

AT 6 : OBESITE ET RISQUE CARDIO VASCULAIRE

Les ENZYMES catalyseurs biologiques sont :
des outils de diagnostic
des indicateurs de pathologies pour le médecin

LE CONTEXTE

Monsieur Mangegras consulte le médecin pour des douleurs abdominales.
Après consultation le patient fumeur en surpoids présente des facteurs de risques cardiovasculaires élevés

Le bilan demandé permettra d'explorer :

- Le métabolisme lipidique : dosage du cholestérol et des triglycérides
- Le métabolisme hépatique : dosage de la PAL et de l'ALAT
- Les marqueurs cardiaques : dosage de la Créatine Kinase
- De rechercher et titrer les anticorps anti VHB, anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite B.

FICHES PROTOCOLES

Bilan des anomalies lipidiques

Fiche protocole 1 : Dosage du cholestérol

Fiche protocole 2 : Dosage des triglycérides

Recherche d'une insuffisance hépatique

Fiche protocole 3: dosage de la Phosphatase Alcaline

Fiche protocole 4 : Alanine Amino Transférase sérique

Fiche protocole 5: Recherche d'anticorps anti-VHB

Les marqueurs cardiaques

Fiche protocole 6: dosage de la Créatine kinase sérique

OBJECTIFS

Connaître et Mettre en œuvre un dosage d'activité enzymatique par méthode cinétique et deux points

Distinguer dosage de substrat et mesure d'activité enzymatique

DOCUMENT RESSOURCE :

Les enzymes hépatiques et cardiaques

Méthode de calcul d'activité enzymatiques

Extrait « magazine santé » comment prévenir les risques cardio vasculaires

<https://www.ameli-sophia.fr/diabete/mieux-connaître-diabete/prevention-des-risques-cardiovasculaires/facteurs-de-risque-cardiovasculaire.html>

FICHE PROTOCOLE1 DOSAGE DU CHOLESTEROL PAR METHODE ENZYMATIQUE

1. PRINCIPE

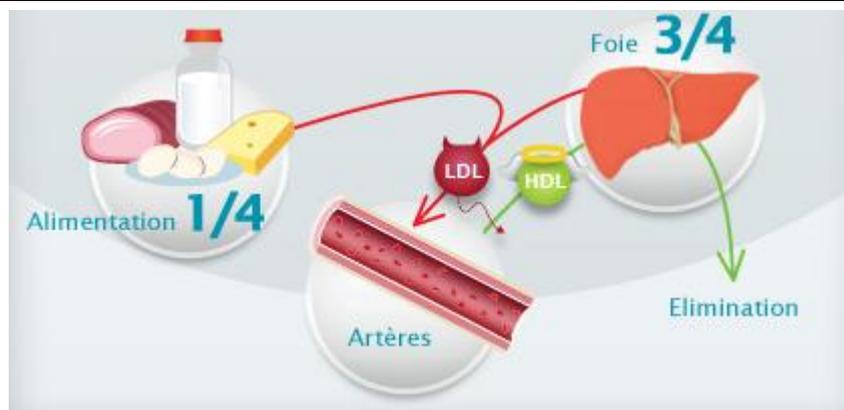
Le cholestérol total comprend le cholestérol libre et le cholestérol estérifié. Le cholestérol est dosé par une méthode enzymatique " en point final ".

Les réactions intervenant sont les suivantes :

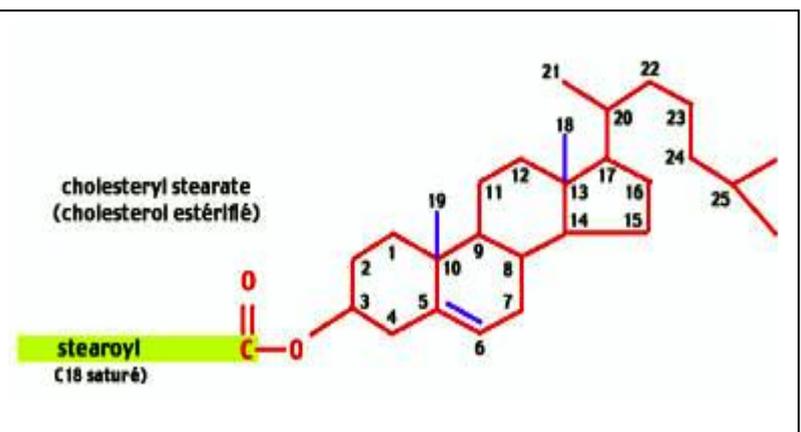
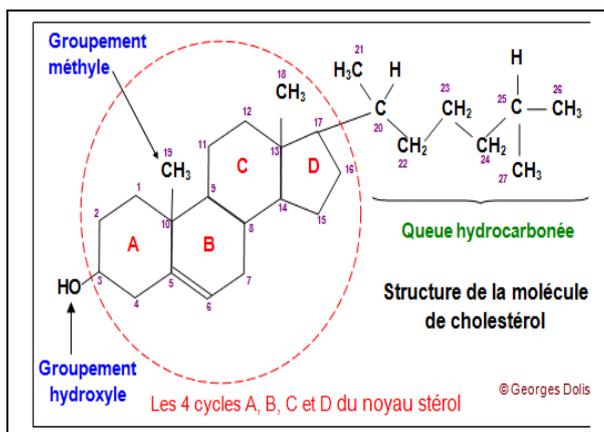
- cholestérol estérase
- (1) cholestérol estérifié + H₂O \longrightarrow cholestérol + acide gras
- cholestérol oxydase
- (2) cholestérol + O₂ \longrightarrow cholestène-4, one-3 + H₂O₂
- peroxydase
- (3) H₂O₂ + chromogène \longrightarrow chromophore + 4 H₂O

L'absorbance du chromophore est mesurée à 505 nm

Le cholestérol est une graisse apportée pour un quart par l'alimentation et aux trois quart fabriquée par le foie. Lorsque les taux sont normaux, le cholestérol assure la protection de nos artères en leur donnant souplesse et force. Attention, il y a un seul cholestérol mais deux systèmes de transport du cholestérol dans le sang ! Les HDL (High Density Lipoproteins), connues sous le nom de "bon cholestérol", récupèrent le cholestérol en excès et le ramènent au foie où il est transformé avant d'être éliminé. Les LDL (Low Density Lipoproteins), transportent le cholestérol du foie vers toutes les cellules. Quand cette belle machine se dérègle, les LDL-cholestérols s'accumulent et peuvent contribuer à la formation des plaques qui peu à peu bouchent les artères.



