

**RÉPUBLIQUE DU MALI**  
**UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI**

**ÉCOLE NATIONALE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE**

**INTÉRÊT DES DOSAGES ENZYMATIQUES**  
**EN PATHOLOGIE**  
**CARDIO - VASCULAIRE**

---

**THÈSE**

Présentée et soutenue publiquement le 5 Mai 1983  
devant l'ÉCOLE NATIONALE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

par

**Youssef SOUMOUNOU**

pour obtenir le Grade de DOCTEUR EN PHARMACIE  
(Diplôme d'Etat)

**JURY**

Président : Professeur J. JOSSELIN

Membres :

{ Professeur F. MIRANDA  
Professeur M. K. TOURE  
Docteur B. Cissé

## PROFESSEURS RESIDANT A BAMAKO

Professeur Aliou BA	Ophtalmologie
Professeur Bocar SALL	Orthopédie - Traumatologie - Secourisme
Professeur Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Professeur Mohamed TOURE	Pédiatrie
Professeur Souleymane SANGARE	Pneumo-Phthisiologie
Professeur Mamadou KOUMARE	Pharmacologie - Matières Médicales
Professeur Mamadou-Lamine TRAORE	Obstétrique - Médecine Légale - Chirurgie
Professeur Aly GUINDO	Gastro-Entérologie
Professeur Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Professeur Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique
Professeur Siné BAYO	Histo-Embryo-Anatomie Pathologique
Professeur Abdel Karim KOUMARE	Anatomie - Chirurgie Générale
Professeur Bréhima KOUMARE	Bactériologie
Professeur Mamadou Koréissi TOURE	Cardiologie
Professeur Yaya FOFANA	Hématologie
Professeur Philippe RANQUE	Parasitologie
Professeur Bernard DUFLO	Pathol. Méd. Thérap. Physio. Hémato.
Professeur Robert COLOMAR	Gynécologie - Obstétrique
Professeur Bouba DIARRA	Microbiologie
Professeur Salikou SANOGO	Physique
Professeur Niamanto DIARRA	Mathématiques
Professeur Oumar COULIBALY	Chimie Organique

**A LA MEMOIRE DE MES GRANDS - PARENTS**

*In Memoriam*

**A LA MEMOIRE DE MON ONCLE MAKAN YAFFA**

*Toi qui, par la main, me conduisis à l'école, combien tu serais heureux de partager avec moi la joie de la consécration d'un travail que tu as commencé !*

**A MA TANTE, MARIAM SOUMOUNOU**

*Chère Baye, que cette oeuvre, si humble soit-elle, approuve toutes les peines que du as souffertes pour ton fils adoptif adulé et choyé. Tu as su endurer avec beaucoup de générosité mes caprices enfantins et mes bêtises d'adolescent.*

*Attachement et tendresse indéfectibles.*

**A MES PARENTS**

*Amour filial.*

**A MES FRERES**

*Une façon de vous dire courage et persévérance.  
Affection fraternelle.*

**A MES ONCLES ET TANTES**

*Sincère considération.*

**A MES COUSINS ET COUSINES**

*Reconnaissance pour votre attention parentale.*

*AU CORPS PROFESSORAL DE L' E. N. M. P.*

*AU PERSONNEL DE L' E. N. M. P.*

*Mes remerciements chaleureux.*

*AU PERSONNEL DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE  
DE L'HOPITAL NORD ET DE LA FACULTE DE MEDE-  
CINE SECTEUR NORD DE MARSEILLE,*

*qui n'a ménagé aucun effort pour nous rendre le séjour  
agréable.*

*Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gra-  
titude.*

*A TOUS MES CAMARADES DE L' E. N. M. P.*

*En souvenir de nos années d'études.*

*Courage et prospérité.*

*A NOTRE PRESIDENT DE JURY, LE PROFESSEUR  
JACQUES JOSSELIN*

*Votre grande connaissance en Biochimie clinique et  
votre immense culture médicale ont déjà fait écho sur  
notre continent.*

*N'avez-vous pas contribué, au fait, à notre formation,  
et, ce faisant, à la réalisation de ce travail ? Une fois de  
plus, vous nous faites l'insigne honneur de venir siéger  
au Jury de notre thèse, malgré vos multiples occupa-  
tions.*

*Soyez assuré de notre profonde gratitude et de nos  
sentiments les plus respectueux.*

*AU PROFESSEUR MAMADOU KOUREISSI TOURE*

*Combien nous sommes honorés de votre présence par-  
mi le jury de ce modeste travail !*

*Profonde gratitude.*

**A TOUS CEUX QUI ONT PARTICIPE A LA REALISATION  
DE CE TRAVAIL**

**AUX ETUDIANTS DE NOTRE PROMOTION**

***Courage et réussite professionnelle.***

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>HISTORIQUE</b> .....	<b>4</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ENZYMOLOGIE GENERALE</b>	
<b>CHAPITRE I - DEFINITION - STRUCTURE DES ENZYMES</b> .....	<b>7</b>
<b>I - DEFINITION DES ENZYMES</b> .....	<b>7</b>
<b>II - STRUCTURES DES ENZYMES</b> .....	<b>7</b>
1 - Structure .....	7
2 - Coenzymes .....	8
3 - Site actif .....	10
<b>CHAPITRE II - MECANISME D'ACTION DES ENZYMES</b> .....	<b>11</b>
1 - Etude de la réaction enzymatique .....	11
2 - Température et réaction enzymatique .....	13
3 - pH et activité enzymatique .....	15
<b>CHAPITRE III - CINETIQUE ENZYMATIQUE</b> .....	<b>17</b>
1 - Vitesse de la réaction en fonction du temps .....	17
2 - Vitesse de la réaction en fonction de la quantité d'enzymes .....	18
3 - Vitesse de la réaction en fonction de la concentration du substrat .....	19
<b>CHAPITRE IV - EFFECTEURS ENZYMATIQUES</b> .....	<b>25</b>
1 - Inhibiteurs compétitifs .....	25
2 - Inhibiteurs non compétitifs .....	28
3 - Inhibition par produits de la réaction .....	29
4 - Inhibition par excès de substrat .....	30
5 - Activation par protection de l'enzyme .....	30
6 - Activation par les ions .....	30
7 - Activation par action sur les subunités enzymatiques .....	30
8 - Effecteurs allostériques .....	31

2 - Variation des activités transaminasiques .....	76
3 - Evolution des activités lactico-déshydrogénasiques après l'infarctus du myocarde .....	77
4 - Evolution des activités de la CPK et de ses isoenzymes après l'infarctus du myocarde .....	78
<b>CHAPITRE VI : CONTROLE DE QUALITE DES DOSAGES ENZYMATIQUES .....</b>	<b>82</b>
1 - Contrôle quotidien .....	82
1-1 - Contrôle journalier à sérums titrés .....	83
1-2 - Sérum de contrôle non titré .....	84
1-3 - Traitement informatique des résultats .....	85
2 - Contrôle bimensuel international .....	87
3 - Contrôle national obligatoire .....	87
4 - Conclusion .....	91
 <b>TROISIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS</b>	
<b>CHAPITRE I : CADRE DE TRAVAIL - DEFINITION DE L'ECHANTILLON .....</b>	<b>92</b>
1 - Cadre de travail .....	92
2 - Définition de l'échantillon .....	92
<b>CHAPITRE II : MATERIELS DE TRAVAIL - TECHNIQUES .....</b>	<b>93</b>
1 - Généralités .....	93
2 - Prélèvements .....	93
3 - Techniques .....	94
<b>CHAPITRE III : RESULTATS DES ANALYSES .....</b>	<b>96</b>
 <b>CONCLUSION .....</b>	<b>132</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>135</b>

## INTRODUCTION

Les catalyseurs accélèrent la vitesse des réactions chimiques. Bien que le catalyseur participe directement à la réaction et qu'il puisse subir des changements physiques au cours de la réaction, il retourne à sa forme originale une fois la réaction terminée. Les enzymes sont des protéines spécialisées dans la catalyse des réactions biologiques. Ce sont les plus remarquables des biomolécules connues en raison de leur spécificité et de leur pouvoir catalytique extraordinaires, de beaucoup plus intenses que ceux des catalyseurs chimiques préparés par l'homme.

Dans les cellules vivantes, la plupart de ces réactions seraient très lentes si elles n'étaient pas catalysées par les enzymes. Les enzymes sont universellement présents dans les cellules vivantes et la production des réactions métaboliques communes aux cellules reflète la spécificité des enzymes responsables.

Au contraire des catalyseurs non protéiques (acides, bases, ou ions métalliques), chaque enzyme catalyse un petit nombre de réactions et même assez souvent une seule. Les enzymes sont donc des catalyseurs spécifiques. Si l'on considère que pratiquement toutes les réactions biochimiques sont catalysées par les enzymes, le nombre des différents enzymes doit être très grand. En effet, pour presque chaque composé organique trouvé dans la nature (et aussi beaucoup de composés inorganiques), il existe, dans un certain organisme vivant, un enzyme capable de réagir avec lui et de catalyser un changement chimique quelconque.

Une partie substantielle de l'étude des cellules vivantes est aujourd'hui dévolue aux enzymes, ainsi que celle de presque toutes les fonctions physiologiques, comme la contraction musculaire, la conduction nerveuse, la sécrétion rénale, etc., de sorte que la vie elle-même est inextricablement liée à l'activité des enzymes. Un processus complexe, comme la

contraction musculaire, qui nécessite l'utilisation d'énergie, peut être disséqué dans une série de réactions catalytiques enzymatiques. Beaucoup de ces réactions ont maintenant été étudiées *in vitro* comme système isolé avec des enzymes purs et cristallins ou sous forme d'extraits enzymatiques.

Ces extraits enzymatiques ont été utilisés pour étudier les réactions métaboliques et leur régulation, la structure et le mécanisme d'action des enzymes et ils servent aussi de catalyseurs dans la synthèse industrielle de substances biologiques actives telles que les hormones et certains médicaments. Le taux des enzymes du sérum humain peut varier de façon importante dans certaines conditions pathologiques. La mesure de l'activité des enzymes sériques est donc un outil précieux pour le médecin qui doit établir un diagnostic.

L'enzymologie appliquée au diagnostic médical a acquis une place prépondérante. Un certain nombre de dosages enzymatiques sont devenus des examens de routine, au même titre que celui de la glycémie ou de l'azotémie. Ainsi est née une nouvelle branche de la Biochimie : la Séméiologie enzymatique, très utile pour la pratique médicale. Sa perpétuelle évolution se fait essentiellement selon deux grandes directions :

- . l'une est l'étude de la variation des quantités d'enzymes libérés au cours des processus pathologiques, cliniquement décelables ou non, et la mise en évidence de leur origine spécifique (spécificité du tissu, de l'organe ou du système),
- . l'autre est l'étude des lésions biochimiques fines qui résultent d'un déficit enzymatique d'origine, et qui se traduisent par une altération minime ou majeure d'une séquence métabolique définie. L'aspect le plus perfectionné d'une telle étude est représenté par la découverte des maladies moléculaires.

Ces deux directions de travaux dépendent étroitement, comme toute la biochimie, d'ailleurs, et toute science, en général, des moyens techniques d'investigation dont nous disposons. Le perfectionnement de l'appareillage, l'apparition de l'automatisation dans les techniques

de dosage sont en grande partie responsables de l'extension rapide de l'enzymologie dans le domaine de la biologie clinique.

Pour étudier les processus biologiques intimes et complexes, l'enzymologie est une science d'avenir qui intéresse outre la biologie clinique, la génétique, la microbiologie, la toxicologie, la pharmacologie et la pharmacodynamie, la biologie moléculaire.

## HISTORIQUE

Une grande partie de l'histoire de la Biochimie est celle de l'enzymologie. Les réactions enzymatiques étaient utilisées par l'homme longtemps avant l'histoire écrite. La découverte de la fermentation alcoolique a été attribuée par les Grecs à Bacchus. La fabrication du fromage, le lèvement du pain et la manufacture du vinaigre sont des procédés enzymatiques qui sont issus de l'antiquité. Ces activités pratiques ont occupé une importante place dans l'histoire de l'enzymologie. Les brasseries et leurs laboratoires de recherche ont fourni beaucoup d'information concernant les processus selon lesquels les cellules vivantes utilisent le sucre, pour les réactions fondamentales de fermentation dans une ancienne culture qui sont pour la plupart semblables dans les tissus de mammifères.

Le développement de l'enzymologie est relativement récent. Bien que ses débuts remontent au commencement du XIX<sup>ème</sup> Siècle, l'enzymologie ne s'est développée considérablement que depuis 50 ans, et est devenue un des sujets fondamentaux en Biochimie. Les premiers biochimistes involontaires ont été, à l'origine, des chercheurs qui se sont occupés de la transformation (fermentation) des jus d'origine végétale en boissons alcooliques. Les transformations qu'ils étudiaient, en effet, étaient catalysées par les enzymes contenus dans les cellules de levure. Le processus de la fermentation a été élucidé en 1790 par LAVOISIER qui montra, grâce à des expériences de bilan, que le sucre était converti en CO<sub>2</sub> et alcool éthylique.

PAYEN et PERSOZ en 1833 ont été les premiers à reconnaître clairement un enzyme en découvrant qu'un précipité alcoolique d'un extrait de malt contenait une substance thermolabile qui convertissait l'amidon en sucre. Ils l'appelèrent "diastase" à cause de son pouvoir de séparer les dextrines solubles des enveloppes insolubles du grain d'amidon (en grec, séparation = diastasis). Pendant les premiers temps de la

découverte des enzymes, de nombreux chercheurs les appelèrent aussi "ferments", en raison du parallélisme qu'ils constatèrent entre leur action et celle de la levure en fermentation.

Dans la première théorie générale de catalyse chimique publiée en 1835, BERZELIUS signale un exemple de ce qui est maintenant reconnu comme un enzyme, la diastase du malt, et il mentionne le fait que l'hydrolyse de l'amidon est catalysée plus efficacement par cette diastase que par l'acide sulfurique.

En 1877, KUHNE proposa le terme "enzyme" et distingua les enzymes des bactéries.

Bien que PASTEUR reconnaisse que la fermentation est catalysée par les enzymes, il affirme en 1860 que ces enzymes sont inextricablement liés à la structure et à la vie des cellules de levure. Ce fut donc un événement capital de l'histoire de la recherche enzymatique lorsqu'en 1897, BUCHNER réussit à extraire de la levure les enzymes responsables de la fermentation alcoolique. Ce résultat montre clairement que ces enzymes, qui catalysent une importante voie métabolique exergonique, peuvent fonctionner indépendamment de toute structure cellulaire.

En 1905, HARDEN et YOUNG montrèrent que la zymase (extrait cellulaire de levure) était inactivée par dialyse, qu'elle était réactivée par addition du diffusat au dialysat et que les facteurs activants (coenzymes) contenus dans le diffusat étaient thermostables. Ainsi, la découverte de la solubilisation de l'activité enzymatique et l'introduction de la notion de coenzyme ouvraient la voie à l'isolement et à l'identification des très nombreux enzymes particuliers et des cofacteurs constituant le système complexe appelé zymase.

Vers la fin du XIX<sup>ème</sup> Siècle, le développement remarquable de la chimie organique structurale des substances d'intérêt biologique rendit possible l'étude du domaine d'action ou spécificité des enzymes. On doit à Emil FISCHER (1894) la notion de spécificité enzymatique, c'est-à-dire de l'existence d'une relation stérique étroite entre l'enzyme et la substance sur laquelle il agit et qu'on appelle substrat. Sur la base des

observations qu'il avait faites avec des substrats de structure connue, FISCHER énonça sa fameuse analogie "clef et serrure" pour l'interaction enzyme-substrat.

Entre 1920 et 1928, WILLSTATTER et ses collaborateurs purifièrent de nombreux enzymes. En 1926, SUMMER obtint pour la première fois un enzyme cristallisé, l'uréase, à partir de la fève Jack et prouva que les cristaux obtenus sont de nature protéique et il conclut que les enzymes sont des protéines, contrairement à l'opinion de l'époque. Cependant, ses idées ne sont pas immédiatement acceptées et ce n'est qu'en 1930 et 1936, période pendant laquelle NORTHROP et KUNITZ isolent sous forme cristalline la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine, que la nature protéique des enzymes est définitivement établie.

Actuellement, plus de 2000 enzymes différents ont été identifiés. Beaucoup ont été purifiés et plus de 200 cristallisés. Bien que la plupart des enzymes responsables des voies métaboliques fondamentales de l'économie cellulaire soient actuellement bien connus, il reste à résoudre de nombreux problèmes importants : le contrôle génétique de la synthèse enzymatique, les mécanismes d'autorégulation auxquels sont soumis de nombreux enzymes, et le rôle des enzymes dans le développement et la différenciation. Mais, surtout, nous ne savons pas encore expliquer en termes moléculaires l'efficacité, la précision et la spécificité de la catalyse enzymatique.

***Première Partie***

**ENZYMOLOGIE GÉNÉRALE**

---

## CHAPITRE PREMIER

### DEFINITION - STRUCTURE DES ENZYMES

#### I - DEFINITION

Un enzyme est une substance de nature protéinique douée d'une activité biocatalytique, c'est-à-dire accroissant la vitesse d'une réaction biochimique. La plupart des réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes spécifiques. Ce sont des protéines et en ont les propriétés physiques : ils sont non dialysables et dénaturables par la chaleur ou par de nombreux agents physiques ou chimiques.

#### II - STRUCTURE DES ENZYMES

##### 1 - STRUCTURE -----

Du point de vue structure, on divise les enzymes en deux catégories :

- . les enzymes entièrement protéiques, c'est le cas de la Ribonucléase ;
- . les enzymes formés de deux parties :
  - une partie protéique appelée apoenzyme
  - une partie non protéique ou coenzyme.

L'analyse cristallographique par les rayons X a montré que les enzymes, comme la myoglobine et l'hémoglobine, ont une structure tridimensionnelle. Cette structure tridimensionnelle est maintenant connue pour de nombreux enzymes comme la Ribonucléase, le Lysozyme, la Lactico déshydrogénase, etc.

## 2 - COENZYMES

-----

La réaction chimique se produit avec le coenzyme et non avec la protéine. La protéine intervient dans la spécificité de la réaction, donc dans la fixation du substrat (on appelle substrat le composé chimique qui est soumis à l'action de l'enzyme. On peut donc appeler toutes molécules biochimiques des substrats).

L'apoenzyme intervient dans la nature de la réaction se produisant au niveau du coenzyme. Ainsi les transaminases (enzymes qui transportent un radical aminé d'un acide aminé (AA) sur un acide cétonique) et les Décarboxylases d'AA (enzymes qui catalysent la décarboxylation des AA) ont un même coenzyme, le phosphate de pyridoxal et un même substrat, l'AA. La différence de réaction est donc liée à l'existence de deux apoenzymes différents.

Dans certains cas, le coenzyme est très fermement lié à l'apoenzyme et on ne peut l'en détacher que par des méthodes qui dénaturent cet apoenzyme. Dans d'autres cas, le coenzyme se détache très facilement par simple dialyse. Ceci explique que la dialyse puisse inactiver un enzyme.

