

Dans les conditions conventionnelles correspondant à la définition de l'unité en enzymologie, le dosage de l'activité enzymatique de la **créatine kinase** plasmatique est réalisé grâce à la suite de réactions suivantes :

**CK**

1) Créatine phosphate + ADP -----> créatine + ATP

**HK**

2) Glucose + ATP -----> Glucose 6 phosphate + ADP

**G6PDH**

3) Glucose 6 phosphate + NADP<sup>+</sup> -----> 6-phosphogluconate + NADPH + H<sup>+</sup>

*CK = créatine kinase ; HK = hexokinase ; G6PDH = glucose 6 phosphate déshydrogénase*

**Question 1 :**

Quel est l'intérêt du dosage de la CK en biochimie clinique courante ? Quelle est sa principale limite dans le cadre du diagnostic de l'infarctus du myocarde ?

**Question 2 :**

Comment nomme t'on chacune des 3 réactions utilisées ? Précisez leur(s) intérêt(s) respectif(s)

● Pour réaliser la mesure, **200 µL** de tampon (pH 6,7) et **250 µL** de réactif R1 sont pré-incubés pendant 1 minute dans une cuve thermostatée à 37°C de trajet optique 1 cm. La réaction est ensuite déclenchée par l'ajout de **12 µL** de plasma. L'absorbance à 340 nm est alors mesurée dans un spectrophotomètre toutes les **15 secondes** pendant 2 minutes à 37°C.

Le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) du NADPH, H<sup>+</sup> à 340 nm est égal à 6220 L.mol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>

**Question 3 :**

a) Quel est l'intérêt du tampon pH 6,7 ?

b) Que contient le réactif R1 et en quelles proportions ?

**Question 4 :**

a) À partir de la variation d'absorbance mesurée en fonction du temps, que doit-on déterminer, et avec quelles unités, pour pouvoir en déduire l'activité CK plasmatique en **U/L** ?

b) Sous quelle réserve principale cette démarche est-elle valide ?

c) Calculez le facteur de multiplication **F** permettant de déterminer l'activité enzymatique de la CK (**en U/L**) d'un plasma à partir de la **variation d'absorbance ( $\Delta A$ )** mesurée **en 15 secondes**.

● L'activité CK d'un plasma est de 853 U/L pour une concentration en protéines totales = 45 g/L.

Après purification (chromatographie d'affinité) de la CK contenue dans 2 mL de ce plasma, l'activité CK de l'éluat obtenu (530 µL) est de 854 U/L.

**Question 5 :**

a) Quel est le rendement de la purification de la CK ?

b) Sachant que le degré de purification est égal à 23, quelle est la concentration protéique de l'éluat ?

***Toutes les questions peuvent être traitées de façon indépendante.***