La molécule de cholestérol



Séquence –Diagnostic de pathologies

2. MATERIEL ET REACTIFS

Solution étalon de cholestérol à $0,52 \text{ mmol.L}^{-1}$
Eau physiologique
Solution réactionnelle
Échantillon de sérum dilué au 1/20
Contrôle d'exactitude $1,04 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($0,40 \text{ g.L}^{-1}$)



3. MODE OPERATOIRE

Tubes	blanc	Etalon	Dosage	Contrôle d'exactitude
Etalon à $0,52 \text{ mmol.L}^{-1}$		100 μL		
sérum			100 μL	
Contrôle à $1,04 \text{ mmol.L}^{-1}$				100 μL
Eau physiologique	100 μL			
Solution réactionnelle	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Mélanger, Lire l'absorbance contre le blanc réactif après incubation
5 min à 37°C
10 min à $20-25^\circ\text{C}$.

Stabilité de la coloration 30 min

Linéarité : 18 mmol.L^{-1}

Masse molaire du cholestérol = 386 g.mol^{-1}

4. COMPTE- RENDU

4.1. PRESENTATION DES RESULTATS

Donner un tableau des indications de lecture au spectrophotomètre

4.2. EXPLOITATION DES RESULTATS

Etablir l'équation aux grandeurs permettant le calcul de la concentration molaire en cholestérol dans la solution de contrôle et dans le sérum à doser

Donner l'équation aux grandeurs de la concentration massique en cholestérol dans la solution de contrôle et dans le sérum à doser

Vérifier l'exactitude de la mesure

Lim inf= $0,32 \text{ g.L}^{-1}$

Lim sup = $0,52 \text{ g.L}^{-1}$

Calculer la cholestérolémie de Mr Mangegras

Donnée U= $0,46 \text{ g.L}^{-1}$

Conclure sachant que les valeurs usuelles :

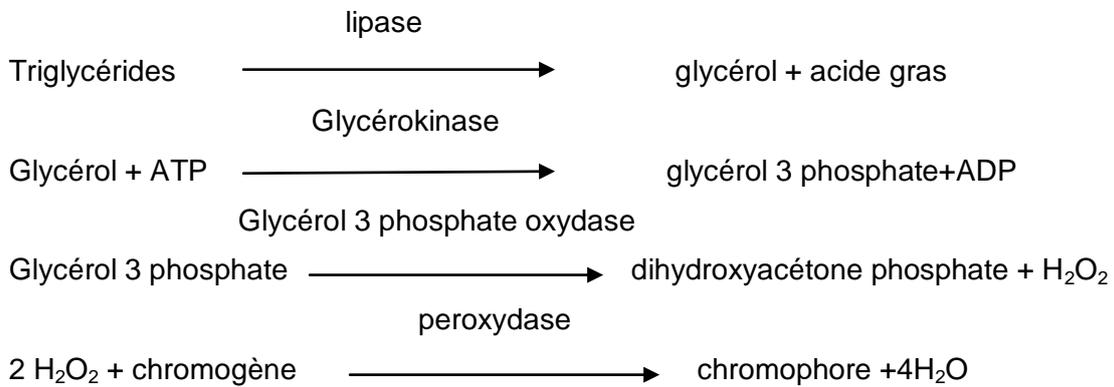
Cholestérol = $1,4 \text{ à } 2,7 \text{ g.L}^{-1}$

C cholestérol-HDL= $0,16 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$

Cholestérolémie	Evaluation du risque	
< 2 g/l < 200 mg/dl < 5,18 mmol/l	risque faible, en particulier si :	Cholestérol-HDL > 0,60 g/l > 60 mg/dl > 1,55 mmol/l
2 - 2,5 g/l 200 - 250 mg/dl 5,18 - 6,48 mmol/l	risque modéré si :	Cholestérol-HDL < 0,35 g/l < 35 mg/dl < 0,91 mmol/l
> 2,5 g/l > 250 mg/dl > 6,48 mmol/l	risque élevé, en particulier si :	

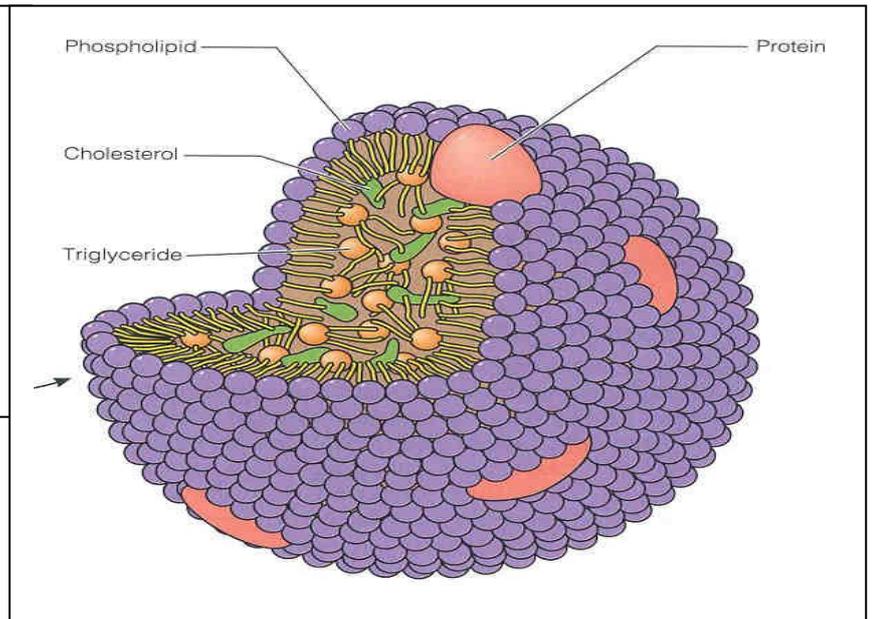
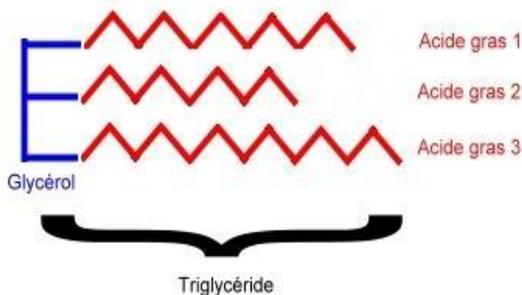
FICHE PROTOCOLE 2 DES TRIGLYCERIDES PAR METHODE ENZYMATIQUE

1. PRINCIPE



Les triglycérides sont des molécules lipidiques formées dans l'intestin grêle à partir de graisses que nous consommons. Elles sont également produites dans le foie à partir de l'excès de sucre dans notre alimentation.