Parmi les réactions qui nécessitent fréquemment la participation d'un coenzyme, il y a des réactions d'isomérisation, d'oxydoréduction et les réactions formant des liaisons covalentes. Par contre, les réactions lytiques, y compris les réactions hydrolytiques comme celles catalysées par les enzymes du tractus digestif, ne nécessitent pas de coenzyme. Dans plusieurs cas, il convient d'envisager le coenzyme comme un second substrat, c'est-à-dire un cosubstrat. Il en est ainsi pour au moins deux raisons :

- premièrement, les changements chimiques subis par le coenzyme contrebalancent exactement ceux subis par le substrat.

Exemple : Dans les réactions d'oxydoréduction (déshydrogénase), une molécule de substrat est oxydée et une molécule de coenzyme est réduite ;

deuxièmement, c'est l'aspect de la réaction qui peut être fondamental du point de vue physiologique.

Exemple : en anaérobiose, le muscle peut transformer le lactate en pyruvate. L'importance de cette réaction ne réside pas dans le lactate ou le pyruvate, mais bien dans la conversion du  $\text{NAD}^+$  en NADH.

La classification des coenzymes peut se faire selon des caractéristiques fonctionnelles ou selon la nature du coenzyme.

#### 2-1 - Coenzymes tétrapyrroliques

Ce sont des coenzymes dont la nature est identique ou voisine de celle de l'hème. Ils renferment le plus souvent des ions métalliques et interviennent dans les transferts d'électrons.

Exemple : Cytochromes, catalase, peroxydase.

#### 2-2 - Coenzymes métalliques

Un grand nombre d'enzymes ont besoin de métal pour agir. Il est difficile de savoir si les métaux ou ions métalliques sont des coenzymes partie intégrante de l'enzyme ou des réactivateurs d'enzyme. Ces enzymes à coenzymes métalliques sont appelés des métalloenzymes.

#### 2-3 - Coenzymes dérivés de vitamines hydrosolubles

On s'est longtemps demandé quel était le mode d'action des vitamines. On sait aujourd'hui qu'après une transformation qui peut être minime : fixation de phosphoryle ou de pyrophosphoryle ou au contraire très importante, la vitamine devient un coenzyme.

Exemple : transaminases.

### 3 - SITE ACTIF

-----

Dans les enzymes sans co-enzymes, c'est la protéine qui intervient dans la réaction enzymatique. En fait, la totalité de la protéine n'intervient pas directement ; seule une petite partie entre en jeu. Si plusieurs AA interviennent, ils ne sont pas nécessairement voisins sur la chaîne polypeptidique ; ils sont par contre voisins dans l'espace du fait de la structure second-tertiaire de la molécule. Ceci explique que la dénaturation inactive l'enzyme, la destruction de cette structure éloignant les AA, normalement voisins dans l'espace. De plus, la forme de la molécule intervient pour fixer le substrat. L'enzyme a une forme telle que le substrat spécifique peut pénétrer et se fixer sur l'enzyme à une place correcte. Plus récemment, KOSHLAND a émis l'hypothèse que le substrat modifie la forme de l'enzyme de sorte qu'il puisse se fixer à la place correcte. On a pu en fait montrer dans quelques cas que le substrat modifiait bien la structure tertiaire de l'enzyme. On sait d'ailleurs qu'en présence de substrat l'enzyme est stabilisé, il est beaucoup plus résistant aux agents dénaturants.

On appelle site actif l'ensemble des AA qui entrent en contact avec le substrat. Il faut en fait distinguer dans le site actif, d'une part le site de fixation qui se combine au substrat et le site catalytique qui agit sur le substrat pour lui faire subir la réaction chimique. Les liaisons disulfures jouent un rôle fondamental en rapprochant les AA du site actif ; les liaisons faibles jouent également ce rôle.

On trouve dans les sites catalytiques de la plupart des enzymes connus un ou plusieurs des AA suivants : Ser, Cys, His, Tyr, Lys. Beaucoup d'enzymes hydrolytiques : enzymes protéolytiques, phosphatase alcaline, estérase, possèdent de la Ser dans leur site. La chymotrypsine et la Trypsine ont de nombreuses séquences communes, en particulier au voisinage du site actif. La Cys se trouve dans le site actif de beaucoup d'enzymes à activité deshydrogénasique, comme la phosphoglyceraldéhyde deshydrogénase et l'alcool deshydrogénase.

## CHAPITRE II

### MECANISME D' ACTION DES ENZYMES

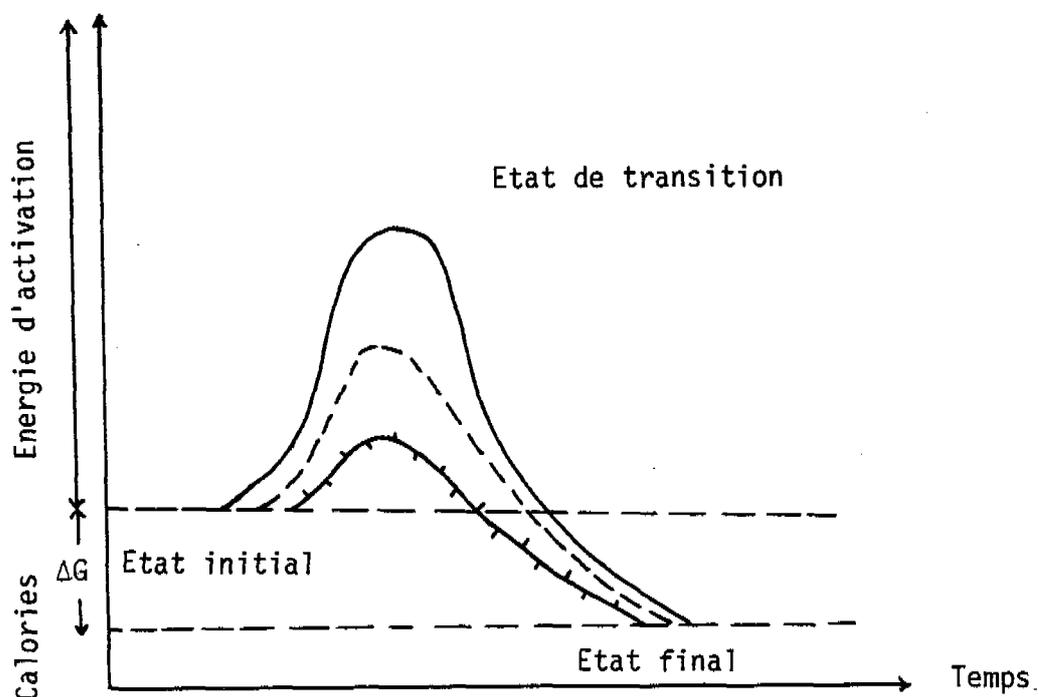
#### I - ETUDE DE LA REACTION ENZYMATIQUE

Les enzymes sont des catalyseurs, ceci implique un certain nombre de caractéristiques :

- . les enzymes ne sont pas modifiés, ils ont la même structure avant et après la réaction ;
- . les enzymes agissent en très petites quantités : une seule molécule transforme plusieurs centaines à plusieurs millions de molécules de substrat ;
- . les enzymes ne modifient pas l'équilibre d'une réaction réversible. L'enzyme en effet, accélère la réaction dans les deux sens également ; l'équilibre final est donc le même qu'en l'absence d'enzyme, mais il est obtenu plus rapidement.

#### 1-1 - ENERGIE D'ACTIVATION

Si une réaction chimique libère de l'énergie, elle devrait pouvoir se faire spontanément. Ce n'est cependant pas le cas, car le composé doit d'abord se mettre en état de transition, et ceci nécessite un apport d'énergie, dite énergie d'activation. C'est à partir de cet état de transition que la réaction se produit, elle restitue l'énergie empruntée pour passer dans l'état de transition, puis elle libère l'énergie de la réaction  $\Delta G$ .



## 1-2 - ACTION SUR LES EQUILIBRES

Nous avons vu que les enzymes ont peu d'action sur l'état final d'équilibre. Ce point est très important car un grand nombre de réactions cellulaires sont des réactions réversibles.

Exemple : la réaction d'hydrolyse d'un ester est une réaction réversible.

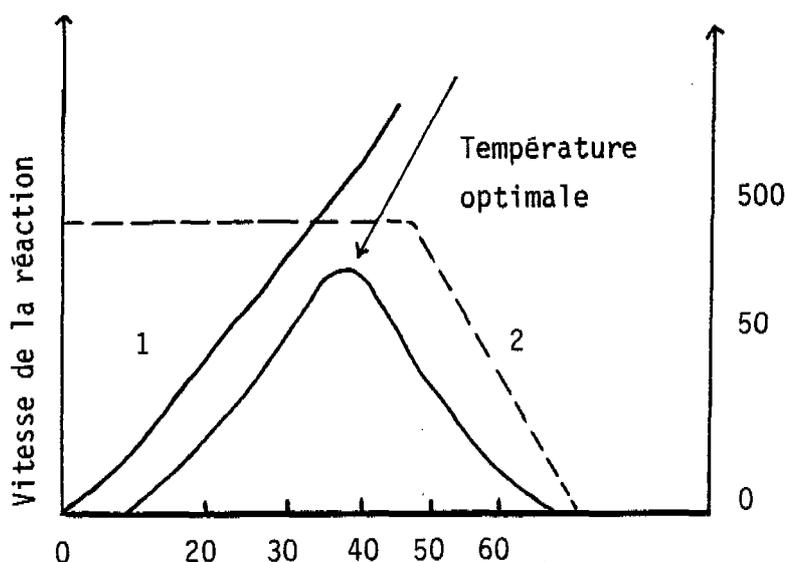


En présence d'enzyme l'équilibre final est toujours le même, mais il est atteint beaucoup plus rapidement. Cette règle ne souffre en principe pas d'exception. Cependant, lorsqu'on se reporte à l'ensemble des réactions cellulaires, les faits se présentent de manière légèrement différente :

- Les réactions polyenzymatiques : dans la cellule, les réactions ne sont pas isolées, un même substrat peut être soumis à plusieurs



la vitesse de la réaction augmente rapidement avec la température. Ceci est également vrai pour les réactions enzymatiques. Mais les enzymes étant des protéines, ils sont dénaturés par les températures relativement élevées.



La température optimale est un compromis entre le fait que l'élévation de la température augmente la vitesse de la réaction (courbe 1) et qu'en même temps, elle dénature l'enzyme (courbe 2). Il est difficile de donner une valeur précise à la température optimale d'une réaction enzymatique, la vitesse de dénaturation de l'enzyme étant fonction du pH et de la durée de la réaction. La vitesse de la plupart des réactions enzymatiques double approximativement quand la température augmente de  $10^{\circ}\text{C}$  ( $Q_{10} \approx 2,0$ ). Cependant, le coefficient  $Q_{10}$  varie d'un enzyme à un autre selon l'énergie d'activation de la réaction catalysée, c'est-à-dire selon la hauteur de la barrière énergétique de l'état de transition.

## 2-2 - INACTIVATION THERMIQUE DES ENZYMES

L'inactivation thermique est la dénaturation par la chaleur de l'enzyme, ce qui se traduit par une baisse de l'activité enzymatique. A une température donnée, l'inactivation relative est une fonction exponentielle

du temps. On opère évidemment à des températures sensiblement plus élevées que la température optimale.

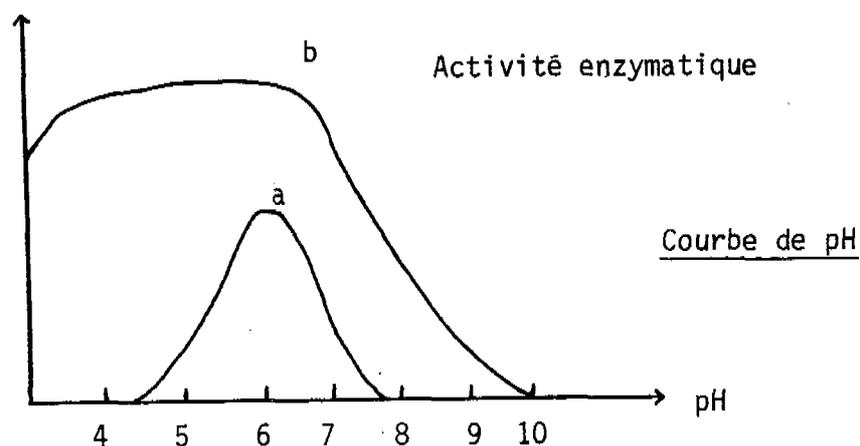
Si  $E$  est l'activité résiduelle de l'enzyme chauffé,  $E_0$  l'activité de l'enzyme natif, on a  $E = E_0 e^{-kt}$   $K =$  constante d'inactivation,  $t =$  durée de chauffage, d'où  $\text{Log } \frac{E}{E_0} = -Kt$ .

En coordonnées semi-logarithmiques à une température donnée, l'activité enzymatique relative est une fonction linéaire du temps. L'inactivation ne se manifeste qu'au dessus d'une certaine température.

### 3 - pH ET ACTIVITE ENZYMATIQUE

Les réactions enzymatiques sont très sensibles au pH du milieu. Ceci tient à trois facteurs :

- . Les pH extrêmes modifient irréversiblement la structure de l'enzyme en dénaturant la protéine et en modifiant dans certains cas la liaison entre apoenzyme et coenzyme ;
- . le pH modifie l'ionisation du substrat dans un grand nombre de cas ;
- . le pH a une action sur la réaction enzyme-substrat et sur la catalyse, en particulier en modifiant l'ionisation des acides aminés du site actif.



Les enzymes peuvent présenter deux types de courbes en fonction du pH :

- a) - une courbe en cloche avec maximum strict ;
- b) - une courbe en sigmoïde avec un plateau.

La plupart des enzymes présentent un pH optimum caractéristique pour lequel leur activité atteint une valeur maximum ; au-dessus ou au-dessous de ce pH, l'activité de l'enzyme diminue. Cependant, la représentation des activités enzymatiques en fonction du pH n'a toujours pas l'aspect d'une courbe en cloche, mais peut varier considérablement. La relation entre le pH et l'activité d'un enzyme donné dépend du comportement acido-basique de l'enzyme et de son substrat ainsi que de nombreux autres facteurs difficiles à analyser de façon quantitative.

Le pH optimum d'un enzyme n'est pas forcément identique au pH intracellulaire normal, qui peut se placer sur les pentes ascendantes ou descendantes de la courbe d'activité. Ce fait laisse supposer que l'effet du pH sur les activités enzymatiques peut être un des éléments de la régulation intra-cellulaire du métabolisme.

## CHAPITRE III

### CINETIQUE ENZYMATIQUE

Le phénomène fondamental de l'action enzymatique est que, pour agir, l'enzyme doit se combiner au substrat. Après formation du complexe, le substrat est transformé en produit et est libéré ; l'enzyme retrouve sa structure primitive.

La vitesse de réaction se mesure par le dosage du produit apparu sous l'action de l'enzyme ou du substrat disparu par unité de temps.

L'activité moléculaire d'un enzyme est le nombre de molécules de substrat transformées par minute par une molécule d'enzyme dans les conditions optimales. Ceci nécessite la connaissance de la masse molaire de l'enzyme. Aussi exprime-t-on plus fréquemment l'activité sous forme d'activité spécifique, c'est-à-dire en nombre d'unités d'activité enzymatique contenues par milligramme de protéine. Une unité d'activité enzymatique est la quantité qui transforme une micromole de substrat par minute dans les conditions optimales.

#### 1 - VITESSE DE LA REACTION EN FONCTION DU TEMPS :

Indépendamment de la cinétique enzymatique, définissons l'ordre d'une réaction chimique :

##### a) - Réaction d'ordre zéro :

-----

On appelle réaction d'ordre zéro une réaction dans laquelle la quantité de substrat transformé par unité de temps reste constante. Ceci signifie que si l'on fait une réaction enzymatique avec un substrat

et que l'on fait un prélèvement toutes les minutes, on constate que la même quantité de substrat a disparu entre chaque prélèvement. On a donc :

$$v = - \frac{dc}{dt} = k$$

- dc = diminution de la concentration du substrat
- dt = variation du temps
- v = vitesse : elle est constante.

#### b) - Réactions d'ordre 1

-----

Ce sont des réactions dans lesquelles la quantité de substrat transformé par unité de temps est proportionnelle à la quantité de substrat présent. Par exemple, il se transforme chaque minute 1/10 du substrat présent dans le milieu. La vitesse de disparition est ici, non pas constante, mais proportionnelle à la concentration de substrat présent : elle diminue donc constamment. On a :

$$v = - \frac{dc}{dt} = kc \quad \text{où}$$

k = constante de vitesse de l'enzyme.

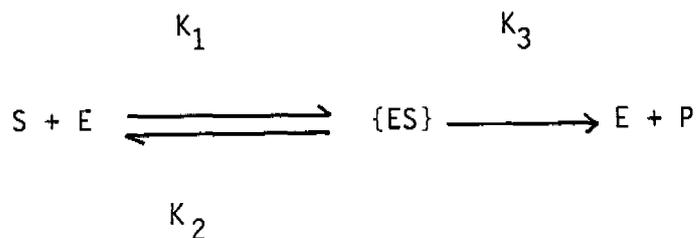
La courbe de la concentration du substrat en fonction du temps est une exponentielle décroissante. Il existe des réactions d'ordre supérieur dont la cinétique est fort complexe. On détermine pour ces réactions la vitesse initiale de la réaction qui est représentée par la tangente de la courbe extrapolée au temps zéro.

## 2 - VITESSE DE LA REACTION EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ENZYME :

Les réactions enzymatiques se font en général en excès de substrat. Dans ces conditions, la vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le milieu. Ceci n'est exact que jusqu'à une certaine limite au-delà de laquelle la vitesse baisse par défaut de substrat.

