725-733) :



* Malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37)

Un étudiant en travaux pratiques utilise cette méthode dans la cuve réactionnelle thermostatée d'un spectrophotomètre, de trajet optique de 1 cm, selon le mode opératoire suivant :

- Introduire 2,00 mL de réactif A
- Equilibrer à 37,0 °C
- Ajouter 200 µL de sérum
- Mélanger et incuber pendant 5 min
- Ajouter 200 µL de réactif B (réactif déclenchant)
- Mélanger et lire les absorbances à 340 nm toutes les 30 s pendant 6 min.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps (s)	Absorbance à 340 nm
30	1,205
60	1,126
90	1,018
120	0,911
150	0,802
180	0,694
210	0,586
240	0,479
270	0,370
300	0,262
330	0,172
360	0,102

Questions

QUESTION N° 1 :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 5 (40 points)**

Quels sont les composants présents dans le mélange des réactifs A et B ? Préciser leur nature.
Quelles sont les conditions à respecter quant à leurs concentrations ?

Proposition de réponse

Composants présents dans le mélange des réactifs A et B :

- Les substrats : L-Aspartate, 2-Oxoglutarate, NADH,H⁺ ; en large excès (> 10.K_M vis-à-vis des enzymes respectives)
- Le coenzyme : phosphate de pyridoxal ; en excès
- L'enzyme « indicatrice » : MDH ; en large excès
- Un tampon à pH 7,65

Ainsi, la cinétique réactionnelle ne dépend que de la concentration en activité AST.

QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde et le sens de la variation d'absorbance observée.

Proposition de réponse

Le choix de la longueur d'onde de mesure à 340 nm est lié au fait que le NADH,H⁺ présente un maximum d'absorption à cette longueur d'onde.

La décroissance de l'absorbance est liée à la consommation de NADH,H⁺, transformé en NAD⁺ qui lui n'absorbe pas à 340 nm.

La vitesse de décroissance de l'absorbance est proportionnelle à la concentration en AST dans le milieu réactionnel, donc dans le sérum. (On parle de « cinétique décroissante »).

QUESTION N° 3 :

Sachant que le coefficient d'absorbance molaire du NADH,H⁺ à 340 nm est de 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹, calculer la concentration en activité AST dans le milieu réactionnel final et dans le sérum, en les exprimant en U/L et en µkat/L.

Proposition de réponse

La concentration en activité AST en U/L dans le milieu réactionnel découle de la loi de Beer-Lambert et de la définition de l'activité enzymatique U (nombre de micromoles de produit de réaction libéré par minute ou nombre de micromoles de substrat consommé par minute) :

$$U/L = \frac{\Delta A/\min}{\varepsilon \times l} \times 10^6$$

Avec :

- $\varepsilon = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
- $l = 1 \text{ cm}$

Les différences entre les absorbances mesurées sont les suivantes :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N°5 (40 points)**

Temps (s)	Absorbances	$\Delta A/30$ s
30	1,205	
60	1,126	-0,079
90	1,018	-0,108
120	0,911	-0,107
150	0,802	-0,109
180	0,694	-0,108
210	0,586	-0,108
240	0,479	-0,107
270	0,370	-0,109
300	0,262	-0,108
330	0,172	-0,090
360	0,102	-0,070

La valeur maximale moyenne de $\Delta A/30$ s (en valeur absolue) est égale à 0,108 (ne prendre en compte que les différences entre les 8 mesures des valeurs mesurées aux temps entre 60 et 300 s), donc 0,216/min.

D'où :

- Dans le milieu réactionnel : AST = 34,3 U/L
- Dans le sérum (en corrigeant par la dilution du sérum dans le milieu réactionnel) :
AST = 34,3 x 2,4/0,2 = 412 U/L.

Le katal (kat) est défini par le nombre de moles de produit de réaction libéré par seconde ou nombre de moles de substrat consommé par seconde.

Donc le μkat correspond au nombre de micromoles de produit de réaction libéré par seconde ou nombre de micromoles de substrat consommé par seconde.

Donc $\mu\text{kat/L} = (\text{U/L})/60$.

Il en résulte :

- Dans le milieu réactionnel : AST = 0,57 $\mu\text{kat/L}$
- Dans le sérum : AST = 6,87 $\mu\text{kat/L}$

QUESTION N° 4 :

L'étudiant réalise, selon le même protocole, des déterminations d'activité AST pour 2 autres sérums. Quels sont les facteurs de multiplication respectifs permettant de calculer directement les résultats en U/L et en $\mu\text{kat/L}$ à partir des valeurs de $\Delta A/30$ s ?

Proposition de réponse

Activité enzymatique dans le sérum :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 5 (40 points)

$$U/L = (\Delta A/30 \text{ s}) \times \frac{2 \times 10^6}{\epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/30 \text{ s}) \times 3810$$

$$\mu\text{kat/L} = (\Delta A/30 \text{ s}) \times \frac{10^6}{30 \times \epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/30 \text{ s}) \times 63,5$$

QUESTION N° 5 :

Un laboratoire est équipé d'un automate multiparamétrique de biochimie utilisant des cuves de 0,6 cm de trajet optique.

Le mode opératoire retenu pour doser la concentration en activité AST avec les mêmes réactifs est le suivant :

- Réactif A : 200 μL
- Sérum : 10 μL
- Réactif B : 20 μL .

L'automate calcule la variation d'absorbance moyenne par minute à partir des valeurs d'absorbance correspondant à la phase linéaire de la cinétique réactionnelle. Il rend directement la valeur de la concentration en activité AST des sérums analysés, grâce à un facteur de multiplication programmé au préalable dans le logiciel de l'automate.

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en U/L ?

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en $\mu\text{kat/L}$?

Proposition de réponse

Dans ces conditions :

- $l = 0,6 \text{ cm}$
- volume total = 230 μL
- volume d'échantillon = 10 μL

$$U/L = (\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{\epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/\text{min}) \times 6085$$

$$\mu\text{kat/L} = (\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{60 \times \epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/\text{min}) \times 101,4$$