Les matières grasses n'étant pas solubles dans l'eau, les triglycérides ont besoin de s'associer à d'autres substances formant - les lipoprotéines - pour être transportés dans l'organisme.



Séquence –Diagnostic de pathologies

2. MATERIEL ET REACTIFS

Solution étalon de sérum à $1,58\text{mmol.L}^{-1}$
Eau physiologique
Solution réactionnelle
Échantillon de sérum à doser
Contrôle d'exactitude à $0,79\text{mmol.L}^{-1}$



3. MODE OPERATOIRE

Tubes	blanc	Etalon	Dosage	Contrôle d'exactitude
Etalon à $1,58\text{mmol.L}^{-1}$		100 μL		
Sérum à doser			100 μL	
Contrôle à $0,79\text{mmol.L}^{-1}$				100 μL
Eau physiologique	100 μL			
Solution réactionnelle	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Mélanger, Lire l'absorbance contre le blanc réactif après incubation
5 min à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
10 min à $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$.

Stabilité de la coloration 30 min

Linéarité : $11,4\text{mmol.L}^{-1}$

Masse molaire des triglycérides = 887g.mol^{-1}

4. COMPTE- RENDU

4.1. PRESENTATION DES RESULTATS

Donner un tableau des indications de lecture au spectrophotomètre

4.2. EXPLOITATION DES RESULTATS

Etablir l'équation aux grandeurs permettant le calcul de la concentration molaire en triglycérides dans la solution de contrôle et dans le sérum à doser
Donner l'équation aux grandeurs de la concentration massique en triglycérides dans la solution de contrôle et dans le sérum à doser
Vérifier l'exactitude de la mesure
Lim inf = $0,70\text{g.L}^{-1}$
Lim sup = $0,87\text{g.L}^{-1}$
Calculer la triglycéridémie de Mr Mangegras
Donnée $U = \pm 0,13\text{g.L}^{-1}$
Conclure sachant que les valeurs usuelles : Triglycérides = $0,6\text{ à }1,67\text{g.L}^{-1}$

CONCLUSION BILAN LIPIDIQUE DE Monsieur Mangegras

Regrouper les valeurs mesurées de la cholestérolémie et de la triglycéridémie et faire le bilan concernant les risques cardiovasculaires de ce patient

<p style="text-align: center;">TRAVAIL DE REFLEXION ANALYSE DES KITS DE DOSAGE DU CHOLESTEROL ET DES TRIGLYCERIDES</p>
--

Comprendre comment doser un substrat par une méthode enzymatique

Pour chaque dosage répondre aux questions

Q1. Quel type de molécule est dosée (substrat ou enzyme) ?

Q2. Dans quelle solution est dosée cette molécule ?

Q3. Par quelle méthode est dosée cette molécule ? Justifier

Q4. Repérer les réactions principales, intermédiaire et indicatrice sachant que :

La réaction principale est la réaction dans laquelle se trouve la molécule à doser

Dans une réaction intermédiaire le produit d'une réaction est le substrat de la suivante

La réaction indicatrice permet de lire l'indication (A au spectrophotomètre) et contient la molécule absorbante.

Q5. Dédire des réponses précédentes les composés contenus dans la solution réactionnelle ou « réactifs » indispensable au déroulement des réactions.

Q6. Donner la condition nécessaire pour que la totalité du substrat soit dosée.

Q7. Expliquer pourquoi la préparation par dissolution des réactifs contenant les enzymes est effectuée en milieu tamponné.

Q8. Donner le rôle du témoin réactif ou blanc, le rôle du tube étalon et le rôle du contrôle d'exactitude.

FICHE PROTOCOLE 3
DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION D'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE (PAL) DANS UN SÉRUM

1. PRINCIPLE

La PAL sérique hydrolyse le paranitrophénylphosphate (pNPP) en paranitrophénol (pNP) coloré en jaune en milieu alcalin. La quantité de pNP libéré permet de déterminer l'activité de l'enzyme.

2. MATERIEL ET REACTIFS

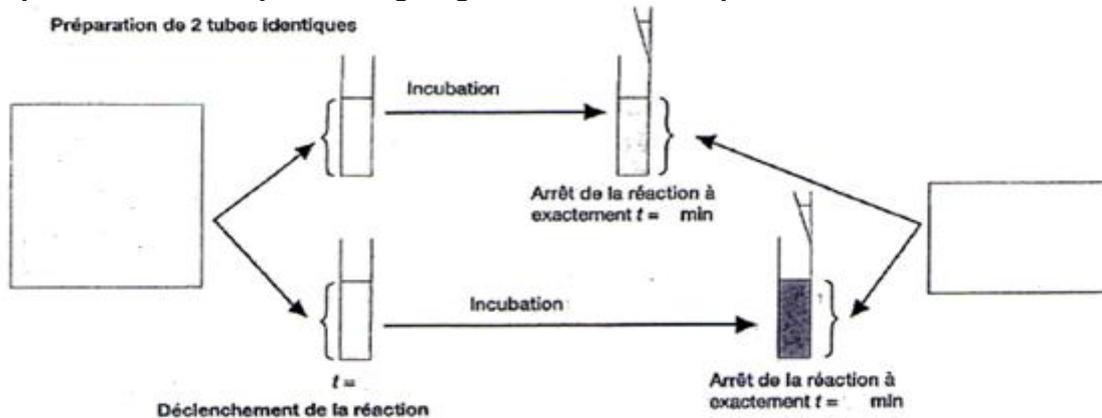
Solution étalon de pNPP à 15,0 mmol.L⁻¹
 Sérum à analyser « S_{pal} »
 Sérum de contrôle « zymotrol »
 Tampon DEA pH 10,5
 Solution NaOH à 0,05 mol.L⁻¹