### 3 - VITESSE DE LA REACTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT

C'est l'aspect le plus important de la cinétique enzymatique, qui a été étudié par HENRI en 1905, puis par MICHAELIS et MENTEN en 1913. La vitesse de réaction n'est pas proportionnelle à la concentration du substrat. Elle augmente avec la concentration du substrat puis tend à devenir constante, la courbe tendant vers une asymptote qui est la vitesse maximum. Le substrat S se combine avec l'enzyme E pour former un complexe {ES} ; nous avons vu précédemment la nature de ce complexe. La réaction de combinaison est réversible. Mais de plus, le substrat est transformé en produit P sous l'action de l'enzyme. On a donc, en appelant K les constantes de vitesse respectives :



|S| = concentration du substrat

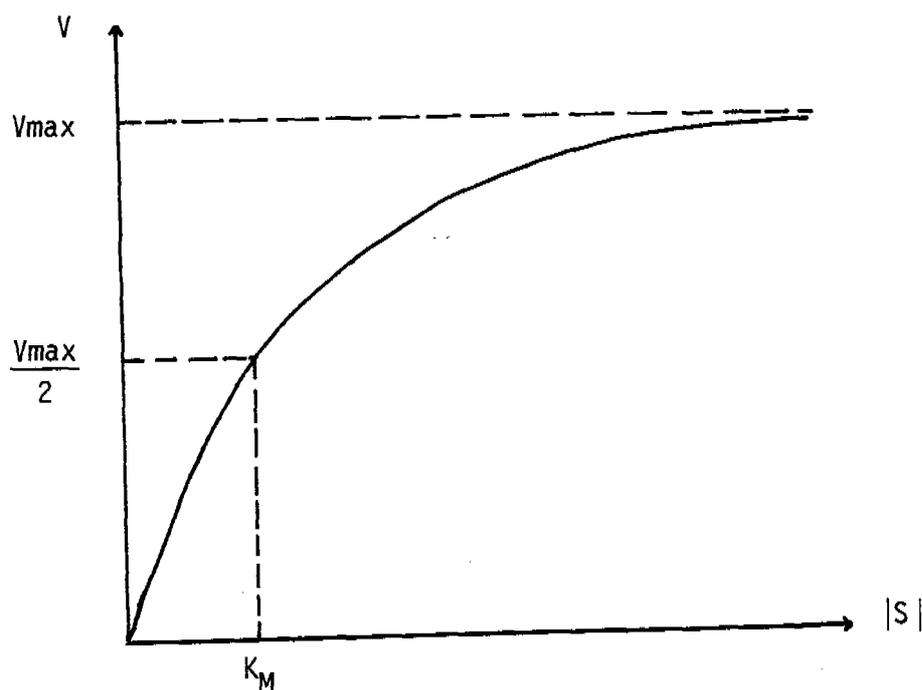
|E| = concentration de l'enzyme

|ES| = concentration de l'enzyme combiné

|E| - |ES| = concentration de l'enzyme non combiné.

La vitesse de réaction (V) est proportionnelle à la concentration |ES|. La vitesse de formation de ES est proportionnelle à la concentration de substrat et d'enzyme libre. On peut écrire la relation suivante, la concentration de S étant très élevée, on peut négliger la quantité combinée à l'enzyme.

$$v = - \frac{d |ES|}{dt} = K_1 |S| ( |E| - |ES| )$$



Vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat.  
COURBE DE MICHAELIS-MENTEN

La vitesse de disparition de ES est proportionnelle à sa concentration, elle se fait par la réaction inverse de la formation et par libération du produit de la réaction :

$$V' = - \frac{d |ES|}{dt} = k_2 |ES| + k_3 |ES|$$

Lorsque les vitesses de formation (V) et de disparition (V') sont égales, on a :

$$V = V' \quad k_1 |S| \{ |E| - |ES| \} = k_2 |ES| + k_3 |ES|$$

On appelle constante de MICHAELIS-MENTEN le rapport :

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad \text{ou} \quad k_M = \frac{|S| \{ |E| - |ES| \}}{|ES|} \quad (1)$$

On résout l'équation pour avoir  $|ES|$ :

$$K_M |ES| = |S| \{|E| - |ES|\} \Rightarrow |ES| \{K_M + |S|\} = |S| |E|$$

$$\Rightarrow |ES| = \frac{|E| |S|}{K_M + |S|} \quad (2)$$

La vitesse initiale ( $V_0$ ) de la réaction est proportionnelle à la concentration de  $|ES|$  formé :  $V_0 = k_3 |ES|$ .

Lorsque l'on met un grand excès de substrat, on a la vitesse maximum qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme du milieu, car on peut considérer que tout l'enzyme est sous la forme  $|ES|$

$$V_{\max} = k_3 |E|$$

On peut donc remplacer, dans l'équation (2),  $|ES|$  et  $|E|$  par les vitesses qui sont proportionnelles à ces quantités ; on a ainsi :

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_M + |S|}$$

C'est l'équation fondamentale de la cinétique enzymatique ou équation de MICHAELIS-MENTEN.

Nous pouvons discuter l'équation de MICHAELIS-MENTEN :

- a) - quand  $|S|$  est beaucoup plus petit que  $K_M$ , l'addition de  $|S|$  à  $K_M$  change très peu sa valeur. Comme les valeurs de  $V$  et de  $K_M$  sont constantes, nous pouvons remplacer leur rapport par une nouvelle constante  $K$ , d'où :

$$V = \frac{V_{\max} |S|}{K_M + |S|} \Rightarrow V = \frac{V_{\max} |S|}{K_M} = \frac{V_{\max}}{K_M} |S| = K |S|$$

Quand la concentration du substrat est beaucoup trop faible pour produire la moitié de la vitesse maximum (la valeur de  $K_M$ ), la vitesse  $V$  est alors fonction de la concentration du substrat  $|S|$

b) - Quand  $|S|$  est beaucoup plus grand que  $K_M$ , on a alors :

$$V = \frac{V_{\max} |S|}{K_M + |S|} \quad V = \frac{V_{\max} |S|}{|S|} = V_{\max}$$

Ainsi, lorsque  $|S|$  dépasse de beaucoup la valeur de  $K_M$ , la vitesse devient maximum et elle est égale à  $V_{\max}$ .

c) - Quand  $|S| = K_M$ , on a 
$$V = \frac{V_{\max} |S|}{|S| + |S|} = \frac{V_{\max} |S|}{2 |S|} = \frac{V_{\max}}{2}$$

Donc, si la concentration du substrat est égale à la valeur de  $K_M$ , la vitesse mesurée  $V$  est égale à la moitié de la vitesse maximum. Il en résulte cette constatation très importante :

" La constante de MICHAELIS-MENTEN est égale à la concentration (en mole par litre) de substrat pour laquelle la vitesse est la moitié de la vitesse maximum".

On peut écrire l'équation fondamentale en inverse :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + |S|}{V_{\max} |S|} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{|S|} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$\frac{K_M}{V_{max}}$  est une constante K. Si l'on fait la courbe  $\frac{1}{V}$  en fonction de  $\frac{1}{|S|}$  on a une droite dont la pente est égale à  $\frac{K_M}{V_{max}} = K$  et qui coupe les ordonnées en  $\frac{1}{V_{max}}$  (puisque  $\frac{1}{|S|}$  tend vers 0).

Pour déterminer la signification du point de rencontre avec les abscisses, prenons l'équation pour

$$\frac{1}{V} = 0. \text{ D'ou l'on tire } \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{|S|} + \frac{1}{V_{max}} = 0$$

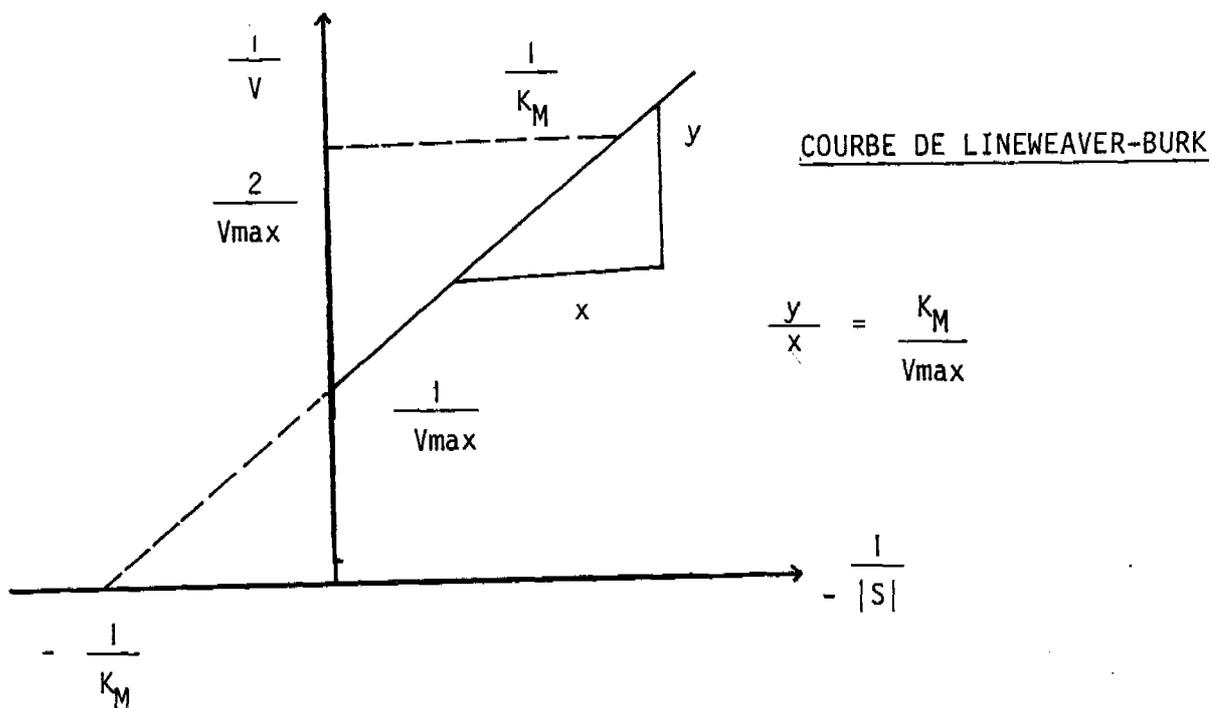
$$\Rightarrow \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{|S|} = -\frac{1}{V_{max}} \Rightarrow K_M \cdot \frac{1}{|S|} = -1 \Rightarrow K_M = -|S| \text{ ou}$$

$$-\frac{1}{K_M} = \frac{1}{|S|}$$

Le point de rencontre de la droite avec les abscisses correspond à la valeur  $-\frac{1}{K_M}$ .

On a ainsi le mode de représentation de LINEWEAVER-BURK, qui est particulièrement commode pour déterminer les constantes cinétiques d'un enzyme.

(voir courbe page suivante)



La constante de MICHAELIS-MENTEN d'un enzyme est d'autant plus basse que l'enzyme est plus actif, puisqu'elle exprime approximativement l'inverse de l'affinité du substrat pour l'enzyme. Elle va de  $10^{-6}$  mole/l pour les enzymes très actifs comme les peroxydases à  $10^{-2}$  pour des enzymes peu actifs comme les enzymes protéolytiques.

## CHAPITRE IV

### EFFECTEURS ENZYMATIQUES

Les effecteurs sont des composés chimiques qui modifient la réaction enzymatique. Ce sont des activateurs ou des inhibiteurs.

Les effecteurs agissent sur l'enzyme, le coenzyme, le complexe enzyme-substrat, le substrat. Ils présentent un double intérêt : d'une part un intérêt biologique, en particulier dans la régulation des métabolismes, d'autre part un intérêt biochimique, car ils permettent d'acquérir des notions importantes sur le mode d'action des enzymes. Selon leur mécanisme d'action, il existe plusieurs types d'effecteurs enzymatiques.

#### 1 - INHIBITEURS COMPETITIFS :

Ce sont des composés dont la structure ressemble à celle du substrat. Ils se combinent à l'enzyme pour lequel leur affinité est souvent plus élevée que celle du substrat naturel et prennent la place de celui-ci. On a donc deux réactions qui se produisent simultanément, I étant l'inhibiteur,



La constante de dissociation de EI, équivalent de  $K_M$  vis-à-vis de l'inhibiteur, est :

$$K_I = \frac{|E| |I|}{|EI|}$$

L'équation de la réaction sans inhibiteur :

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{[S]}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}}$$

devient :

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right\} \times \frac{[S]}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}}$$

De cette équation on peut conclure que, lorsque la concentration du substrat augmente pour une même quantité d'inhibiteur,  $\frac{V}{[S]}$  tend vers zéro et le produit devient nul :

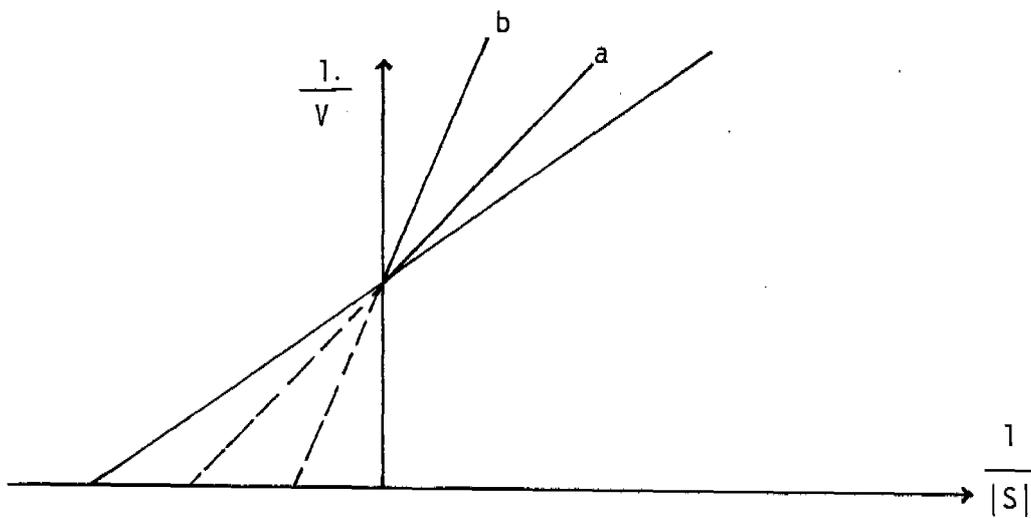
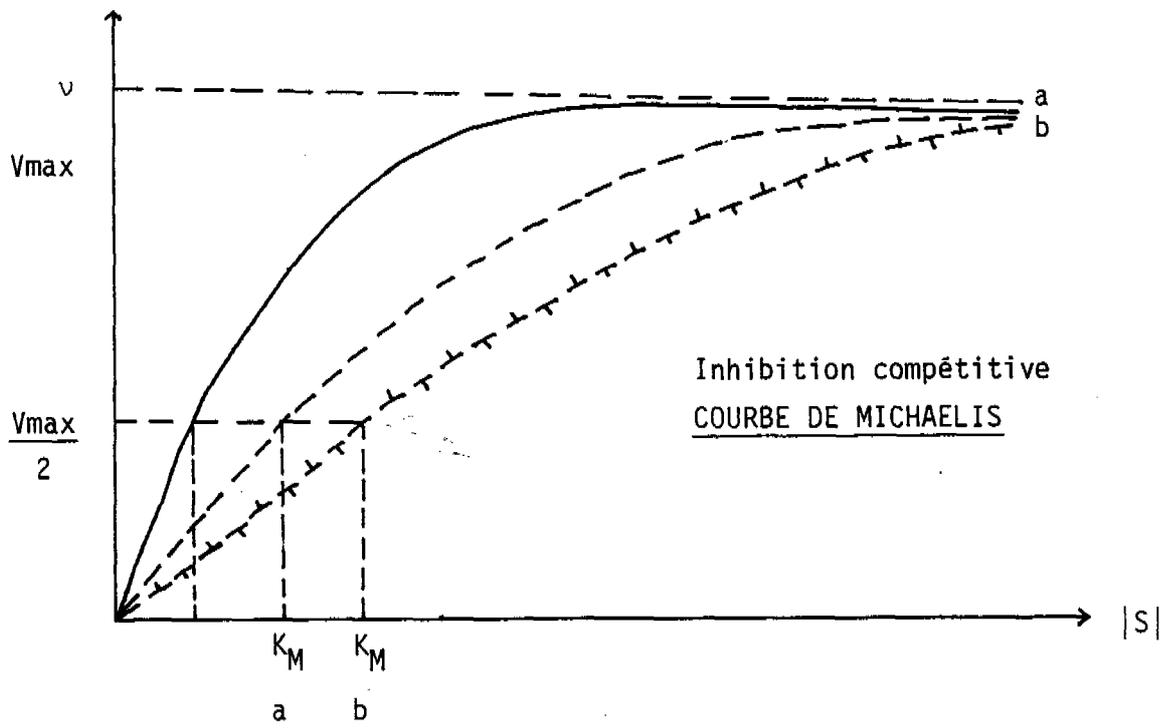
$V$  tend vers  $V_{\max}$ .

La valeur de la vitesse maximum est la même qu'en l'absence d'inhibiteur. La pente de la courbe est augmentée, elle est en effet de :

$$\frac{K_M}{V_{\max}} \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_I} \right\}$$

elle augmente d'autant plus que la concentration de l'inhibiteur est élevée.

(voir courbes page suivante)



Les inhibiteurs compétitifs augmentent la pente de la courbe d'un facteur égal à

$$1 + \frac{|I|}{K_I}$$

- a) petite quantité d'inhibiteur
- b) quantité élevée d'inhibiteur

Les inhibitions compétitives étant réversibles, plus la concentration de substrat augmente, moins l'effet de l'inhibiteur se fait sentir. Par ailleurs, l'enzyme étant partiellement combiné à l'inhibiteur, son affinité pour le substrat diminue,  $K_M$  augmente. Il existe de nombreux inhibiteurs compétitifs. Du point de vue chimique ils se caractérisent par une grande analogie structurale avec les substrats. On peut considérer que la spécificité de l'enzyme ne lui permet pas de distinguer entre le substrat et l'inhibiteur.

Exemples :

1°) - l'acide malonique est un inhibiteur compétitif de la succino-déshydrogénase, dont le substrat est l'acide succinique ;

2°) - l'acide fluorocitrique est un inhibiteur compétitif de l'aconitase qui agit sur l'acide citrique.

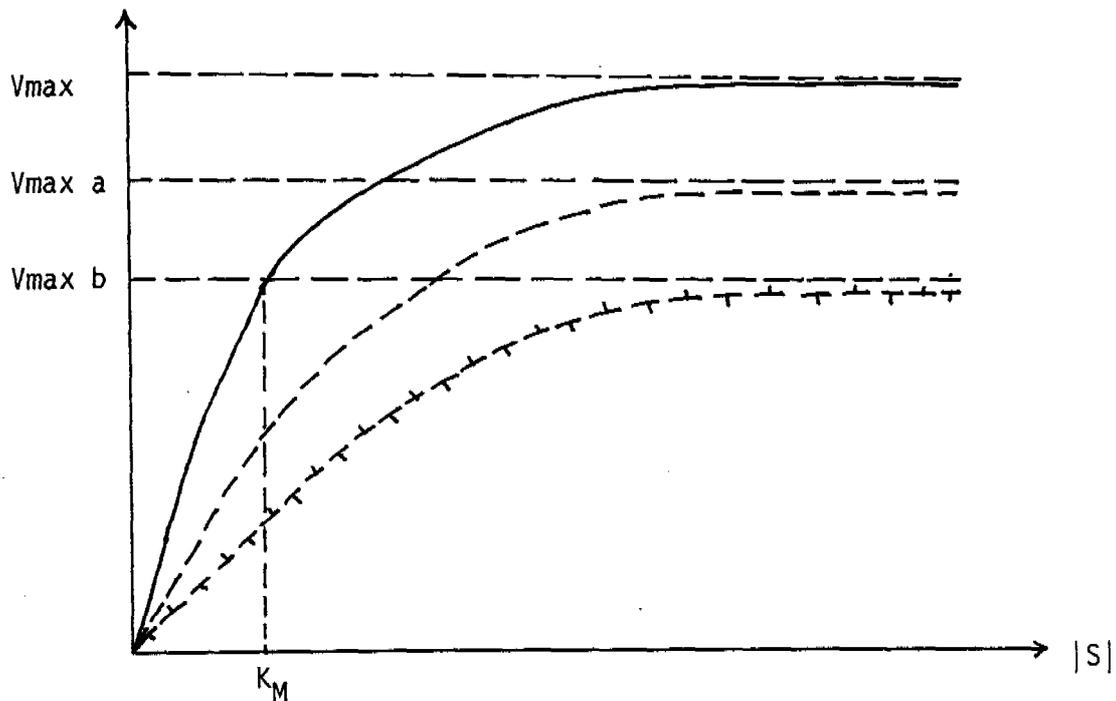
## 2 - INHIBITEURS NON COMPÉTITIFS

Ces inhibiteurs agissent parfois réversiblement mais leur action n'est pas levée par addition d'un excès de substrat. C'est le cas de métaux lourds qui se combinent aux groupement  $-SH$  dans les enzymes chez lesquels la cystéine joue un rôle important, des fluorures qui se combinent à l'ion  $Mg^{2+}$ , de l'EDTA qui se combine à un grand nombre de métaux.

