

Vous mesurez la concentration catalytique plasmatique de la créatine kinase (CK). Pour cela on utilise la réaction de la CK dans le sens de la déphosphorylation de la créatine-P, puis deux réactions auxiliaires sont utilisées : la première utilise l'hexokinase et la seconde la glucose-6P déshydrogénase. La réaction est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm du NADPH généré.

- 1) Ecrire les réactions utilisées afin de produire du NADPH, H⁺ à partir de la créatine-P.

Pour mesurer la concentration catalytique sur un automate, celui-ci distribue successivement dans une cuve de 0.5 cm de largeur, 10 µL d'échantillon préalablement dilué au ¼, puis 100 µL d'un réactif. Le calcul de la vitesse initiale se fait par mesure de l'absorbance à 340 nm toutes les 30 secondes pendant 5 minutes.

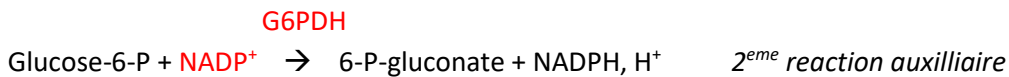
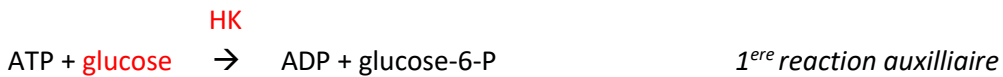
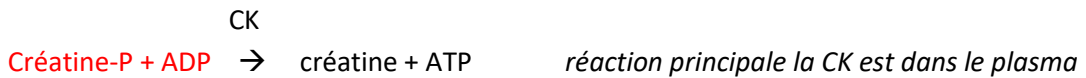
- 2) Que doit contenir le réactif pour que la réaction se déroule idéalement (détailler les composés et leurs niveaux de concentration) ?

Pour déterminer la concentration catalytique de la CK, le fabricant du kit précise que pour les conditions opératoires que vous utilisez, la relation suivante a été vérifiée : Activité enzymatique de l'échantillon en U/L = ΔA par 30 secondes x F avec F = 27936,5.

- 3) Expliquez ce que représente F et justifier sa valeur sachant que le coefficient d'extinction molaire du NADPH est de $6300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$
- 4) Donner l'activité enzymatique mesurée en U/L et en nKat/L dans la cuve pour une variation d'absorbance de 0.3 unité toutes les 30 secondes.

Propositions de correction et barème sur 40 points

1) (6 points, 2 points par réaction)



2) (8 points)

Le réactif doit comprendre un tampon adapté pour fixer le pH, la créatine-P, l'ADP et le NADP en large excès afin d'être en conditions de Vmax si possible (5 points). Il contient également l'hexokinase et la G6PDH en forte concentration de sorte que : CK < HK < G6PDH afin que la réaction principale soit limitante (3 points). Si besoin le réactif contiendra également les coenzymes nécessaire au fonctionnement idéal de ces trois enzymes.

3) (14 points)

AE (U/L) = $\Delta A / \Delta T \times 1/\epsilon l \times 1/\text{dil}$ (4 points) avec $F = 1/\epsilon l \times 1/\text{dil}$ en tenant compte des unités !

En pratique, pour être en U/L il faut multiplier par 2 pour se placer en variation d'absorbance par minute, multiplier le coefficient d'extinction molaire par 10^{-6} pour être en micromol/L. la dilution ici est double, celle préalable au $\frac{1}{4}$ de l'échantillon et celle de l'échantillon dans la cuve (6 points) :

$$\text{AE (U/L)} = \Delta A \text{ par } 30 \text{ sec} \times 2 \times 1 / (6300 \times 0.5 \times 10^{-6}) \times 4 \times 11$$

$$F = 27936,5 \text{ (4 points)}$$

4) (12 points) AE cuve pour variation absorbance de 0.3/ 30 sec :

AE cuve (U/L) = $\Delta A / \Delta T \times 1/\epsilon l$ ne pas tenir compte de la dilution au $\frac{1}{4}$ de l'échantillon avant la distribution (4 points)

$$= 0,3 \times 2 \times 1 / (6300 \times 0.5 \times 10^{-6}) = 190,5 \text{ U/L (4 points)}$$

$$\text{ou } 3174,6 \text{ nKat/L (x1000/60) (4 points)}$$