Paranitrophénol	
Solution de NaOH à 0,02 mol/L	
Sérums	

3. PROCEDURE OPERATOIRE

3.1. Détermination de l'activité PAL par méthode deux points

Lire le protocole et compléter l'organigramme de la manipulation



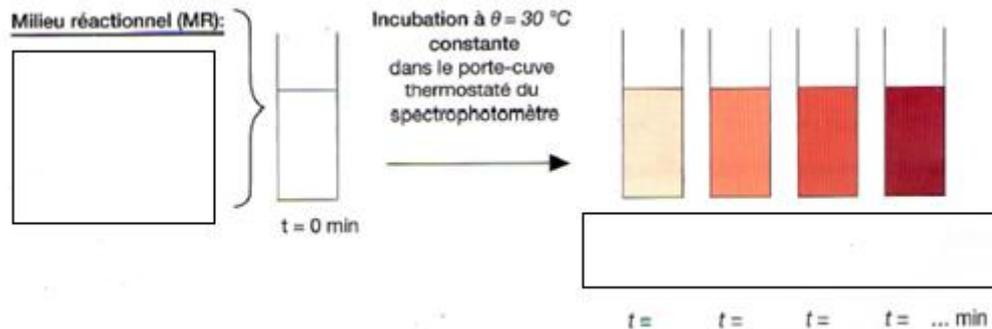
Tubes à essais	témoin	Essai	Contrôle
Solution tampon pH 10,5 (mL)	1	1	1
Solution de paranitrophénylphosphate pNPP (mL)	1	1	1
Ajouter le sérum en déclenchant simultanément le chronomètre. Dcaler l'essai et le contrôle d'une minute Boucher et mélanger rapidement . Laisser incuber environ 5 min			
Eau physiologique (mL)	0,10		
Sérum à doser (mL)		0,10	
Sérum contrôle (mL)			0,10
Arrêter la réaction au bout de 5 min exactement			
Solution d'hydroxyde de sodium	2	2	2

Préincuber la solution tampon, la solution de pNPP et les sérums 5 min à 37°C

Lire l'absorbance à 415 nm contre un témoin de même composition

3.2. Détermination de l'activité de la PAL par méthode cinétique

Lire le protocole et compléter l'organigramme de la manipulation



Faire le zéro du spectrophotomètre sur l'air à 415 nm.

Dans une cuve spectrophotométrique, introduire :

- 1 mL de tampon pH = 10,5
- 1 mL de la solution de para-nitro-phényl phosphate disodique (pNPP) à 15 mmol.L^{-1}
- Préchauffer 5 minutes à 30 ou 37°C.
- Ajouter :
- 0,1 mL de sérum à tester (t_0)

Déclencher le chronomètre

Attendre 1 minute

Lire l'absorbance à 415 nm toutes les 30 secondes pendant 5 minutes

4. COMPTE RENDU

4.1. Présentation des résultats

Pour chaque procédure de mesure présenter un tableau de résultats des indications des mesures

4.2. Exploitation des résultats- Utiliser le document ressource

- Comprendre et utiliser l'équation aux grandeurs permettant le calcul de la vitesse initiale de la réaction par la méthode cinétique et deux points
- En déduire la concentration d'activité catalytique Z de la PAL sérique en U ou katal
- Calculer la concentration d'activité catalytique b de la PAL en U.L^{-1} ou katal.L^{-1}

Remarque : U = quantité d'enzyme qui hydrolyse une micromole de pNPP par minute.

Katal = quantité d'enzyme qui hydrolyse une mole de pNPP

- Comparer les valeurs trouvées par les deux méthodes et donner les sources d'erreurs des mesurages sous forme d'un diagramme d'ischikawa
- Conclure sur le caractère normal ou pathologique du sérum testé.

Données :

Dans cette procédure à pH 10,5 le coefficient d'absorption molaire du pNP est d'environ $\epsilon = 17\,500 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$

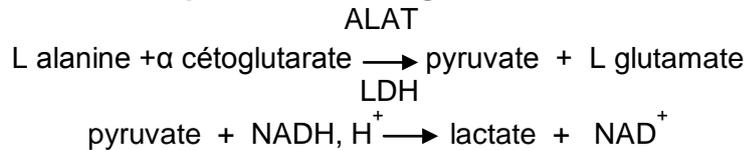
la valeur du contrôle utilisée est de 158 U.L^{-1}

lim inf = 139 U.L^{-1} ; lim sup = 177 U.L^{-1}

FICHE PROTOCOLE 4 DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ALAT (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE) SERIQUE

Ce dosage est réalisé sur un échantillon de sérum par méthode cinétique.

Equations du dosage de l'ALAT



1. MATERIEL ET REACTIFS

Solution réactionnelle (alanine, NADH, H⁺, LDH)
Sérum dilué **au 1/5**
Température : 37° C ; pH : 7,8
Longueur d'onde : 340 nm
Cuve de trajet optique 1 cm



2. MODE OPERATOIRE

Préchauffer la solution réactionnelle 5 min à 37°C
Faire le Zéro du spectrophotomètre sur eau distillée
Introduire dans une microcuve : 1 mL de solution réactionnelle
Ajouter 0,1 mL de sérum
Boucher avec du parafilm et mélanger par retournement.
Attendre 1 min environ puis déclencher le chronomètre et noter les absorbances toutes les 30 s pendant 3 minutes.

3. COMPTE-RENDU

3.1. **présentation des résultats**

Présenter un tableau de résultats des indications des mesures

3.2. **Exploitation des résultats**

- Comprendre et utiliser l'équation aux grandeurs permettant le calcul de la vitesse initiale de la réaction par la méthode cinétique
- En déduire la concentration d'activité catalytique Z de la ALAT sérique en U ou katal
- Calculer la concentration d'activité catalytique b de la ALAT en U.L⁻¹ ou katal.L⁻¹

Donnée : ϵ du NADH à 340 nm soit 6300.mol⁻¹.L.cm⁻¹ ;

Séquence –Diagnostic de pathologies

FICHE PROTOCOLE 5 RECHERCHE ET TITRAGE D'ANTICORPS ANTI HVB

1. PRINCIPE

L'agglutination passive est utilisée pour le sérodiagnostic de l'hépatite B. L'antigène du HVB (agent responsable de l'hépatite B) est fixé sur des particules de charbon. La présence d'anticorps anti HVB dans le sérum ou le plasma d'un patient atteint de l'hépatite B se traduit par l'agglutination des particules de charbon.

2. MATERIEL ET REACTIFS

Sérum
Tube Eppendorf
Eau physiologique
Réactif
Témoin positif (HBV+)
Témoin négatif (HBV-)
Carte de titration



3. MODE OPERATOIRE

3.1. TEST QUALITATIF

Déposer 50 μL du sérum à tester sur un cercle de la carte à l'aide d'une pipette automatique. Etaler régulièrement l'échantillon sur toute la surface du cercle. Ajouter une seule goutte d'antigène HBV à l'aide du flacon distributeur tenu verticalement. Placer la carte sur un agitateur à cartes et agiter pendant 8 minutes à 100 t/min. Lire et interpréter visuellement les résultats sous un bon éclairage. Réaliser un témoin positif et négatif à l'aide des sérums marqués HBV+ et HBV-

En cas de réaction positive au test qualitatif, un test quantitatif est indispensable pour affiner le résultat.