En présence de ces inhibiteurs, une partie de l'enzyme étant inactive, la vitesse de réaction et la vitesse maximum sont diminuées, mais la constante de MICHAELIS-MENTEN reste inchangée.

Si l'on trace les courbes de LINEWEAVER-BURK, en absence et en présence de quantités variables d'inhibiteurs, on obtient des droites qui convergent vers le point correspondant sur l'axe des abscisses à  $-1/K_M$ , mais les pentes de ces droites sont d'autant plus grandes qu'il y a plus d'inhibiteur.

Il existe de nombreux inhibiteurs se combinant irréversiblement aux enzymes, en particulier aux sites actifs. Les enzymes ainsi traités ne répondent plus aux lois de MICHAELIS-MENTEN.



COURBE DE MICHAELIS-MENTEN

- a) - addition d'une petite quantité d'inhibiteur
- b) - addition d'une grande quantité d'inhibiteur

### 3 - INHIBITION PAR PRODUITS DE LA REACTION

Le phénomène, apparemment paradoxal, s'explique facilement ainsi : le produit de la réaction ressemble souvent structurellement au substrat, si bien qu'en s'accumulant, le produit se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'enzyme dans une certaine mesure. On imagine aisément que ce processus puisse avoir un rôle régulateur : lorsqu'un composé s'accumule, il tend à freiner sa propre production. Ainsi le glucose est un inhibiteur compétitif de la  $G_6P$  qui catalyse la réaction :



#### 4 - INHIBITION PAR EXCES DE SUBSTRAT :

Si le milieu d'incubation contient une grande quantité de substrat, la réaction est ralentie. La courbe de MICHAELIS tend à descendre aux hautes concentrations de substrat. Ceci peut s'expliquer en admettant que le substrat peut occuper anormalement certaines parties du site actif, empêchant la réaction de se produire.

#### 5 - ACTIVATION PAR PROTECTION DE L'ENZYME :

Les composés qui protègent les enzymes contre les agressions chimiques, comme les oxydations pour les enzymes à Cys par exemple, se comportent comme des activateurs. C'est le cas par exemple de la Cys et du glutathion, qui protègent les groupements -SH.

#### 6 - ACTIVATION PAR LES IONS :

L'exemple le plus classique est celui des ions  $Mg^{++}$  qui sont indispensables dans les réactions impliquant des transferts de phosphoryle, en particulier ceux mettant en jeu l'ADP et l'ATP. Il est souvent difficile de savoir si un ion est un coenzyme qui fait partie intégrante de l'enzyme ou si c'est un activateur obligatoire. L'ion peut intervenir sur l'enzyme, mais également sur le substrat et dans ce cas, ce serait le complexe ion-substrat qui réagirait avec l'enzyme.

#### 7 - ACTIVATION PAR ACTION SUR LES SUBUNITES ENZYMATIQUES :

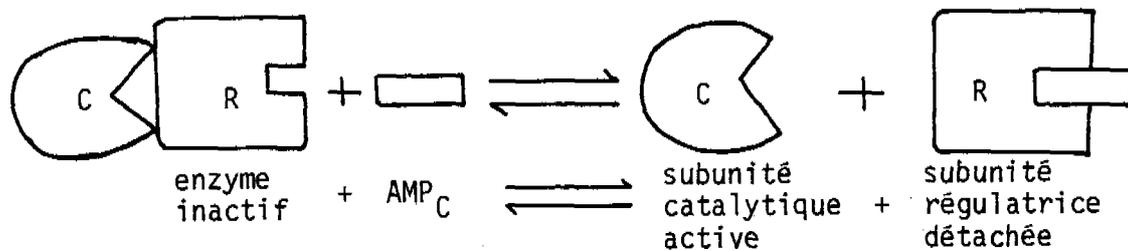
Un groupe d'enzymes importants a été mis en évidence récemment : il s'agit des Protéines-Kinases qui catalysent la réaction suivante :



Le groupement phosphoryle se combine à un reste de Ser ou de Thr. Les principaux substrats sont : Histones, Protamines, Phosvitine, Caséine, Phosphorylase-kinase.

Le mécanisme d'activation de ces Protéines-kinases par l'AMPC est le suivant :

L'enzyme est formé de deux subunités : une subunité catalytique, qui comprend le site actif et une subunité régulatrice qui comprend un site de fixation de l'AMPC. L'enzyme ainsi constitué est inactif, le site actif étant dissimulé. Lorsque l'on ajoute l'activateur, celui-ci se combine à la subunité régulatrice et la détache de l'autre subunité, dont le site actif est ainsi mis à jour. Ce processus est réversible.



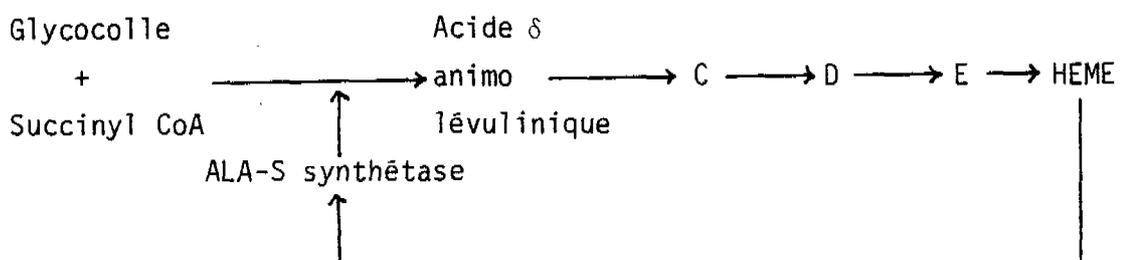
### 8 - EFFECTEURS ALLOSTÉRIQUES

Les effecteurs allostériques sont les plus intéressants à étudier, car ce sont surtout eux qui jouent un rôle régulateur dans la cellule. L'interprétation de l'effet allostérique a été donnée par MONOD, CHANGEUX et WYMAN en 1965.

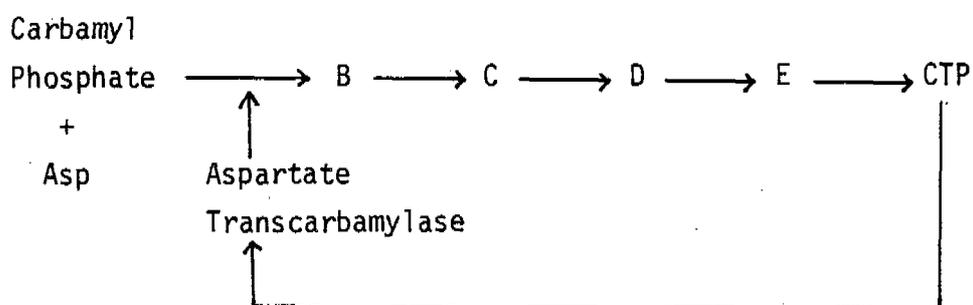
Exemples d'effecteurs allostériques :

-----

- La synthèse de l'hème à partir du glycolle et du succinyl CoA commence par la synthèse de l'acide  $\delta$  aminolévulinique. L'enzyme catalysant cette synthèse est la  $\delta$  aminolévulinate-synthétase. Chez Rhodopseudomonaspheroïdes, l'hème inhibe cet enzyme.



→ Un autre exemple est la chaîne métabolique (étudiée par GERHARDT et PARDEE) qui part du carbamylphosphate et de l'acide aspartique (Asp) pour former la Cytidine Triphosphate (CTP) ; cette longue chaîne comprend de nombreuses réactions intermédiaires. On a remarqué que l'addition de CTP inhibait sa propre synthèse : cette inhibition porte surtout sur le premier enzyme de la chaîne qui est l'Aspartate transcarbamylase. L'ATP par contre est un activateur de cet enzyme.



Les effecteurs allostériques que nous venons de voir possèdent trois propriétés caractéristiques :

- 1°) - leur structure est souvent très éloignée de celle du substrat naturel de l'enzyme ;
- 2 ) - leur action est très spécifique ; des composés de structure voisine n'ont pas d'action ;
- 3 ) - ils agissent sur le premier enzyme spécifique de la chaîne métabolique.

La première propriété a fait donner à ces effecteurs le qualificatif d'allostériques. De l'étude de la cinétique de ces enzymes, il ressort tout d'abord la constatation que ces enzymes ne donnent pas une courbe du type MICHAELIS-MENTEN lorsque l'on mesure la vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat. La courbe est sigmoïde : les petites quantités de substrat ne sont pratiquement pas transformées ; la vitesse de réaction augmente à partir d'un certain seuil. Il y a un effet coopératif des molécules de substrat. Cet effet coopératif peut

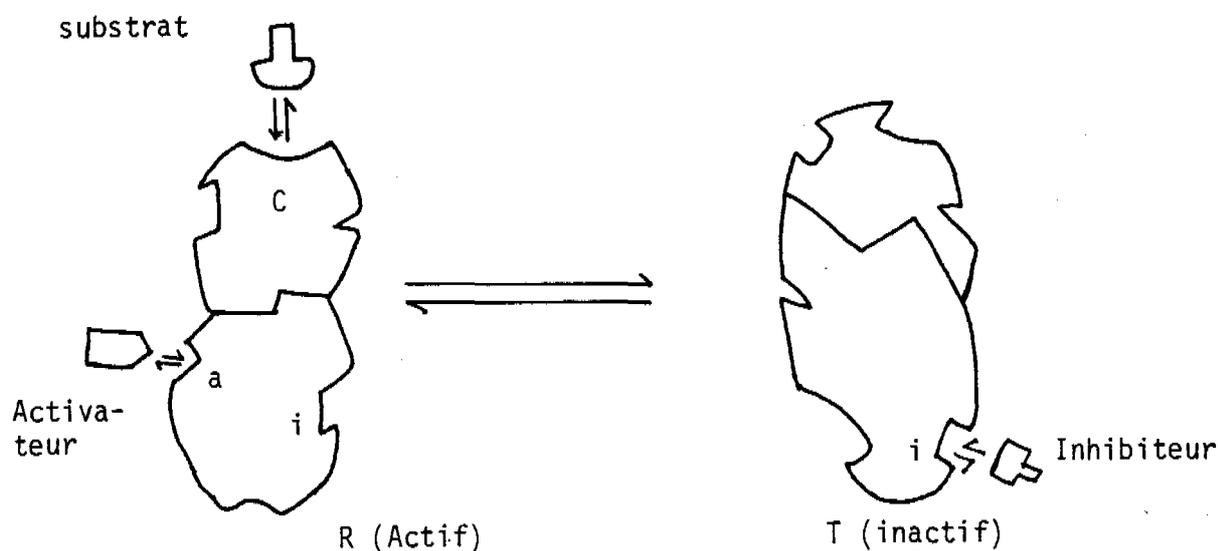
disparaître lorsque l'on soumet l'enzyme à un chauffage modéré ou lorsque l'on ajoute des ions lourds. On a alors une cinétique Michaelienne, c'est la désensibilisation de l'enzyme.

L'effet coopératif est également présenté par les inhibiteurs et les activateurs.

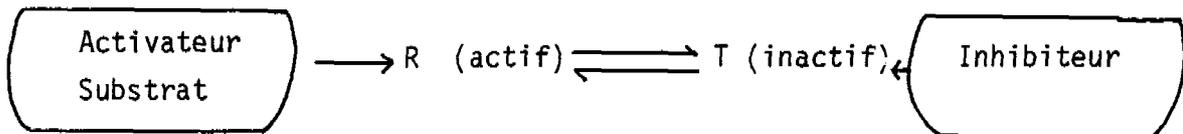
Les enzymes allostériques possèdent deux types de site : le site actif qui se combine au substrat et qui catalyse la réaction enzymatique, le site régulateur qui peut se combiner à un effecteur, activateur ou inhibiteur. Les deux types de site sont séparés sur la molécule.

La désensibilisation de l'enzyme résulte de l'inactivation du site régulateur. Les enzymes allostériques sont formées de plusieurs subunités identiques, appelées protomères et formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques chacune. Ces protomères sont associés de sorte qu'ils occupent des positions équivalentes, la molécule possédant un axe de symétrie. Chaque protomère possède un seul site catalytique et un seul site pour chaque type d'effecteur, au maximum.

Il existe deux états de l'enzyme, qui sont en équilibre : un état catalytique (R ou relax) et un état inhibé (T ou tense). Dans l'état catalytique, la forme de l'enzyme lui permet de se combiner au substrat et à l'activateur. Dans la forme inhibée, seul l'inhibiteur peut se combiner. Le passage d'une forme à l'autre est appelé transition allostérique.



Les ligands (on appelle ainsi le substrat ou les effecteurs), lorsqu'ils sont combinés, stabilisent la molécule dans l'état R ou T selon la nature du ligand et ceci déplace l'équilibre dans le sens de l'enzyme stabilisé.



Transition allostérique

L'enzyme existe alors sous deux formes en équilibre et selon que l'on ajoute du substrat ou de l'activateur, ou que l'on ajoute de l'inhibiteur, on déplace l'équilibre vers une forme ou vers l'autre de l'enzyme. On comprend que le substrat et l'activateur sont équivalents du point de vue de leur action sur l'enzyme. L'existence de plusieurs protomères identiques explique que plusieurs molécules de substrat puissent être transformées simultanément lorsque l'enzyme est stabilisé sous forme active, à l'état catalytique R.

La symétrie de la molécule est conservée dans les formes R et T. Il doit exister des relations de conformation entre protomères. La transformation de l'état d'un protomère entraînant nécessairement la transformation des autres protomères, la structure quaternaire de ces enzymes doit donc se comprendre, non pas simplement par une juxtaposition de subunités, mais par la formation d'une nouvelle structure dans laquelle chaque subunité est étroitement associée aux autres.

## CHAPITRE V

### ENZYMES ET METABOLISMES SPECIFICITE ET CLASSIFICATION

#### 1 - SPECIFICITE

Les catalyseurs non protéiques accélèrent de façon typique un grand nombre de réactions chimiques. Au contraire, un enzyme donné ne catalyse qu'un très petit nombre de réactions et souvent, une seule. Ce pouvoir que possède un enzyme de catalyser une réaction spécifique et pratiquement aucune autre peut être sa propriété la plus importante. Les vitesses d'un grand nombre de processus métaboliques peuvent alors être contrôlées avec précision par des changements appropriés dans l'efficacité catalytique d'enzymes particuliers. Ce contrôle exercé par les enzymes est essentiel pour qu'une cellule, un tissu ou un organisme entier puisse fonctionner normalement.

La possibilité que toutes les réactions d'un organisme vivant se produisent dépend, en partie, de la concentration relative des substrats apparentés dans la cellule et de leur affinité relative pour un enzyme. Parmi les divers types de spécificité enzymatique, on distingue :

#### 1-1 - SPECIFICITE OPTIQUE :

A l'exception des épimérases (racémases) qui catalysent l'interconversion des isomères optiques, les enzymes montrent généralement une spécificité optique absolue pour, au moins, une portion de la molécule d'un substrat.

Exemples :

-----  
→ la maltase catalyse l'hydrolyse des  $\alpha$  glucosides mais non

celle des  $\beta$  Glucosides ;

→ les enzymes de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF catalysent l'inter-conversion des D- mais non des L- Phospho-Glucides.

La spécificité optique peut s'étendre à une portion de la molécule du substrat ou à la molécule entière.

Apparemment, beaucoup de substrats forment trois liens avec les enzymes. Ce mécanisme de liaison à trois points peut donc rendre asymétrique une molécule par ailleurs symétrique.

#### 1-2 - SPECIFICITE DE GROUPE :

-----

Un enzyme particulier n'agit que sur des groupements chimiques particuliers, par exemple les Glucosidases agissent sur les Glucosides, l'alcool-deshydrogénase sur les alcools, la pepsine et la trypsine hydrolysent les liaisons peptidiques et les estérases les liaisons esters. A l'intérieur de ces limites cependant, un grand nombre de substrats peuvent être attaqués : c'est ainsi que le nombre des enzymes nécessaires à la digestion est assez restreint ; sans cette propriété, il en faudrait beaucoup plus.

Certains enzymes ont une spécificité supérieure à la spécificité de groupe : la chymotrypsine hydrolyse les liaisons peptidiques contenant un groupement carboxyle provenant des AA aromatiques, Tyr, Phe, Trp. Les carboxypeptidases et les amino-peptidases détachent respectivement, un à la fois, des groupements carboxyles ou aminés terminaux des chaînes peptidiques.

Bien que certaines oxydoréductases agissent également bien en présence de NAD ou de NADP comme accepteur d'électron, la plupart préfèrent l'un ou l'autre de ces accepteurs.

## 2 - CLASSIFICATION

Le rôle d'une classification est de mettre en évidence des relations et des ressemblances d'une façon précise et concise.

Les premiers essais de nomenclature et de classification des enzymes nous ont apporté une série confuse de noms ambigus et sans signification tels que amygdaline, ptyaline ou zymase.

Plus tard, on a nommé les enzymes en ajoutant le suffixe -ase au nom des substrats sur lesquels ils exerçaient leurs actions.

Exemples :

- les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon, les lipases hydrolysent les lipides et les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les protéines ;
- Certains groupes d'enzymes sont appelés oxydases, glucosidases, déshydrogénases, décarboxylases, etc.

Enfin, des études récentes portant sur le mécanisme des réactions organiques et des réactions catalysées par les enzymes ont permis de classer les enzymes de façon plus rationnelle. C'est surtout le système de classification de l'I U B (International Union of Biochemistry) qui s'est imposé à cet égard : il est complexe mais précis, descriptif mais instructif. Aussi la nécessité de réviser ce système périodiquement s'impose-t-il au fur et à mesure de l'évolution de l'enzymologie. Nous n'avons pas la prétention de faire une étude exhaustive de cette classification, aussi nous limiterons-nous simplement à donner les principales caractéristiques du système de l'I U B :

- a) - les réactions(et les enzymes qui les catalysent)sont divisées en six classes majeures, chacune comprenant de quatre à treize sous-classes ;
- b) - le nom d'un enzyme est formé de deux parties : la première

est le nom du substrat ou des substrats, la deuxième se termine par -ase et elle désigne le type de réaction catalysée (on n'ajoute plus le suffixe -ase directement au nom des substrats) ;

- c) - lorsqu'il est nécessaire de clarifier la nature de la réaction, on ajoute une information additionnelle entre parenthèses ;
- d) - chaque enzyme possède un numéro de code (EC). Le premier chiffre de ce code indique à quelle classe appartient la réaction type, le deuxième chiffre désigne la sous-classe et le troisième la sous-sous classe. Le quatrième chiffre indique l'enzyme particulier que nous voulons nommer.

Ainsi, E.C. 2.7.1.1. désigne la classe 2 (transférase), la sous-classe 7 (transfert de phosphate) et la sous-sous-classe 1 (fonction alcool comme accepteur de phosphate). Le dernier chiffre désigne l'enzyme, l'hexokinase.

Le système I U B nous décrit six classes majeures d'enzymes :

- 1°) - oxydoréductases : enzymes qui catalysent les oxydoréductions entre deux substrats S et S' :



Cette importante classe comprend les enzymes d'abord connus sous le nom de déshydrogénases ou d'oxydases ;

- 2°) - transférases : enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement G (autre que l'hydrogène) entre une paire de substrats S et S' :



Dans cette classe figurent les Acyltransférases, Glycosyltransférases :

- 3°) - hydrolases : enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons ester, éther, peptidique, glycosyle, anhydride d'acide, C-C, C-halogène, P-N.
- 4°) - lyases : enzymes qui détachent certains groupements des substrats par des mécanismes autres que l'hydrolyse, laissant en place des doubles liaisons.  
Exemples : Aldéhyde-lyases ; carbone-oxygène lyases ;
- 5°) - isomérases : enzymes qui catalysent la transformation des isomères optiques, géométriques ou de position.  
Exemples : racémases et épimérases ; Cis-transisomérases ;
- 6°) - ligases : (ligare = lier). Enzymes qui catalysent la liaison de deux composés en même temps que la rupture d'un lien pyrophosphate de l'ATP ou d'un composé similaire.  
On trouve dans ce groupe les enzymes qui catalysent les réactions formant les liaisons -CO, CS, CN et C-C.

### 3 - REGULATION DU METABOLISME

Notre intention est de dresser le profil global de la régulation cellulaire et de noter les progrès considérables réalisés dans ce domaine au cours des dernières années.

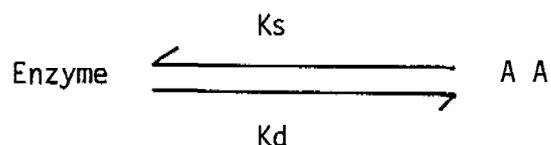
Pour que la vie puisse se poursuivre harmonieusement, le flot de métabolites traversant les voies métaboliques (anabolique et catabolique) doit être contrôlé. Notre concept d'une vie normale exige que non seulement tous les phénomènes chimiques se produisent, mais aussi qu'ils se produisent à des vitesses compatibles avec les activités et les besoins de l'organisme intact, en relation avec son milieu.

La connaissance des processus régulateurs cellulaires chez l'homme est essentielle à la compréhension des maladies métaboliques, de même qu'aux actions thérapeutiques et pourtant, les phénomènes moléculaires qui se produisent dans la régulation de la plupart des processus métaboliques dans les cellules des mammifères sont encore peu connus.

### 3-1 - REGULATION DE LA CONCENTRATION ENZYMATIQUE

---

La quantité absolue d'un enzyme donné, présente dans une cellule à un certain moment, est déterminée par sa vitesse de synthèse ( $K_s$ ) et la vitesse de sa dégradation ( $K_d$ ).



Le taux d'un enzyme dans une cellule peut donc s'élever par augmentation de sa vitesse de synthèse ( $K_s$ ) ou par diminution de  $K_d$ , ou par les deux effets simultanés. De la même façon, une chute du taux enzymatique peut résulter d'une diminution de  $K_s$ , d'une augmentation de  $K_d$  ou des deux. Dans toutes les formes de vie, la synthèse d'un enzyme (protéine) à partir des AA et la dégradation d'un enzyme (protéine) en AA sont des processus distincts, catalysés par des ensembles enzymatiques complètement différents. La régulation indépendante de la synthèse et de la dégradation enzymatiques est donc facilement réalisée.

#### 3.1.1. - Turnover enzymatique

Les processus combinés de la synthèse et de la dégradation enzymatiques constituent le turnover enzymatique. Bien que ce turnover soit présent, tant chez les bactéries que chez les mammifères, l'importance de la dégradation enzymatique comme mécanisme de régulation du taux des enzymes

chez les bactéries n'a reçu que peu d'attention. Ceci n'est pas vrai pour les mammifères, où le turnover protéique fut reconnu comme une propriété caractéristique de toutes les cellules des mammifères, longtemps avant qu'il ne soit reconnu chez les bactéries.

### 3-1-2. - Induction enzymatique

Ce phénomène d'induction enzymatique a surtout été étudié chez les bactéries. Génétiquement, la cellule peut fabriquer des enzymes inductibles ou des enzymes constitutifs (dont la concentration cellulaire ne dépend pas de la présence d'inducteur). Il semble que, chez les bactéries, l'induction soit limitée aux enzymes qui catalysent les réactions de dégradation ou séquences cataboliques. Avant d'appliquer la terminologie et les concepts de l'induction enzymatique aux systèmes des mammifères, il faut bien admettre qu'il est loin d'être prouvé que l'induction de la synthèse des enzymes chez les mammifères implique des processus similaires à ceux des bactéries.

La régulation de la concentration enzymatique peut s'effectuer également par deux processus génétiques appelés répression et dépression enzymatiques dont les mécanismes sont encore inconnus.

## 3-2 - REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

### 3-2-1 - Rétroinhibition

L'efficacité catalytique d'un enzyme est affectée par les changements de concentration des substrats, des coenzymes, des activateurs ou des inhibiteurs.

L'activité de certains enzymes régulateurs-clés est modifiée par des effecteurs allostériques de faible masse molaire qui ont généralement peu ou pas de ressemblance structurale avec les substrats ou les coenzymes de l'enzyme régulateur.

La rétroinhibition est ce phénomène par lequel un produit d'une séquence

de réactions biosynthétiques inhibe l'activité d'un enzyme dont l'action enzymatique se manifeste au début de la voie biosynthétique.

### 3-2-2 - Régulation par modification covalente

En plus des effets allostériques, l'activité enzymatique peut aussi être contrôlée par modification covalente des résidus d'AA spécifiques à la surface de l'enzyme. La modification covalente peut renforcer ou empêcher les effets des régulateurs allostériques. La régulation par modification covalente est bien connue chez les animaux. Elle est donc d'un intérêt particulier pour le médecin.

## CHAPITRE VI

### LES ENZYMES DANS LA CELLULE

#### 1 - PROENZYMES ET ENZYMES - PROTEOLYSES LIMITEES

##### 1-1 - ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Certains enzymes sont sécrétés sous forme de zymogènes ou proenzymes inactifs. Les proenzymes sont ensuite activés. C'est le cas en particulier des enzymes protéolytiques. L'activation réside en une coupure de liaison peptidique, ce qui libère un peptide. Cette libération provoque un réarrangement de la structure secondotertiaire, de telle sorte que les AA du site actif sont amenés au voisinage les uns des autres : l'enzyme est alors actif.

La trypsine est sécrétée sous forme de trypsinogène inactif. Un enzyme protéolytique intestinal, l'entérokinase, détache un hexapeptide et on obtient la trypsine active. La réaction est auto-catalytique car la trypsine, à son tour, transforme le trypsinogène en trypsine.

La chymotrypsine est sécrétée sous forme de chymotrypsinogène. Sous l'action de la trypsine, il y a rupture de la molécule en plusieurs points avec formation de chymotrypsine active et libération d'un dipeptide.

La pepsine est également sécrétée par les cellules de la muqueuse gastrique sous forme de pepsinogène inactif. Sous l'action de la pepsine ou d'ions  $H^+$ , il y a libération de plusieurs peptides dont l'un est appelé inhibiteur de la pepsine et formation de la pepsine active.

Le processus d'activation par protéolyse limitée ne concerne pas seule-

ment l'activation d'enzyme. Il concerne d'autres molécules biologiques.

### 1-2 - PROINSULINE - INSULINE

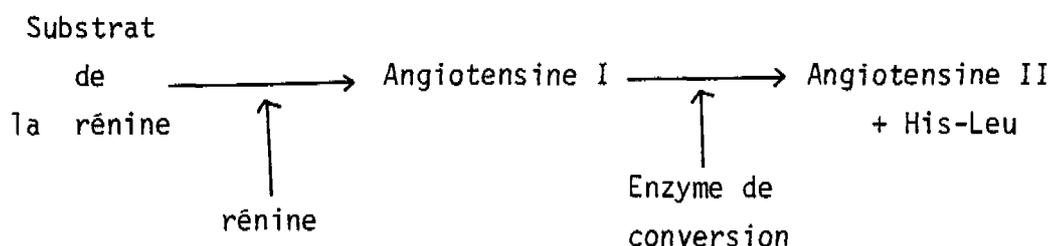
-----

L'insuline est une protéine formée de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne A, formée de 21 AA, commence par la Glycine (chaîne glycinique) et la chaîne B, formée de 30 AA, commence par la Phe (chaîne phénylalaninique). On a montré que l'insuline était sécrétée sous forme d'une chaîne unique, la pro-insuline, de MM = 9100 et qui comprenait, outre les chaînes A et B, une zone intermédiaire de 33 AA. La proinsuline est donc formée de 84 AA. Si l'on détache le peptide de connexion, on obtient l'insuline active.

### 1-3 - ANGIOTENSINE

-----

Lorsque ses reins sont soumis à une restriction du courant circulatoire (par constriction des artères rénales), un animal subit une H.T.A. Celle-ci est due à la libération par le rein en souffrance d'une protéine, la rénine. La rénine est en fait un enzyme qui agit spécifiquement sur une protéine du plasma, qui fait partie du groupe des  $\alpha_2$  Globulines. - Sous l'action de la rénine, il se libère de cette protéine, appelée substrat de la rénine ou angiotensinogène, un décapeptide, l'Angiotensine I. Sous l'action d'un autre enzyme, appelé enzyme de conversion, l'Angiotensine I perd un dipeptide et se transforme en Angiotensine II qui est le peptide actif. L'Angiotensine II est donc un octapeptide qui provoque la contraction des capillaires en augmentant la tension artérielle.



## 2 - ISOZYMES

Les isozymes sont des formes physiquement distinctes de la même activité catalytique. Ils catalysent donc la même réaction. L'intérêt médical des isozymes est apparu lorsqu'en 1957 on a découvert que le sérum humain contenait plusieurs isozymes de la LDH et que les proportions relatives de ces isozymes variaient de façon significative dans certains états pathologiques. Les isozymes de nombreuses déshydrogénases, de plusieurs oxydases, de transaminases, de phosphatases, de transphosphorylases et d'enzymes protéolytiques ont été signalés.

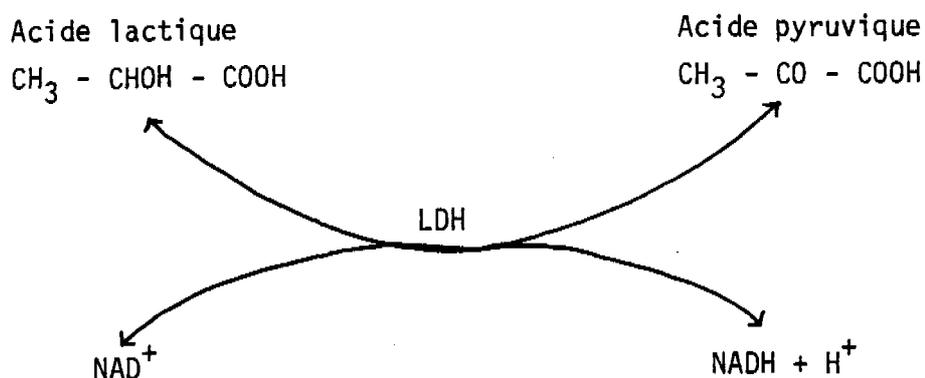
Pour mettre en évidence les isozymes de la LDH sérique, on soumet un échantillon de sérum à l'électrophorèse, habituellement à pH 8,6, en utilisant comme support un gel d'amidon ou de polyacrilamide. Les isozymes ont des charges différentes à ce pH et ils migrent dans cinq régions de l'électrophorégramme. Les isozymes sont alors localisés grâce à leur capacité de catalyser la réduction d'un composé incolore en une forme colorée.

Pour mesurer l'activité d'une déshydrogénase, on peut utiliser le mélange typique suivant :

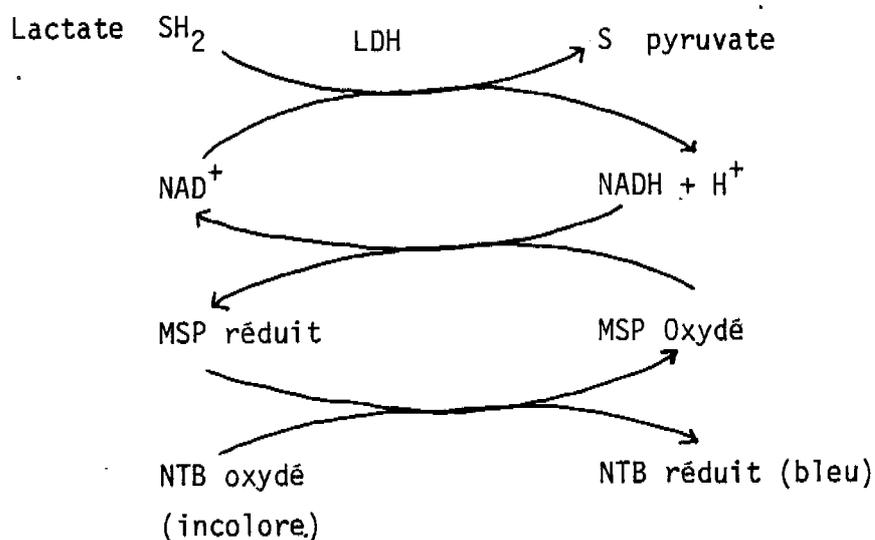
- (1) - substrat réduit (exemple : le lactate)
- (2) - coenzyme (NAD)
- (3) - colorant oxydé incolore (exemple : le Nitrotétrazolium Bleu = NTB)
- (4) - transporteur intermédiaire d'électrons pour le transport des électrons entre le NADH et le colorant (exemple : Méthosulfate de Phénazine = MSP)
- (5) - Tampon, ions activateurs si nécessaire.

La LDH catalyse le transfert de deux électrons et d'un ion hydrogène du lactate sur le NAD

(voir schéma page suivante)

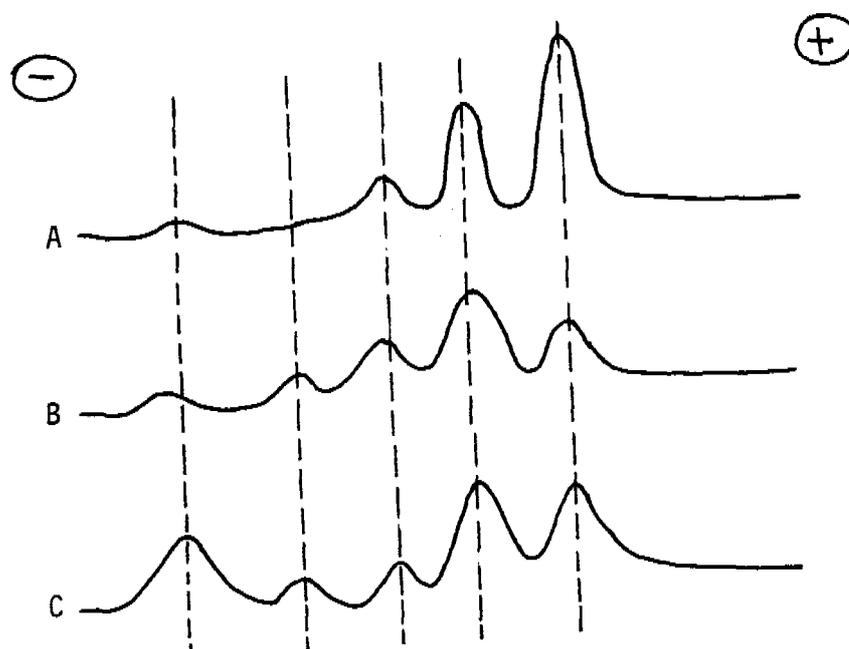


La réaction se fait à une vitesse mesurable seulement en présence du catalyseur enzymatique LDH. Quand le milieu expérimental est étalé sur un électrophorégramme et incubé à 37°C, le transfert des électrons ne se fait que dans les régions où la LDH est présente :



Les bandes sont visibles à l'oeil nu et leurs intensités relatives peuvent être mesurées à l'aide d'un photomètre approprié. L'isozyme le plus négatif sur l'électrophorégramme est désigné par  $I_1$ .

(voir schéma page suivante)



A - Sérum d'un patient atteint d'un infarctus du myocarde

B - Sérum normal

C - Sérum d'un patient atteint d'une affection hépatique.

Les isozymes de la LDH diff rent les uns des autres au niveau de la structure quaternaire. La molécule active de LDH comprend 4 sous-unités de 2 types, H et M. Seule la molécule tétramère possède l'activité catalytique. Si l'ordre n'est pas important, ces sous-unités peuvent se combiner de 5 façons :

HHHH ; HHHM ; HHMM ; HMMM ; MMMM.

A l'aide de méthodes connues, MARKET a démembré et réformé la structure quaternaire pour éclaircir les relations entre les isozymes de la LDH. La rupture et la reconstitution de la LDH-I<sub>1</sub> ou de la LDH-I<sub>5</sub> ne produit pas de nouveaux isozymes. Chacun de ces isozymes est donc composé d'un seul type de sous-unités. Si on soumet au même traitement un mélange de LDH-I<sub>1</sub> et de LDH-I<sub>5</sub> purifiées, les LDH-I<sub>2</sub>, -I<sub>3</sub>, et -I<sub>4</sub> apparaissent alors. Les proportions approximatives des isozymes obtenus sont celles prévues par les relations suivantes entre les sous-unités.

Isozymes de la LDH	Sous-unités
I <sub>1</sub>	HHHH
I <sub>2</sub>	HHHM
I <sub>3</sub>	HHMM
I <sub>4</sub>	HMMM
I <sub>5</sub>	MMMM

On a récemment démontré que les synthèses des sous-unités H et M sont contrôlées par des gènes différents.

### 3 - ASSOCIATIONS D'ENZYMES

Les travaux d'enzymologie ont de plus en plus porté sur des enzymes purifiés. En fait, dans la cellule, les enzymes sont nombreux et on ne peut dissocier leur activité. Un composé est parfois soumis à une chaîne de réaction faisant intervenir jusqu'à plus de 10 enzymes, le produit de la réaction du premier étant le substrat du deuxième enzyme.... etc. Dans une telle chaîne, il n'y a pas accumulation d'intermédiaires. Si un (ou plusieurs) enzyme de la chaîne est beaucoup moins actif que les autres, c'est cet enzyme qui sera le facteur limitant, c'est lui qui sera le plus sensible aux facteurs de régulation. Un tel enzyme catalyse souvent la formation d'un composé localisé dans un carrefour métabolique, c'est-à-dire qui peut être le point de départ de plusieurs chaînes métaboliques différentes.