3.2. PROCEDURE DU TEST SEMI-QUANTITATIF

Préparer en tube Eppendorf 4 dilutions géométriques de raison 2 dans une solution d'eau physiologique jusqu'à la dilution 1/16^{ème}

	1	2	3	4
Eau physiologique (μL)	60	60	60	60
Sérum « S » (μL)	60	60	60	60
Volume à redistribuer (μL)		60	60	60

Procéder pour chaque dilution comme pour le test qualitatif.

4. COMPTE- RENDU

4.1. Présentation et exploitation des résultats

Compléter la feuille de résultats.

4.2. Exploitation

Conclure sur l'affection hépatique du patient

Séquence –Diagnostic de pathologies

FEUILLE DE RESULTATS RECHERCHE ET TITRAGE D'ANTICORPS ANTI HVB

TEST QUALITATIF

Témoïn positif	Sérum X	Témoïn négatif

Agglutination +

Pas d'agglutination –

Conclusion :

TEST SEMI-QUANTITATIF

Alvéole	1	2	3	4
Dilution				
Résultat				

Titre du sérum

Le titre correspond à l'inverse de la dernière dilution présentant encore un résultat positif

Aide à l'Interprétation et validation des essais

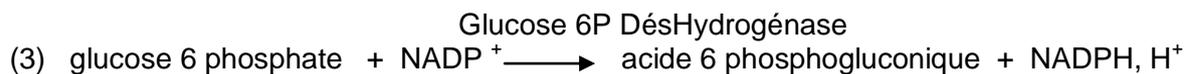
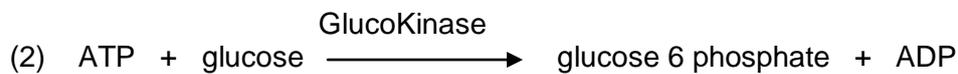
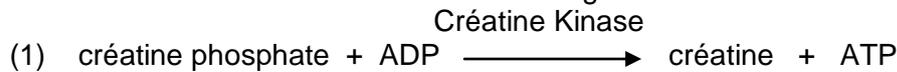
- Fortement réactif : larges amas de particules de charbon sur fond transparent.
Réactif : larges amas de particules de charbon un peu plus dispersés que dans le cas d'un essai fortement réactif.
Faiblement réactif : petits amas de particules de charbon sur fond gris-clair
Réactif-traces : légère agrégation de particules de charbon apparaissant sous forme d'un bouton d'amas au centre du cercle sur la carte ou d'amas dispersés le long du bord du cercle.
Non réactif : aspect gris homogène, ou bouton de particules de charbon non agrégées au centre du cercle.

Séquence –Diagnostic de pathologies

FICHE PROTOCOLE 6 DOSAGE DE LA CRATINE KINASE PAR METHODE CINETIQUE

Ce dosage est réalisé sur un échantillon de sérum par méthode cinétique.

Les réactions intervenant dans le dosage sont les suivantes :



1. MATERIEL ET REACTIFS.

Réactif 1 : tampon pH 6,6 + D glucose

Réactif 2 : ADP , NADP⁺ , créatine phosphate , GK , G6P DH

Echantillon de sérum dilué au 1/5

Longueur d'onde : 340 nm

Cuve de trajet optique 1 cm

2. MODE OPERATOIRE.

Préparation de la solution réactionnelle : reprendre un flacon de réactif 2 par 2,5 mL de réactif 1

- Préchauffer cette solution réactionnelle à 30 °C.
- Faire le zéro du spectrophotomètre sur l'eau distillée.
- Dans une microcuve, introduire : 1 mL de solution réactionnelle,
100 µL de sérum
- Mélanger par retournement.
- Introduire la cuve dans le spectrophotomètre et attendre environ 2 min.
- Déclencher le chronomètre et lire les valeurs d'absorbance toutes les 30 s pendant 3 min.

3. COMPTE-RENDU

3.1. **présentation des résultats**

Présenter un tableau de résultats des indications des mesures

3.2. **Exploitation des résultats**

- Comprendre et utiliser l'équation aux grandeurs permettant le calcul de la vitesse initiale de la réaction par la méthode cinétique
- En déduire la concentration d'activité catalytique Z de la CK sérique en U ou katal
- Calculer la concentration d'activité catalytique b de la CK en U.L⁻¹ ou katal.L⁻¹

Donnée : ϵ de NADPH₂ = 6,3.10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹

Séquence –Diagnostic de pathologies

LES ENZYMES HEPATIQUES ET CARDIAQUES

LES TRANSAMINASES

Alanine aminotransférase (ALAT) et aspartate aminotransférase (ASAT)

Les indicateurs les plus couramment employés pour déceler les lésions au foie (lésions hépatocellulaires) sont l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT).

Ces enzymes sont normalement présentes dans les cellules du foie; lorsque ces cellules sont endommagées, les enzymes s'en échappent et se retrouvent dans le sang.

L'ALAT est considérée comme un indicateur plus spécifique de l'inflammation du foie, puisque l'ASAT est aussi présente dans d'autres organes, par exemple le cœur ou les muscles squelettiques.

En cas de lésion aiguë du foie, comme dans l'hépatite virale, les taux d'ALAT et d'ASAT peuvent être utilisés comme mesure générale du degré d'inflammation ou de lésion au foie.

Ce n'est pas le cas quand il s'agit d'une maladie chronique du foie car ces enzymes peuvent être présentes à un taux tout à fait normal même en présence d'une cirrhose (cicatrisation du foie).

	30°C *	37°C *
Hommes	≤ 29 U/l	≤ 40 U/l
Femmes	≤ 24 U/l	≤ 33 U/l

LA PHOSPHATASE ALCALINE

La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme intracellulaire. Sa concentration dans le sérum augmente fortement lors de pathologies notamment hépatiques. La concentration d'activité catalytique de la phosphatase alcaline sérique peut augmenter au cours d'atteintes hépatiques graves comme les cirrhoses ou le cancer du foie ou diminuer lors d'une insuffisance hépatocellulaire sévère. Aussi la détermination de l'activité de cette enzyme participe au diagnostic de ces affections.