Certains enzymes participant à une même chaîne métabolique peuvent former une particule. Ces enzymes particulières peuvent parfois être dissociés et solubilisés ; mais, après leur solubilisation, leurs propriétés sont modifiées : ils sont fréquemment moins actifs.

## CHAPITRE VII

### APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES DES ENZYMES

La mesure de l'activité enzymatique dans les liquides organiques tels que le plasma ou le sérum revêt souvent de l'importance en pratique clinique. C'est ainsi qu'est née la Séméiologie enzymatique. Des enzymes plasmatiques fonctionnels sont activement sécrétés dans la circulation. Le plasma contient aussi des enzymes non fonctionnels dont les substrats et les cofacteurs peuvent même être absents du plasma.

La mesure de ces enzymes plasmatiques non fonctionnels possède souvent une valeur diagnostique.

L'accroissement du taux des enzymes plasmatiques est généralement le signe d'une nécrose cellulaire, bien que les exercices violents puissent être capables d'entraîner aussi une libération de petites quantités d'enzymes musculaires dans la circulation. Les divers facteurs qu'il faut considérer sont :

- (1) la localisation intracellulaire de l'enzyme et la perméabilité des membranes nucléaire, mitochondriale et cellulaire ;
- (2) la solubilité de l'enzyme dans le liquide extracellulaire ;
- (3) la vitesse de circulation du liquide extracellulaire, la vascularisation de la surface lésée et la présence ou l'absence de barrière inflammatoire ;
- (4) le taux de destruction ou d'excrétion.

***Deuxième Partie***

ÉTUDE DES ENZYMES DE LA PATHOLOGIE  
CARDIO-VASCULAIRE

PRINCIPES DES DOSAGES

---

## A

**ETUDE DES ENZYMES DE LA PATHOLOGIE CARDIO-VASCULAIRE**

En pathologie cardio-vasculaire, quatre enzymes sont essentiellement utilisés pour les essais biologiques. Ce sont :

- . la Transaminase glutamique-oxaloacétique ou GOT,
- . la Transaminase glutamique-pyruvique ou GPT,
- . la Lactico déshydrogénase ou LDH,
- . la créatine phosphokinase ou CPK.

Ces enzymes sont des biomolécules le plus souvent ubiquitaires mais prédominants dans certains organes ou tissus. Ils sont peu ou pas spécifiques d'un organe. Les enzymes comme la lactico-déshydrogénase et la créatine phosphokinase possèdent des isozymes ou isoenzymes qui sont beaucoup plus spécifiques et sont aussi utilisés dans les essais biologiques.

Nous ne donnerons pas une étude approfondie des principes de dosage des isoenzymes car ces dosages ne sont pas faits dans le laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Nord.

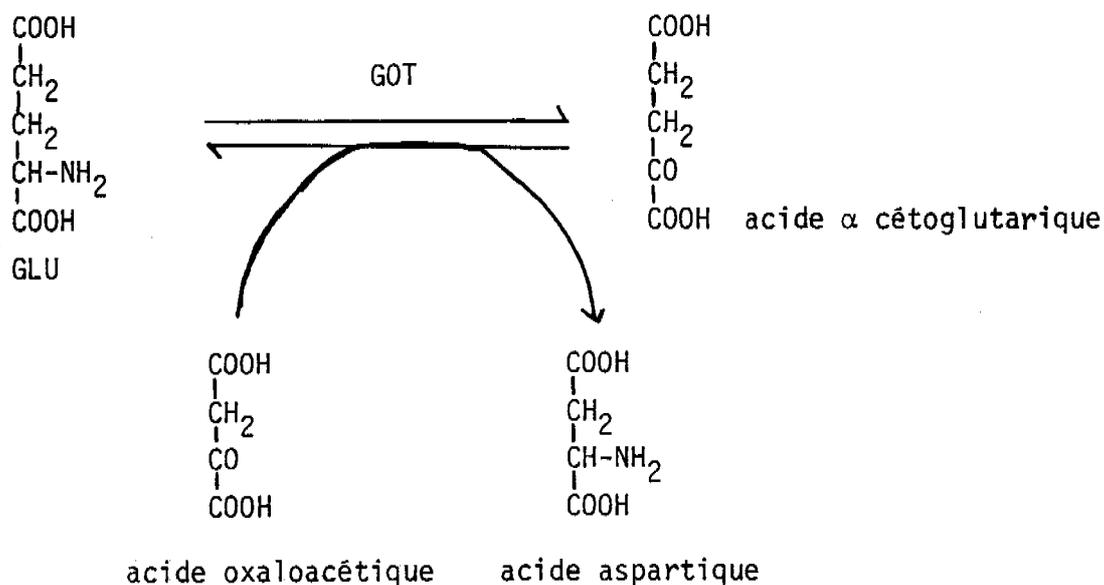
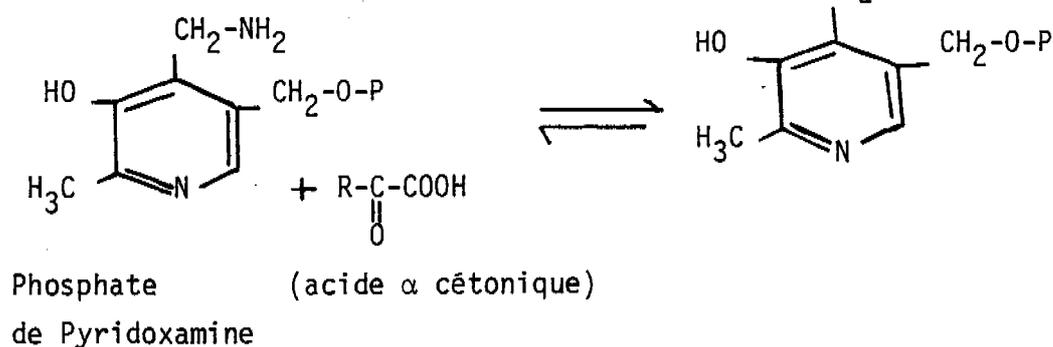
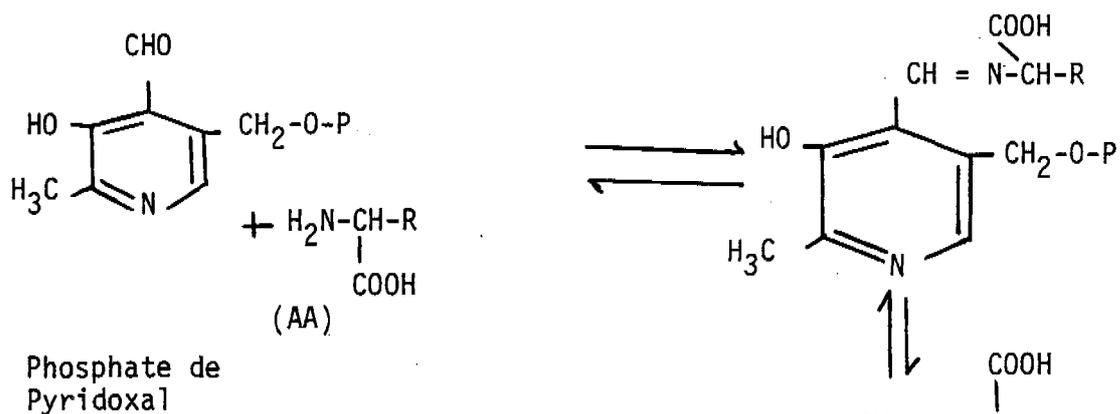
### 1 - TRANSAMINASES

#### 1-1 - TRANSAMINASE GLUTAMIQUE OXALOACETIQUE : GOT

-----

La transaminase glutamique oxaloacétique est encore appelée aspartate aminotransférase. C'est la plus active des transaminases et la plus répandue. Elle existe sous deux formes : mitochondriale et extramitochondriale, dont les propriétés physiques, immunologiques et cinétiques sont différentes. Elle est plus spécifique du myocarde.

La transaminase GOT est formée d'un apoenzyme et d'un coenzyme dérivé d'une vitamine hydrosoluble (vitamine B<sub>6</sub>). Le groupement actif de l'enzyme est le phosphate de pyridoxal qui assure le transfert d'un radical -NH<sub>2</sub> de l'acide glutamique (Glu) à l'acide oxaloacétique (c'est une transamination) selon les réactions suivantes :



Selon la nomenclature de l'IUB, la GOT est :

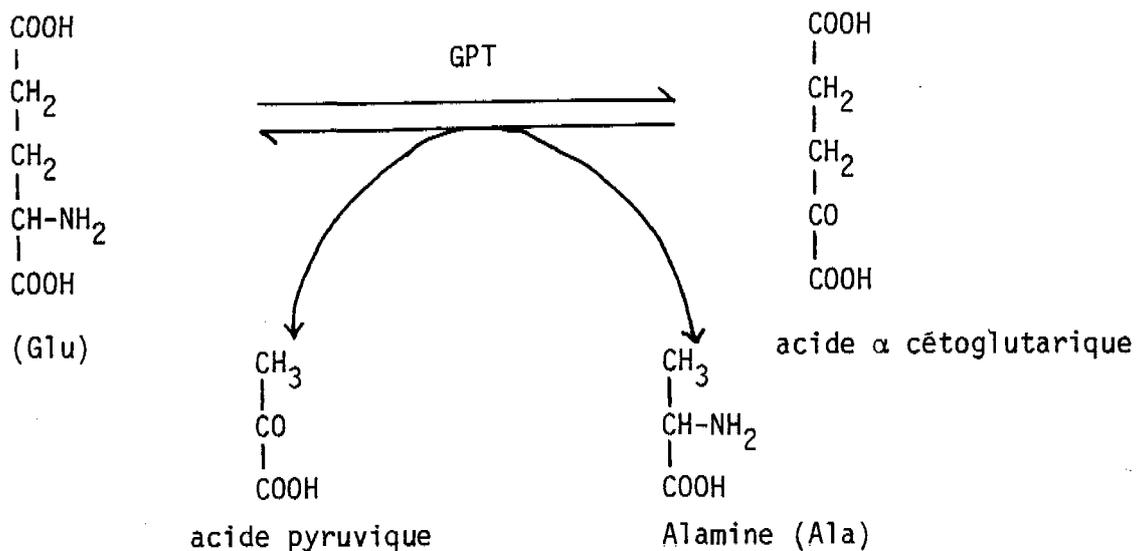
(L-aspartate : 2-oxoglutarate aminotransférase) (EC 2.6.1.1.).

Le temps de demi-vie de la GOT sérique est environ 50 heures.

### 1-2 - TRANSAMINASE GLUTAMIQUE PYRUVIQUE

Encore appelée alanine aminotransférase, la transaminase glutamique pyruvique (<sup>GPT</sup>~~GTP~~) est très peu spécifique du myocarde et se trouve principalement dans les cellules hépatiques. Son essai sert principalement au diagnostic différentiel entre pathologies cardiaques et hépatiques.

Comme la Transaminase GOT, la GPT est aussi formée de deux parties : un apoenzyme et en coenzyme qui est le phosphate de pyridoxal. La GPT assure le transfert d'un radical  $-NH_2$  provenant de l'acide glutamique (Glu) à l'acide pyruvique selon la réaction suivante :



D'après la nomenclature de l'IUB, la Transaminase GPT s'écrit :

GPT - (L-alanine : 2-oxoglutarate aminotransphérase) (EC 2.6.1.2.)

Le temps de demi-vie de la GPT sérique est d'environ 75 heures.

## 2 - LACTICO DESHYDROGENASE ET ISOENZYMES

Nous avons déjà étudié la LDH et ses isoenzymes (ou isozymes) dans la première partie de notre travail (cf. p.45 ). Seul l'isoenzyme 1 ou LDH<sub>1</sub> ou  $\alpha$ HBDH ( $\alpha$  hydroxybutyrate deshydrogenase) est spécifique du myocarde. L'élévation de son taux sérique est dans une large mesure proportionnelle à l'étendue de la nécrose myocardique. Le temps de demi-vie de la LDH sérique est d'environ 50 heures.

## 3 - CREATINE PHOSPHOKINASE (CPK) ET ISOENZYMES

Dans l'organisme humain, la créatine phosphokinase (CPK) ou créatine-kinase (CK) se présente sous forme de dimères-composés de sous-unités M et B. De ce fait, on pourra rencontrer 3 isoenzymes :

- . le dimère MM est abondant dans les muscles squelettiques, et à un degré moindre dans le muscle cardiaque,
- . le dimère BB est particulièrement abondant dans le cerveau, on le trouve aussi, en proportions faibles, dans la thyroïde, les reins, la prostate, l'estomac et les poumons.
- . le dimère MB est essentiellement présent dans le myocarde où, selon les espèces, il représente 10 à 50% de l'activité CPK. A l'opposé, il n'existe qu'en très faible proportion dans le muscle squelettique.

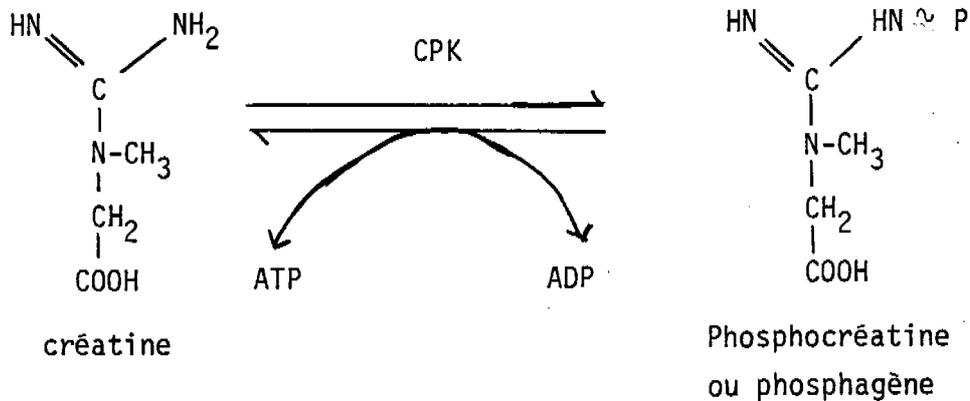
Ces différentes formes se distinguent entre autres par leurs propriétés catalytiques, leur mobilité électrophorétique et leur point iso-électrique.

Si la plus grande partie de l'activité CPK est présente dans la phase cytoplasmique soluble des cellules, on en détecte aussi des quantités non négligeables dans les mitochondries des muscles squelettiques, du myocarde et du cerveau, et dans la fraction myofibrillaire de tous les tissus contractiles.

Les conditions de migration électrophorétique de cette CPK mitochondriale sont d'ailleurs différentes de celles de l'isoenzyme MM usuel. Il semble en fait exister deux types distincts de sous-unités M, les polypeptides  $M_1$  et  $M_2$ , ce qui laisse entrevoir l'existence d'hybrides  $M_1M_1$  ;  $M_2M_2$  ;  $M_1B$  et  $M_2B$ .

Sur le plan séméiologique, l'intérêt des isoenzymes de la CPK se situe dans le cadre de la pathologie du myocarde : sa richesse en hybride MB dans le sang circulant signe une lésion myocardique.

La CPK ou CK catalyse la réaction :



Le temps de demi-vie de la CPK sérique est très court, il est d'environ 15 heures.

**B****PRINCIPES DES DOSAGES**CHAPITRE I : GENERALITES

Nous étudierons dans les chapitres suivants, les principes ainsi que les méthodes de dosage des divers enzymes de la pathologie cardiovasculaire et principalement de l'infarctus du myocarde qui est en fait la seule maladie cardiaque où l'élévation des activités enzymatiques sériques est franche et importante sur le plan clinique.

1 - DEFINITION DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

DELAYE, J.P. et LOIRÉ, R. ont défini l'infarctus du myocarde comme étant "une nécrose ischémique intéressant une part noble de la paroi ventriculaire (en surface, au moins 2cm<sup>2</sup> en principe)".

Les principaux signes cliniques de cette maladie sont :

- . douleur
- . pâleur
- . hypotension
- . tachycardie

L'infarctus du myocarde est la conséquence d'un arrêt brutal de la circulation coronaire, entraînant l'absence d'irrigation d'une zone plus ou moins étendue du myocarde. La nécrose myocardique qui s'ensuit entraîne la lyse cellulaire et la libération dans la circulation générale d'un certain nombre de molécules biologiques contenues dans la cellule. Parmi ces dernières, les enzymes occupent une place de choix.

## 2 - INTERET DES DOSAGES ENZYMATIQUES

---

Les enzymes impliqués dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde vont permettre :

- . de faire le diagnostic lui-même,
- . de dater l'infarctus,
- . d'apprécier l'étendue des lésions,
- . de mettre en évidence les éventuelles rechutes,
- . de déceler les infarctus infracliniques et infra-électriques,
- . d'évaluer le retentissement sur d'autres organes.

L'évaluation quantitative des enzymes sériques n'est pas une méthode pondérale directe, trop longue ou techniquement impossible. Elle repose, dans tous les cas, sur les propriétés biologiques de l'enzyme, c'est-à-dire sa spécificité d'action ou sa spécificité de substrat.

Dans la grande majorité des cas, le sérum sanguin est mis au contact du substrat de l'enzyme recherché, en présence d'un excès de l'éventuel coenzyme et on évalue son activité :

- . soit par la quantité de substrat qui disparaît,
- . soit par la quantité de produit de la réaction qui apparaît,
- . soit par la modification quantitative de l'état du coenzyme.

Le résultat sera exprimé en unité d'activité enzymatique. Certains enzymes importants ont une répartition très ubiquitaire et leur présence à un taux élevé dans le sérum sanguin n'est pas caractéristique d'un organe ou d'un tissu défini. Il est alors nécessaire de préciser l'origine tissulaire ou organique de l'enzyme en étudiant :

- . les paramètres caractéristiques de l'activité :  $K_m$  et  $V_m$ ,
- . les variétés moléculaires possibles de l'enzyme : les Isoenzymes.

## CHAPITRE II : METHODES DU DOSAGE

Les dosages enzymatiques se font sur un appareil automatique : le IL MULTISTAT III (LEXINGTON, MASS. U.S.A.), microanalyseur centrifuge rapide. L'appareil est doté d'un calculateur interne qui donne directement les activités enzymatiques en U I en suivant les recommandations de la Société Allemande de Chimie Clinique.

L'Unité Internationale est la quantité d'enzyme contenue dans un litre de sérum, capable de transformer une micromole de substrat par minute, à 25°C, dans les conditions de la réaction.

Dans notre cas, le substrat est le Nicotinamide Adénine Dinucleotide (NAD) réduit ou oxydé.

On calcule l'activité enzymatique en utilisant le rapport suivant :

$$\frac{n}{\epsilon L} \times \frac{V}{v} \times 10^9 \text{ unités internationales par litre de sérum (UI/l).}$$

$n$  = variation de la densité optique par mn.

$\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire du NADH à la longueur d'onde de travail en  $\text{cm}^2/\text{mole}$ .

$V$  = volume total en ml

$v$  = volume de sérum en ml

$\epsilon$  NADH =  $6,0 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$  à 334 nm

=  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$  à 340 nm

=  $3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}$  à 366 nm

$L$  = trajet optique en cm.