La concentration d'activité catalytique b normale de la PAL sérique chez l'adulte est comprise entre 30 et 100 U.L⁻¹.

LA CREATINE KINASE

La créatine kinase (CK) est une enzyme présente surtout dans les muscles (muscles squelettiques et muscle cardiaque). Elle permet une mise en réserve d'énergie dans les muscles sous forme de créatine phosphate

Le dosage de la CK peut être utilisé pour le diagnostic d'un infarctus du myocarde. Lors d'un infarctus, les cellules cardiaques nécrosées vont libérer dans la circulation sanguine de grandes quantités de protéines dont la créatine kinase. Ainsi la concentration de la CK du sérum devient très supérieure à la valeur physiologique. Les valeurs physiologiques dans le sérum sont :

à 25 °C	à 30 °C	à 37 °C
10 – 75 U.L ⁻¹	15 – 120 U.L ⁻¹	25 – 185 U.L ⁻¹

DOCUMENT RESSOURCE METHODE DE CALCUL DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

COMMENT PASSER DU COEFFICIENT DIRECTEUR $\Delta A/\Delta t$ AU CALCUL DE V_i EN $MOL.L^{-1}.S^{-1}$

La relation est la loi de Beer Lambert $A = \epsilon \times l \times c$ (c est la concentration dans le milieu réactionnel)

METHODE CINETIQUE

Equation aux grandeurs :

$$V_i = \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$
$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \epsilon * l * \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$
$$V_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon.l} * \frac{1}{60}$$

METHODE DEUX POINTS

Equation aux grandeurs :

$$V_i = \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$
$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \epsilon * l * \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$
$$V_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon.l} * \frac{1}{60} * \frac{VMT}{VMR}$$

Equations aux unités :

$$mol.L^{-1}.s^{-1} = min^{-1} \times \frac{1}{mol-1.L.cm-1.cm} \times \frac{1}{60}$$

Comment passer de la détermination de v_i aux grandeurs dérivées de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est une grandeur qui exprime une quantité d'enzyme active dans un volume donné de solution. Cette grandeur est déterminée à partir de V_i et se nomme **Z**

L'activité **Z** s'exprime en **KATAL** $mol.s^{-1}$ ou en unité **U** $\mu mol.min^{-1}$

$$Z = V_i \times VMR$$

La concentration d'activité **b** représente l'activité enzymatique par mL d'enzyme

$$b = \frac{Z}{V_{enz}}$$

TRAVAIL DE REFLEXION METTRE EN ŒUVRE UN DOSAGE D'ENZYME METHODE CINETIQUE ET METHODE DEUX POINTS

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. **L'activité d'une enzyme** s'évalue par son activité catalytique c'est-à-dire son pouvoir à **transformer une quantité de substrat par unité de temps en produit**.

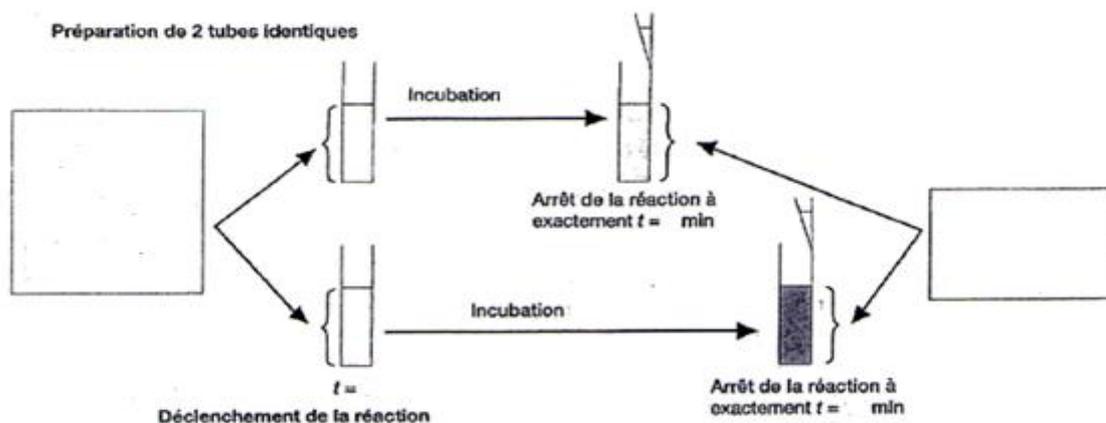
Pour cela, il faut mesurer une **vitesse de transformation** dans des conditions déterminées

La vitesse correspond à la quantité ou la concentration de substrat disparu ou produit apparu par unité de temps

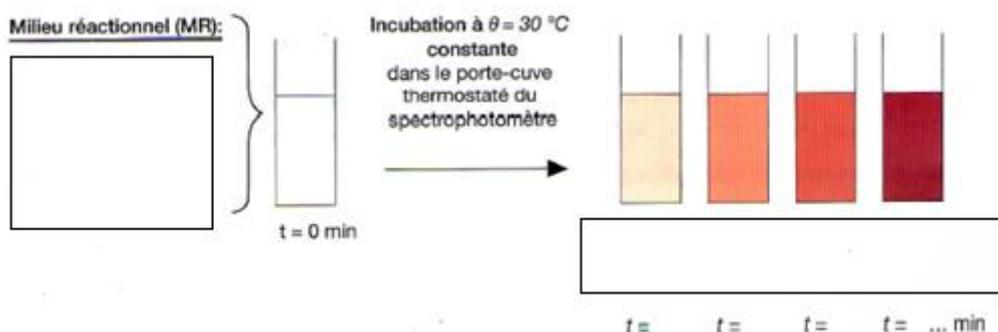
Deux méthodes de mesure sont possibles : Méthode cinétique et méthode deux points

REPONDRE AUX QUESTIONS APRES AVOIR LU LES PROTOCOLES.