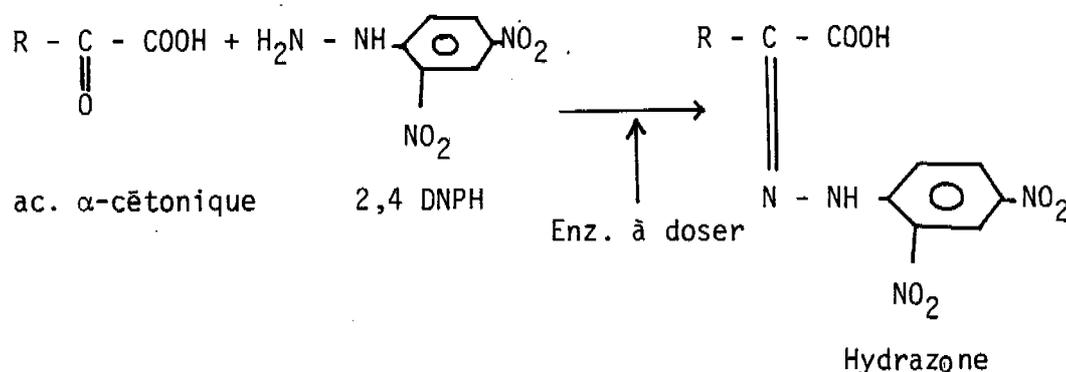
Deux types de méthodes sont fréquemment utilisés :

- . la méthode colorimétrique ou méthode des hydrazones ;
- . les méthodes mettant en oeuvre les nucléotides pyridiniques.

Ces méthodes sont d'un emploi généralement commode et rapide car elles se terminent par une simple lecture spectrophotométrique.

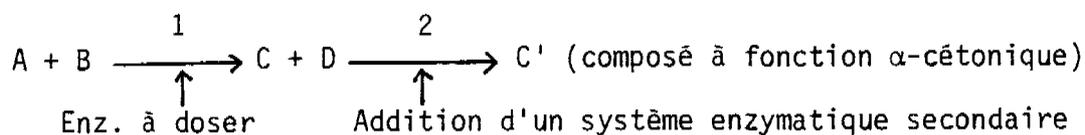
## 1 - METHODES COLORIMETRIQUES

Les méthodes colorimétriques sont appliquées aux réactions enzymatiques au cours desquelles se produit l'apparition ou la disparition d'un acide  $\alpha$ -cétonique (ou les deux à la fois). La 2,4 Dinitrophénylhydrazine se combine avec la (ou les) fonction(s) cétonique(s) et bloque la réaction enzymatique. L'hydrazone ainsi formée possède un spectre d'absorbance caractéristique. La quantité d'acide  $\alpha$ -cétonique disparue ou formée au cours de la réaction est déduite de la mesure de l'absorbance.



Ce genre de réaction est utilisé pour la détermination des transaminases.

Un second type de méthode consiste à transformer, par une réaction secondaire, généralement enzymatique, l'un des produits de la première réaction en un composé possédant une fonction  $\alpha$ -cétonique et capable de donner une hydrazone.



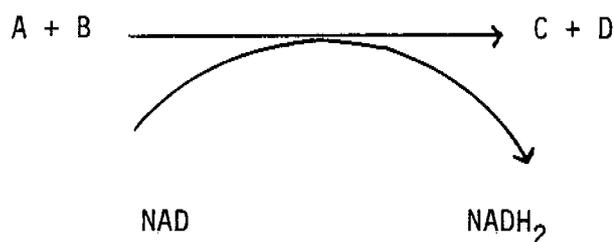
On s'arrange pour que la réaction 2 ait une vitesse très grande et que la quantité de C' formée (mesurée par l'apparition de l'hydrazone) permette de calculer l'activité de l'enzyme à doser. C'est le principe du dosage des Aldolases.

## 2 - METHODES UTILISANT UN NUCLEOTIDE PYRIDINIQUE

---

Les nucléotides pyridiniques (NAD ou NADP) ont des spectres d'absorbance différents, suivant qu'ils se trouvent sous forme oxydée ou sous forme réduite. Sous la forme réduite, ils possèdent un maximum d'absorbance aux environs de 340 nm.

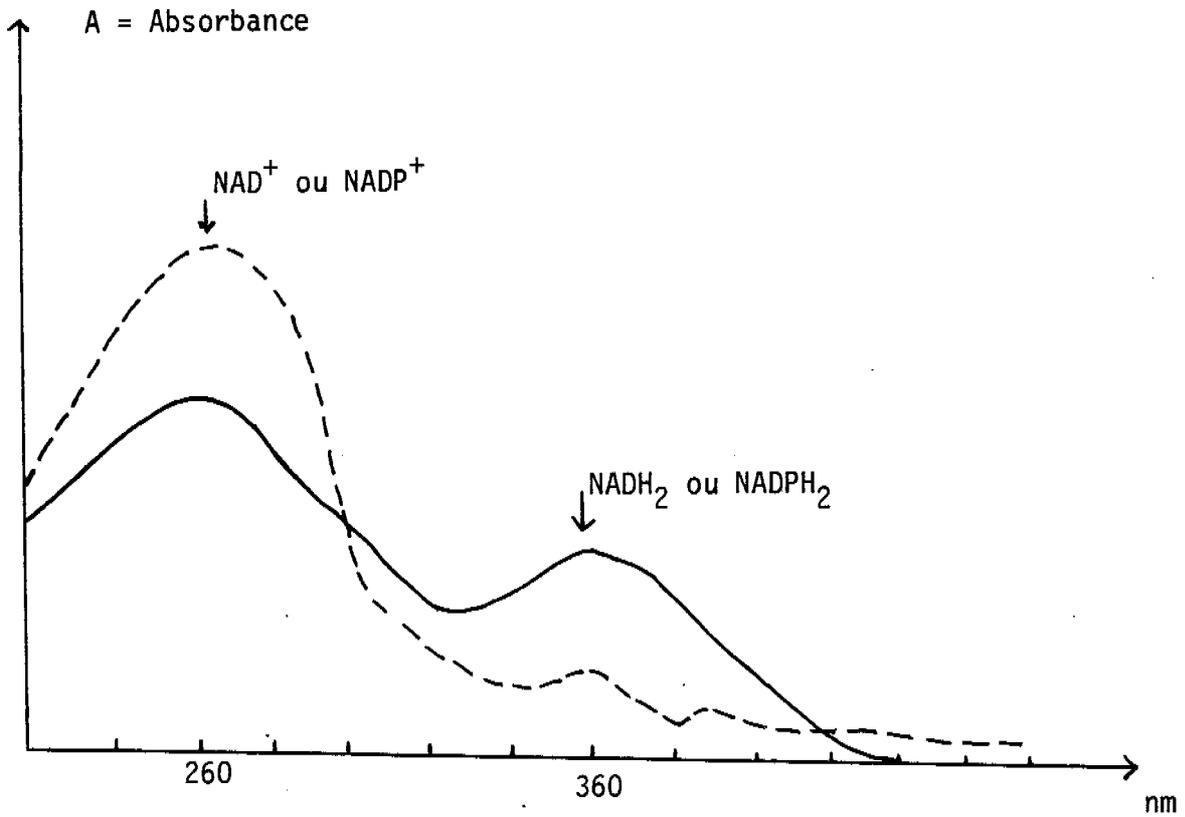
Au cours d'une réaction enzymatique nécessitant la présence de Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) ou de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, l'augmentation de l'absorbance à 340 nm permet de calculer la quantité de  $\text{NADH}_2$  ou de  $\text{NADPH}_2$  formée au cours de la réaction :



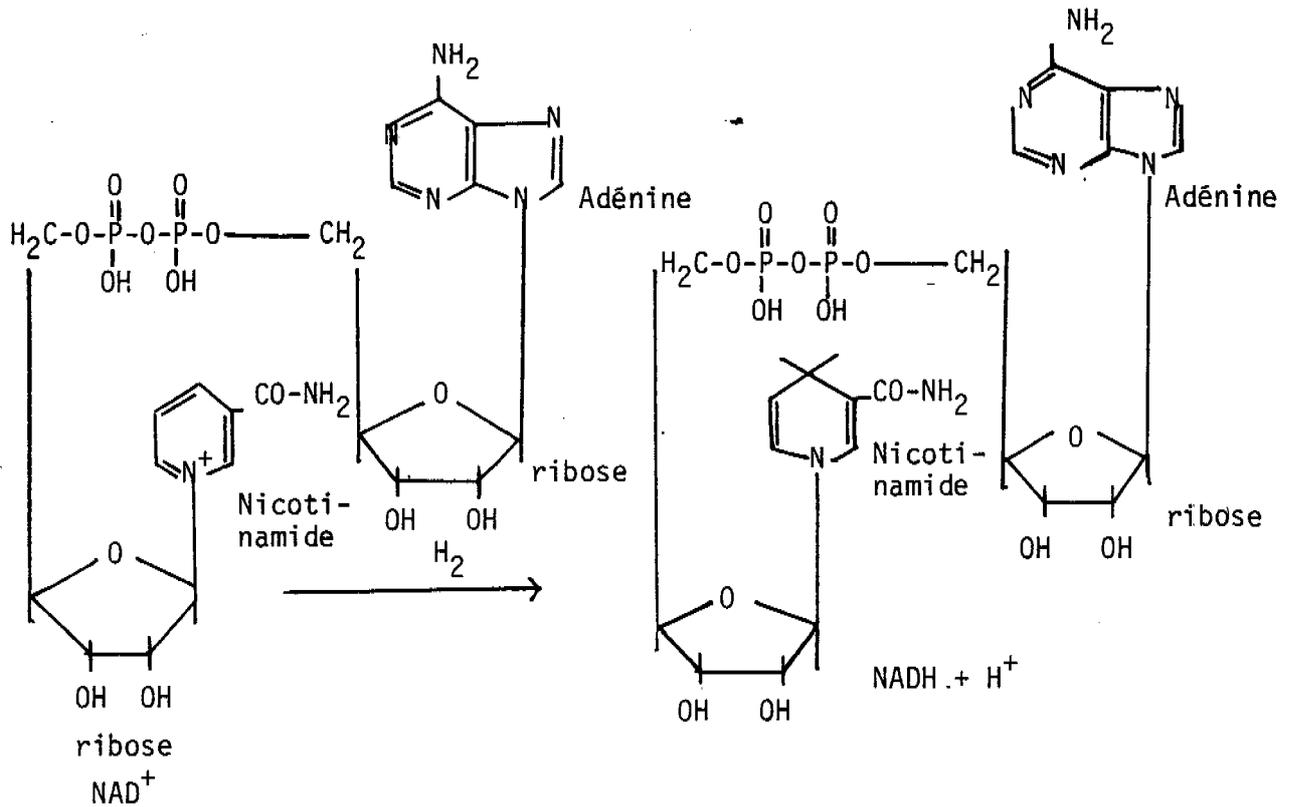
(voir schémas pages suivantes).

C'est le principe du dosage de l'Isocitricodéshydrogénase, de la lactate déshydrogénase (LDH), de la Glucose 6-Phospho Déshydrogénase ( $\text{G}_6\text{PD}$ ) et de la 6-Phosphogluconate déshydrogénase.

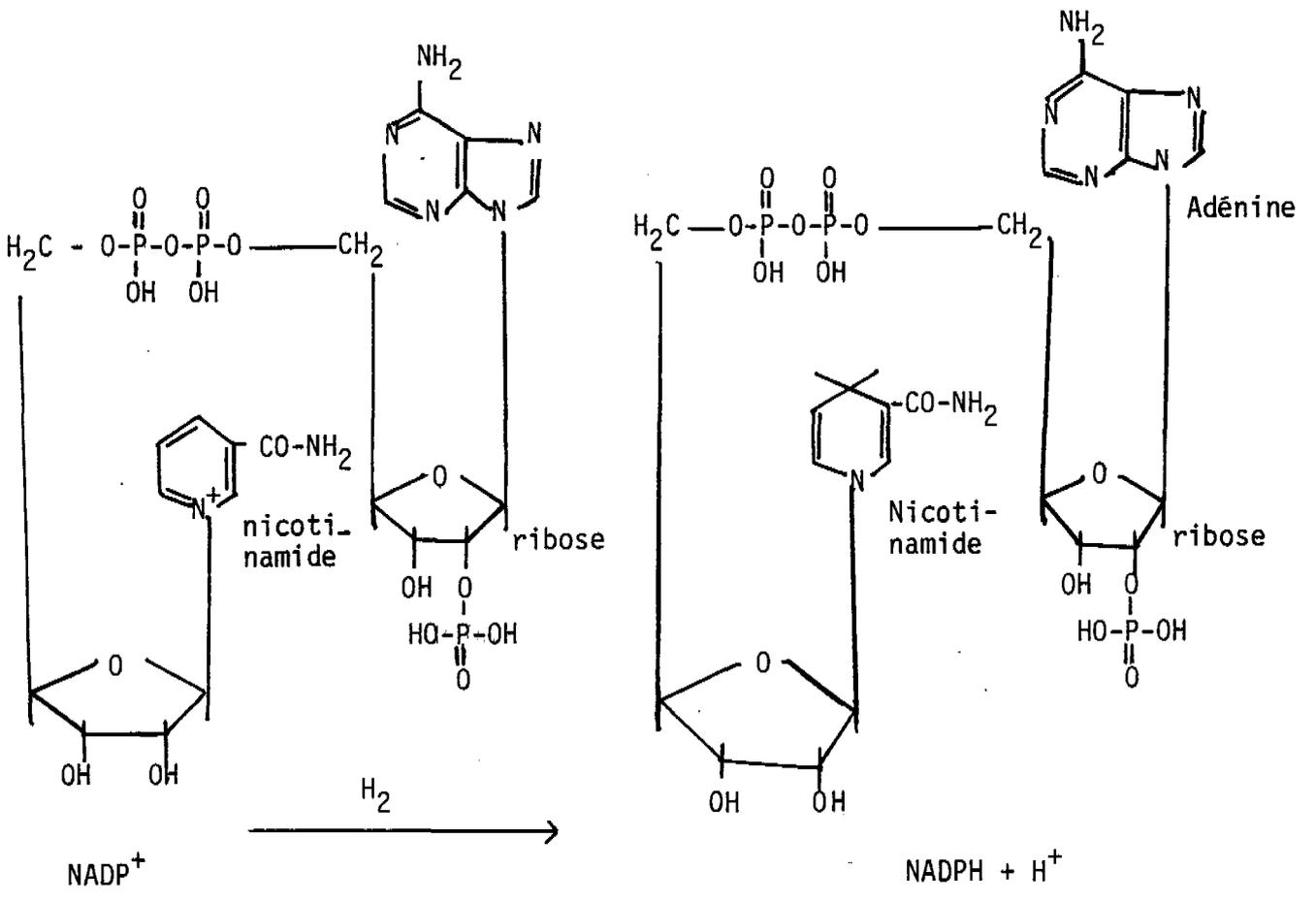
Inversement, certaines réactions nécessitent, au départ, la présence de  $\text{NADH}_2$  (ou de  $\text{NADPH}_2$ ) et la diminution de l'absorbance à 340 nm permet de calculer la quantité de NAD (ou de NADP) formée au cours de



Spectre d'Absorbance des Nucléotides pyridiniques

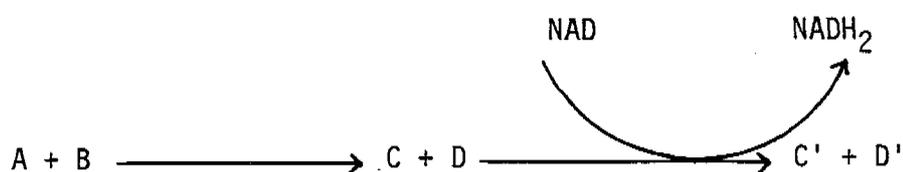


COENZYMES PYRIDINIQUES



la réaction enzymatique et de déterminer l'activité enzymatique. Ce principe est mis en oeuvre au cours du dosage de la sorbitol déshydrogénase et de l' $\alpha$ -Hydroxybutyrate Déshydrogénase ( $\alpha$  HBDH).

De la même manière que précédemment, il existe des cas où l'enzyme dont on veut mesurer l'activité n'a pas besoin de ces nucléotides pyridiniques ; on transforme alors l'un des produits en un autre composé par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique nécessitant, elle, la présence de nucléotides pyridiniques :



Addition d'un système enzymatique secondaire

C'est le principe utilisé pour le dosage des aldolases, des transaminases, et de la Créatine-Kinase.

### CHAPITRE III : PRECAUTIONS A PRENDRE

Comme pour toutes les analyses biologiques, des précautions doivent être observées, non seulement au laboratoire, mais également dans les services cliniques ; elles devraient dans ce cas intervenir avant le prélèvement des échantillons.

Au niveau du service clinique, une préparation correcte des malades est nécessaire. Ceux-ci doivent être mis au repos depuis plusieurs heures avant le prélèvement ; on sait que l'effort provoque dans le plasma une augmentation de l'activité d'enzymes tels que l'Aspartate aminotransférase (E.C2.6.1.1) ou GOT ; la Lactate déshydrogénase (EC4.1.1.28) ou LDH ; la fructose diphosphate aldolase (EC4.1.2.13) et surtout la créatine kinase (EC 2.7.3.2) ; un touché rectal aura

pour conséquence une élévation de la phosphatase acide prostatique (EC 3.1.3.2).

Une stase veineuse trop prolongée provoquerait une augmentation du taux plasmatique de certains enzymes, consécutive probablement à l'anoxie amenant une lésion partielle des éléments figurés du sang.

Une question encore controversée est de savoir s'il faut utiliser du plasma ou du sérum ; s'il est prouvé que la microhémolyse intervenant au cours de la coagulation a pour conséquence la libération de certains enzymes, nous savons aussi que la plupart des anticoagulants affectent l'une ou l'autre des activités enzymatiques mesurées.

Il faut éviter, autant que faire se peut, la dénaturation des enzymes qui sont des molécules protéiniques généralement fragiles.

Pour cela, il faut des températures et un pH convenables pour l'enzyme. Il faut éviter l'inactivation ou l'inhibition des enzymes par des composés chimiques : les dérivés mercuriels sont à proscrire. Les anticoagulants ont des actions diverses selon les enzymes. Les dosages enzymatiques sont le plus souvent demandés pour des malades en cours de traitement ; or, de nombreux médicaments se comportent comme des inhibiteurs des enzymes :

- . la quinine et les organo-arséniacaux inhibent les estérases ;
- . l'ésérine et les alcaloïdes inhibent spécifiquement la cholinestérase ;
- . la cocaïne inhibe les transaminases.

La personne qui effectue le prélèvement devra vérifier que le malade ne vient pas de prendre un médicament susceptible d'inhiber l'enzyme à doser. Il appartient au biochimiste d'attirer l'attention du médecin traitant sur cette possibilité. Signalons que ces dosages exigent un matériel particulièrement propre : une verrerie tant soit peu souillée d'acides, d'alcalis ou de détergents perturberait gravement les résultats. Le matériel jetable est d'ailleurs le plus souvent utilisé.