Q1. Lire le protocole « Détermination de l'activité PAL par méthode deux points » et compléter l'organigramme de la manipulation



Q2. Lire le protocole « Détermination de l'activité de la PAL (ou ALAT ou CK) par méthode cinétique » et compléter l'organigramme de la manipulation



Q3. Analyser les graphiques du dosage de PAL et de l'ALAT et CK par méthode cinétique

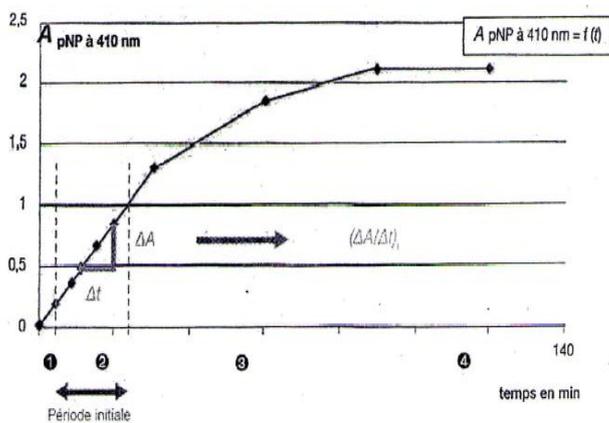
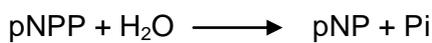
Q4. Justifier la diminution de l'absorbance en fonction du temps lors du dosage de l'ALAT

Q5. . Montrer que la partie linéaire de la courbe permet de calculer le coefficient directeur de la droite

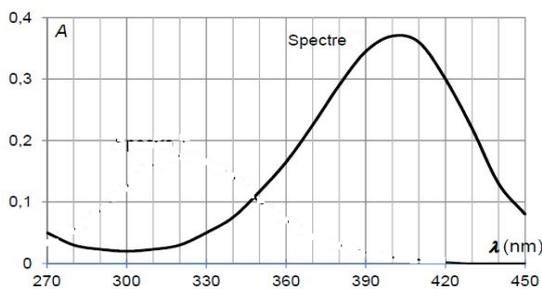
Séquence –Diagnostic de pathologies

- Q6** .Est- il nécessaire d'obtenir tous les points du graphique ? Justifier
- Q7** . En déduire le nom d'une autre méthode de mesure et donner ses caractéristiques
- Q8** . Pour chaque méthode indiquer la nature de l'élément déclenchant la réaction et la nature du composé absorbant
- Q9** . Expliquer le choix de la longueur d'onde des mesures
- Q10** . Citer les paramètres physico chimiques fixés et constant lors des mesures et le facteur limitant de la réaction
- Q11** . Pour chaque méthode de mesure, faire un schéma d'un cuve en faisant figurer : le volume de milieu réactionnel **VMR**, le volume d'enzyme **Venz** et le volume total du milieu **VMT**

Equation du dosage de la PAL



Spectre d'absorption du pNP

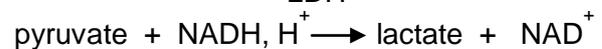


Equations du dosage de l'ALAT

ALAT

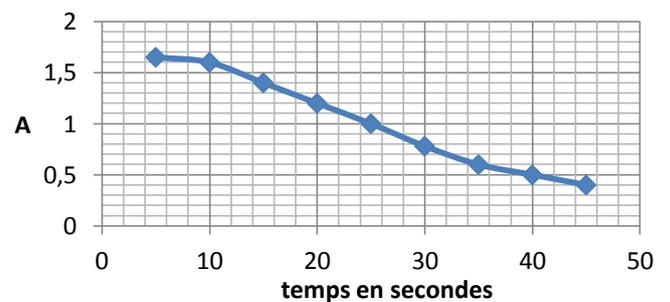


LDH

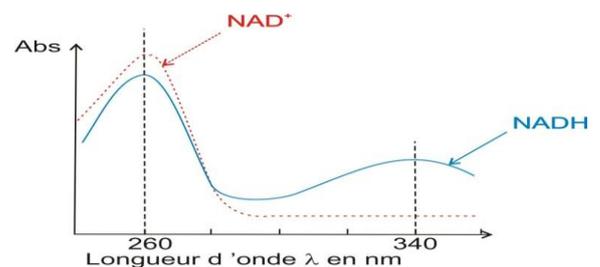


Courbe Dosage de l'ALAT

$A = f(\text{temps en s})$



Spectre d'absorption du NAD/NADH



Conclusion générale

Faire une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus.

Indiquer si le risque d'accident cardiovasculaire est élevé chez ce patient.

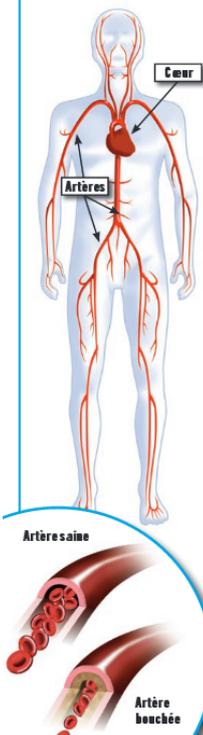
Proposer d'autres investigations qui peuvent être utiles et proposer aux patients les conseils d'hygiène de vie qui lui permettrait d'agir pour limiter l'apparition des complications

Les facteurs de risque cardiovasculaire augmentent le risque de développer une **maladie du cœur et des vaisseaux sanguins** (maladie cardiovasculaire). Les maladies cardiovasculaires sont principalement dues aux dépôts de cholestérol sur les parois des artères, contribuant à former la **plaque d'athérome**. Les artères se durcissent progressivement (**athérosclérose**).

L'accumulation de ces dépôts de cholestérol **réduit le diamètre des artères et gêne la circulation du sang**. Il peut arriver qu'un vaisseau se bouche et que la circulation soit interrompue. S'il s'agit d'un **vaisseau du cœur**, on parle d'**infarctus du myocarde** ("crise cardiaque"). S'il s'agit d'un **vaisseau du cerveau**, on parle d'**accident vasculaire cérébral** (AVC).

Prévenir les maladies cardiovasculaires

Le système cardiovasculaire



Lorsque l'on a du diabète, l'excès de sucre conduit à la formation de plaques sur les parois des artères. Elles vont peu à peu se boucher. On dit donc que le diabète est un « facteur de risque cardiovasculaire » car il peut être à l'origine de maladies du cœur et des artères. L'âge, le sexe, le cholestérol, mais aussi le mode de vie (tabac, alcool, etc.) sont des facteurs de risque. Le risque augmente lorsque plusieurs facteurs sont associés.

Il est cependant possible d'agir pour limiter l'apparition de ces complications.

J'apprends à connaître les risques

La glycémie

- ▶ Une glycémie trop élevée abîme les vaisseaux sanguins. Cela peut entraîner des lésions du cœur, des artères, des yeux et des reins.

Le cholestérol

- ▶ Le cholestérol est une graisse présente dans le corps humain et apporté par certains aliments. Le « mauvais » cholestérol (LDL) se dépose sur les artères et augmente le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires.

La tension artérielle

- ▶ Lorsque la tension artérielle est trop élevée (hypertension artérielle), le cœur doit « pomper » plus fort : il se fatigue plus. De même, les parois des artères réagissent mal à cet effort et se fragilisent.

Le tabac

- ▶ Le tabac détériore les vaisseaux sanguins. Associé au diabète, il augmente fortement les risques cardiovasculaires. Un an après l'arrêt du tabac, le risque cardiovasculaire diminue de moitié.

En pratique, que puis-je faire ?

Suivre les traitements prescrits par mon médecin traitant ou mon diabétologue

Équilibrer mon alimentation

- ▶ Manger de tout, en quantité raisonnable, sans sauter de repas.
- ▶ Du poisson trois fois par semaine, des légumes et féculents à chaque repas.
- ▶ Limiter les matières grasses et cuisiner de préférence avec des huiles végétales (olive, tournesol, colza, etc.).
- ▶ Moins de sel et d'aliments trop salés (plats préparés, biscuits apéritifs, fromage, etc.) : c'est meilleur pour ma tension artérielle.

Pratiquer une activité physique régulière

- ▶ Par des gestes simples (monter les escaliers par exemple), je permets au muscle de mon cœur de se renforcer.

Arrêter de fumer

- ▶ Des aides efficaces existent : avec mon médecin traitant je peux trouver la solution qui me convient.



MATIERE D'ŒUVRE

DOSAGE DE SUBSTRAT PAR METHODE ENZYMATIQUE : un élève fait le dosage du cholestérol l'autre fait le dosage des TG (sérum = sérum calibrateur et unitrol) (2H)

LE MARDI 18 NOV

FICHE 1 :DOSAGE DU CHOLESTEROL POUR 2 EL

110 µL Solution étalon de cholestérol à 0,52 mmol.L⁻¹ . L' Etalon = sérum calibrateur au 1/10

110 µL Eau physiologique (donner un tube hémolyse

4 mL Solution réactionnelle (mettre en pipettor si possible)

110 µL Échantillon de sérum = sérum calibrateur pur

110 µL Contrôle d'exactitude 1,04 mmol.L⁻¹ (0,40 g.L⁻¹) . Contrôle = sérum calibrateur au 1/5

LE MARDI 18 NOV

FICHE 2 :DOSAGE DES TG POUR 2 EL (VOIR FICHE POUR VALEUR UNITROL)

110 µL Solution étalon de sérum= unitrol à 1,38 g/L ou 1,58 mmol/L

110 µL Eau physiologique

4 mL Solution réactionnelle

110 µL Échantillon de sérum unitrol ou sérum calibrateur si on en dispose

110 µL Contrôle d'exactitude= **unitrol dilué au 1/2**

MATERIEL

- gants
- Microcuves
- Micropipettes de 50 à 200 µL : 1 pour 2 élèves
- Micropipettes de 200 à 1000 µL : 1 pour 2 élèves
- Cônes jaunes et bleus
- Parafilm
- Bain marie à 37 °
- Papier filtre et papier Joseph
- DASRI

Les kits nécessaires

- **Kit cholestérol RTU (4 x 100 ml) Ref 61218 Biomérieux**
- **Cholestérol calibrateur(4 x 3 mL) Ref 62473 Biomérieux**
- **Unitrol (8 x 5 mL) Ref 62453 Biomérieux**
- **Kit triglycérides enzymatique PAP 150 réf 61236 (R1,R2,R3)**

Séquence –Diagnostic de pathologies

LE JEUDI 20 NOV (3H) Mesure d'activité enzymatique : méthode deux points et cinétique

Détermination de l'activité PAL tous les élèves font les deux méthodes

5 mL Solution étalon de pNPP à 15,0 mmol.L⁻¹

220 µL Sérum à analyser « S_{Pal} »= zymotrol

110 µL Sérum de contrôle « zymotrol »

Tampon DEA pH 10,5

Solution NaOH à 0,02 mol.L⁻¹

- gants

- Microcuvettes

- Micropipettes de 5 0à 200 µL : 1 pour 2 élèves

- Micropipettes de 200 à 1000 µL : 1 pour 2 élèves

- Cônes jaunes et bleus

- Parafilm

- Bain marie à 37 °

-Papier filtre et papier Joseph

-DASRI

LE VENDREDI 21 NOV (2H)- FICHE 5 : TITRAGE AC

- **Kit Biorad Ref 72505 il faut trois kits pour la classe**

Titration anticorps HBV	
Témoin positif (R2) dilué au 1/5 ^{ème} dans de l'eau physiologique	120 µL noté « sérum »
Témoin positif (R2) dilué au 1/5 ^{ème} dans de l'eau physiologique	60 µL noté « T+ »
Témoin négatif (R3) dilué au 1/5 ^{ème} dans de l'eau physiologique	60 µL noté « T- »
Réactif antigène HBV (Réf : 72505) dilué au 1/5 ^{ème}	0,4 mL noté AgHBV
Tubes Eppendorf	4
Eau physiologique	1 ml tube à hémolyse
Agitateur de plaques	
Pipettes automatiques 50/100 µL	
Plaque de titration	
- parafilm	
- boîtes de gants usage unique	
- sacs plastiques pour déchets contaminés	
- 1 poubelle DASRI	
- désinfectant paillasse	
- désinfectant mains	

LE MARDI 25 NOV

FICHE 4 ET FICHE 6

Détermination de l'ALAT et CK Un élève fait l'ALAT l'autre élève fait CK

FICHE 4 :DOSAGE DE L'ALAT SERIQUE / 2 EL

1,1 mL Solution réactionnelle (alanine,NADH,H⁺,LDH)

200 µL Sérum à distribuer en eppendorf = **zymotrol non dilué**

Bain marie Température : 37° C

Longueur d'onde : 340 nm

Microcuve

FICHE 6 :DOSAGE DE CK SERIQUE /2 EL

Les élèves préparent la solution réactionnelle : **donner la fiche kit de préparation des solutions réactionnelles**

Réactif 1 : tampon pH 6,6 + D glucose

Réactif 2 : ADP , NADP⁺ , créatine phosphate , GK , G6P DH

200 µL Echantillon de sérum à distribuer en eppendorf = **zymotrol non dilué**

Longueur d'onde : 340 nm

microCuve

référence des kits

- Kit " ALAT / GPT 50 monoréactif " (4 x 50 ml) Ref : 63313 Biomérieux
- Zymotrol(8 x 3 ml) Ref 62952 Biomérieux
- Kit " Enzyline CK " Ref 61 142 Biomérieux