#### CHAPITRE IV - DOSAGE DES ENZYMES LES PLUS COURANTS EN PATHOLOGIE CARDIO-VASCULAIRE

---

Notre objectif n'a pas été de doser tous les enzymes traduisant une atteinte cardiaque, mais de faire uniquement le dosage de ceux qui sont le plus couramment demandés par le clinicien, à savoir :

- . la Transaminase Glutamique-oxaloacétique ou GOT ;
- . la Transaminase Glutamique-pyruvique ou GPT ;
- . la lactate déshydrogénase ou LDH ;
- . la créatine phosphokinase ou CPK

Pour les dosages, on a le choix entre deux types de méthodes : les méthodes conventionnelles et les méthodes "optimisées". Nous utilisons, dans le Laboratoire de Chimie Clinique de l'Hôpital Nord de Marseille, les méthodes optimisées.

→ *Méthodes conventionnelles :*

Dans ces méthodes, on se place partiellement dans des conditions réactionnelles non optimales.

→ *Méthodes optimisées :*

C'est une étape vers la standardisation et l'optimisation des méthodes de détermination des activités enzymatiques. On se place ici dans des conditions réactionnelles optimales :

- . concentrations optimales de substrats et de coenzymes ;
- . pH optimal ;
- . présence d'activateurs et de réactivateurs.

Ainsi, on obtient, par ces méthodes, des activités enzymatiques plus élevées. Ces méthodes, comme nous l'avons déjà souligné, suivent les

recommandations de la Société Allemande de Chimie Clinique. Ainsi, la température doit être fixée à 25°C.

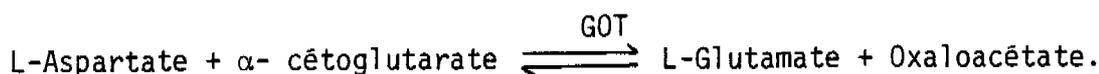
## 1 - TRANSAMINASES

1-1 - *Détermination de la GOT par la méthode cinétique optimisée selon les recommandations de la Société Allemande de Chimie Clinique.*

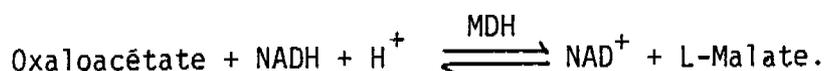
### 1-1-1 - Principe :

L'analyse cinétique de la GOT est basée sur l'utilisation de la Malate Déshydrogénase (MDH) et de Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit (NADH). On emploie de la lactate déshydrogénase (LDH) pour éliminer les traces de pyruvate sérique pendant la première minute après addition du sérum.

La Transaminase GOT catalyse la réaction suivante :



Par réaction couplée, l'oxaloacétate est réduit en malate en présence de NADH (qui s'oxyde en  $\text{NAD}^+$ ) et de malate déshydrogénase (MDH).



L'augmentation de la concentration de  $\text{NAD}^+$  est directement proportionnelle à l'activité de la GOT de l'échantillon et se détermine par la mesure à 340 nm de la variation d'extinction par minute.

### 1-1-2 - Réactifs

(Voir tableau page suivante)

Réactif 1	tampon phosphate pH 7,4	80 mmol/l
aspartate	L-aspartate	200 mmol/l
Réactif 2	NADH	0,18 mmol/l
Enzymes	MDH	≥ 0,6 UI/ml
+		
Coenzymes	LDH	≥ 1,2 UI/ml
Réactif 3	α céto-glutarate	12 mmol/l
α céto-glutarate		

L'échantillon est le sérum qui ne doit pas présenter d'hémolyse.

1-1-3 - Mode opératoire :

1-1-3-1 - Préparation des réactifs :

1-1-3-1-1 - Substrat ( $R_1 + R_2$ ) :

Reprendre un flacon de Réactif 2 par le réactif 1 ;

Stabilité : . 24 heures à 20 - 25°C

. 4 jours à 2 - 8°C

1-1-3-1-2 - Solution de travail ( $R_1 + R_2 + R_3$ )

Faire un mélange comprenant :

Substrat ( $R_1 + R_2$ ) 10 volumes

Réactif 3 1 volume

Stabilité : . 4 heures à 20 - 25°C  
 . 20 heures à 2 - 8°C

#### 1-1-3-2 - Réaction cinétique :

Longueur d'onde	340 nm
Température	25°
Cuve	trajet optique 1cm
Zéro de l'appareil	air ou eau distillée

. Introduire dans un tube à hémolyse ou une cuve de mesure thermostatée à 25°C :

Solution de travail ( $R_1 + R_2 + R_3$ )	2,5 ml ou 1 ml ou 500 $\mu$ l
Echantillon	500 $\mu$ l ou 200 $\mu$ l ou 100 $\mu$ l

. Mélanger. Mesurer la diminution moyenne de  $D_0$  par minute (n) pendant 2 à 5 mn.

#### 1-1-3-3 - Linéarité

. Pour une variation moyenne de  $D_0$  par mn  $> 0,16$ , refaire la détermination en diluant l'échantillon au 1/5 ou au 1/10 dans une solution de chlorure de sodium à 9%.

. Une variation de  $D_0$  moyenne par mn nulle peut indiquer une consommation totale de NADH avant lecture ( $D_0$  de départ  $< 1$ ) et donc signifier une activité transaminasique élevée. Refaire la détermination comme indiqué ci-dessus.

#### 1-1-4 - Calcul

(n) étant la variation moyenne d'absorbance par mn, l'activité de la

GOT en UI/l du sérum est égale à :

$$(n) \times 952 \text{ UI/l à } 340 \text{ nm}$$

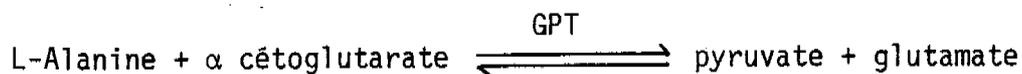
1-1-5 - Valeurs usuelles normales à 25°C

$$\text{GOT sérique} < 20 \text{ UI/L}$$

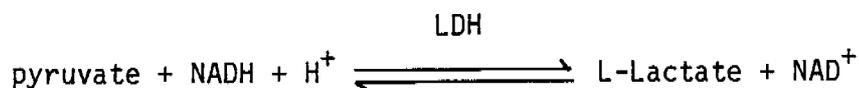
1-2 - *Détermination de la GPT par la méthode cinétique optimisée selon les recommandations de la Société Allemande de Chimie Clinique.*

1-2-1 - Principe

La transaminase glutamique-pyruvique (GPT) catalyse la réaction :



En présence de lactate déshydrogénase (LDH) et de NADH, le pyruvate est réduit au fur et à mesure de sa formation en lactate.



L'augmentation de la concentration de la lactate déshydrogénase (LDH) permet d'éliminer du pyruvate sérique endogène dans la première minute suivant l'addition du sérum.

La détermination de l'activité GPT sérique revient à étudier la consommation du NADH en fonction du temps en suivant la baisse d'absorbance à 340 nm. Dans les conditions du dosage, la consommation de NADH est directement proportionnelle à l'activité de la GPT.



Longueur d'onde	340 nm
Température	25°C
Cuve	trajet optique 1 cm
Zéro de l'appareil	air ou eau distillée

. Introduire dans un tube à hémolyse ou une cuve de mesure thermostatée à 25°C :

Solution de travail ( $R_1 + R_2 + R_3$ )      2,5 ml ou 1 ml ou 500  $\mu$ l

Echantillon      500  $\mu$ l ou 200  $\mu$ l ou 100  $\mu$ l

. Mélanger. Mesurer la diminution moyenne de l'absorbance par mn (n) pendant 2 à 5 mn.

#### 1-2-4 - Linéarité

. Pour une variation moyenne d'absorbance par mn  $\geq 0,16$ , refaire la détermination en diluant l'échantillon au 1/5 ou au 1/10 dans une solution de chlorure de sodium à 9%.

. Une variation d'absorbance moyenne par mn nulle peut indiquer une consommation totale du NADH avant lecture (D0 de départ  $< 1$ ) et donc signifier une activité transaminasique élevée. Refaire la détermination comme indiqué ci-dessus .

#### 1-2-5 - Calcul

(n) étant la variation moyenne de l'absorbance par mn, l'activité de la GPT en UI/l du sérum à 25°C est égale à :

$$(n) \times 952 \text{ à } 340 \text{ nm}$$

## 1-2-6 - Valeurs usuelles normales à 25°C

---

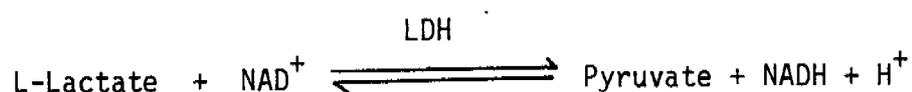
GPT sérique < 25 UI/l

## 2 - DETERMINATION DE LA LACTATE DESHYDROGENASE LDH

---

### 2-1 - Principe

La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réaction de conversion du lactate en pyruvate et du Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé en Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit :



### 2-2 - Réactifs

Réactif 1 :	tampon phosphate pH 7,5	50 mmol/l
tampon coenzyme	NADH	0,18 mmol/l
Réactif 2 :	pyruvate	0,6 mmol/l
Pyruvate		
Réactif 3 :	α cétooglutarate	3 mmol/l
α cétooglutarate		

L'échantillon est le sérum qui ne doit pas présenter d'hémolyse car les globules rouges renferment approximativement 100 fois la concentration normale de la LDH sérique. On doit également éviter les échantillons traités par l'héparine, l'oxalate et le citrate car ces produits

interfèrent avec les résultats du test.

### 2-3 - Mode opératoire

#### 2-3-1 - Préparation du réactif

Reprendre un flacon du réactif 1 par 2,8 ml d'eau distillée.

stabilité → 4 heures à 20 - 25°C  
→ 24 heures à 2 - 8°C

#### 2-3-2 - Réaction cinétique

Dans un flacon de réactif 1 réhydraté et porté à 25 ou 30°C, ajouter :

- . 0,1 ml de l'échantillon,
- . mélanger,
- . 0,1 ml de réactif 2,
- . mélanger immédiatement par retournement, et transvaser dans la cuve ;
- . attendre 30 secondes, puis enregistrer la densité optique à 340 nm et répéter ces enregistrements à des intervalles de 1 mn par la suite pendant 2 à 3 mn. ;
- . déterminer la variation moyenne de densité optique par minute (n). Le taux de variation doit être linéaire. Si on retrouve des taux supérieurs à 0,2 (n), on devra faire une dilution appropriée du sérum à l'aide d'une solution salée à 9‰ et recommencer l'opération avec 0,1 ml de cette dilution. On multiplie le résultat par le facteur de dilution.

### 2-4 - Calcul

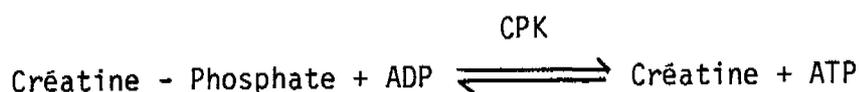
(n) étant la variation moyenne de densité optique par mn, l'activité de la LDH en UI/l est égale à : (n) x 4985 à 340 nm.

2-5 - Valeurs usuelles normales à 25°C

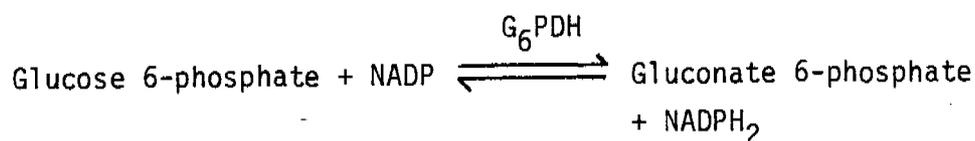
LDH &lt; 90 UI/l

3 - DETERMINATION DE LA CPK PAR LA METHODE CINETIQUE OPTIMISEE  
SELON LES RECOMMANDATIONS DE LA SOCIETE ALLEMANDE DE CHIMIE CLINIQUE  
-----3-1 - Principe

La CPK catalyse le transfert du groupe phosphate de la créatine-phosphate sur l'Adénosine-diphosphate (ADP) selon l'équation suivante :



Pour mesurer l'activité de l'enzyme, on fait agir le sérum à examiner sur la créatine-phosphate et l'ADP : l'ATP formé réagit à son tour en présence de glucose, d'hexokinase (HK, D.Hexose-6-phosphotransférases, EC.2.7.1.1.), de NADP et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G<sub>6</sub>PDH ; D Glucose-6-phosphate : NADP oxidoreductase, EC 1.1.1.49) selon les équations suivantes :



La vitesse de formation de NADPH<sub>2</sub> est mesurée par voie optique. Elle est directement proportionnelle à l'activité CPK dans le sérum.

3-2 - Réactifs

. Réactif 1 : enzymes/coenzyme/ substrat/activateur

ADP	2,0 mmol/l
AMP	5,0 mmol/l
Diadénosine pentaphosphate	10 $\mu$ mol/l
NADP	2,0 mmol/l
Créatine-phosphate	30 mmol/l
HK	$\geq$ 2,5 UI/ml
G <sub>6</sub> PDH	$\geq$ 1,5 UI/l
N-acétylcystéine	20 mmol/l

. Réactif 2 : glucose

Tampon imidazole pH 6,7	0,1 mol/l
Glucose	20 mmol/l
acétate de Mg	10 mmol/l
EDTA	2 mmol/l

3-3 - Mode opératoire

3-3-1 - Préparation du réactif

Dissoudre le contenu d'un flacon de réactif 1 avec 2,5 ml de réactif 2. Amener à la température de mesure avant l'emploi

Stabilité :  $\rightarrow$  7 jours entre 2-8°C  
 $\rightarrow$  12 heures entre 15-25°C

L'échantillon est du plasma ou du sérum recueilli sur héparine ou EDTA.

3-3-2 - Réaction cinétique

Longueur d'onde	340 nm
cuve	1 cm d'épaisseur

Température	25°C
Zéro de l'appareil	air

- . Ajouter à la solution réactionnelle portée à 25°C 0,1 ml d'échantillon ;
- . bien mélanger et placer 3 mn à 25°C ;
- . verser ensuite la solution dans une cuve ;
- . lire l'extinction ;
- . refaire les lectures à 1 mn d'intervalle pendant 3 mn.

Dans les cas d'activités plus élevées, mélanger 0,1 ml d'échantillon avec 0,9 ml de solution physiologique de chlorure de sodium et refaire la détermination : résultat x 10.

#### 3-4 - Calcul

(n) étant la variation moyenne de l'absorbance par mn, l'activité de la CPK en UI/l à 340 nm est égale à : (n) x 4127.

#### 3-5 - Valeurs usuelles normales à 25°C

CPK sérique < 70 UI/L

## CHAPITRE V

### EVOLUTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES APRES UN INFARCTUS DU MYOCARDE

#### 1 - INTRODUCTION

Le dosage des enzymes sériques fournit un appoint supplémentaire et parfois primordial au diagnostic des nécroses myocardiques. Cependant, aucun des enzymes dont le dosage a été proposé jusqu'ici n'est spécifique et tous peuvent s'élever au cours de l'évolution soit de l'infarctus pulmonaire, soit des atteintes hépatiques d'origines diverses, parmi lesquelles une étiologie cardiaque.

Le taux des activités enzymatiques de même que la durée pendant laquelle il est possible de mettre en évidence une élévation de l'activité des enzymes sériques dépendent de l'importance de la zone infarctée : une légère hyperactivité enzymatique peut être fugitive alors qu'une hyperactivité plus grande peut se prolonger plus longtemps.

#### 2 - VARIATION DES ACTIVITES TRANSAMINASIQUES

Après un infarctus du myocarde, les altérations des activités transaminasiques concernent surtout la transaminase glutamique-oxaloacétique sérique (SGOT) plus que la transaminase glutamique-pyruvique (GPT).

La très haute activité de la GOT sérique résulte d'une élévation significative de la concentration de la GOT quand l'enzyme est libéré du tissu nécrotique cardiaque après un infarctus aigu du myocarde.

La GOT sérique présente une activité nettement élevée déjà quelques heures après un infarctus du myocarde et convient donc à son diagnostic

précoce. L'augmentation de l'activité enzymatique sérique atteint un pic en 24 à 48 heures, et retourne à la normale au bout de 4 à 7 jours après l'infarctus.

Les pics d'élévation après l'infarctus du myocarde sont 2 à 5 fois plus grands que les valeurs normales. La hauteur du pic et la durée des activités anormales de la GOT sérique peuvent être proportionnelles à l'étendue de l'infarctus et au degré de la nécrose myocardique.

Après l'infarctus du myocarde, l'augmentation de l'activité de la SGOT n'est pas influencée par la localisation de l'infarctus, l'administration de digitaliques ou de quinidine, l'âge, le sexe et la température du corps.

Des élévations secondaires de la GOT peuvent être observées chez des patients qui, après un infarctus aigu du myocarde, présentent une nouvelle extension de cet infarctus.

Les changements d'activité de la GOT sérique peuvent participer au diagnostic d'infarctus du myocarde chez les patients ayant des douleurs thoraciques suspectes, mais aussi lors d'une insuffisance coronaire avec ou sans obstruction.

L'activité de la GPT sérique est peu altérée par un processus de nécrose myocardique, elle reste le plus souvent dans les limites normales. L'augmentation de l'activité de GPT après un infarctus du myocarde se rencontre surtout dans les cas d'atteinte hépatique due à la stase veineuse consécutive à la nécrose myocardique.

### 3 - EVOLUTION DES ACTIVITES LACTICO DESHYDROGENASIQUES APRES L'I.M

L'activité de la LDH et de ses isoenzymes après un processus de nécrose myocardique, reste plus longtemps pathologique. Mais de tous les enzymes utilisés dans le diagnostic, la LDH présente malheureusement la moindre spécificité organique et le dosage de ses isoenzymes est assez compliqué. Pour pallier cette difficulté, on détermine la

déshydrogénase  $\alpha$  hydroxybutyrique ( $\alpha$  HBDH) correspondant à l'isoenzyme LDH<sub>1</sub> (voir p. 46 ).

En outre, le taux de l' $\alpha$  HBDH (comme celui de la LDH totale) sérique augmente 12 à 24 heures après le début de l'infarctus et demeure pathologique pendant environ 10 à 16 jours, permettant ainsi un diagnostic au moment où le taux de la GOT est déjà revenu à la normale. C'est pourquoi, d'après les expériences actuellement connues, il faudra considérer le dosage de l' $\alpha$ HBDH, qui est beaucoup plus simple que la séparation des isoenzymes de la LDH, comme le test enzymatique de choix pour le diagnostic de l'infarctus du myocarde, d'autant plus que, selon WILKINSON, il est plus sensible que les dosages enzymatiques utilisés jusqu'ici.

Le taux de l' $\alpha$ HBDH n'est augmenté que dans quelques autres états pathologiques.

L'importance du dosage de la LDH pour le diagnostic des affections cardiaques réside dans le fait qu'il est effectué en même temps que le test de l' $\alpha$ HBDH. On obtient ainsi un quotient  $\alpha$ HBDH/LDH qui permet de différencier l'infarctus du myocarde des autres maladies, notamment des lésions hépatiques, car un quotient  $\alpha$ HBDH/LDH élevé est associé à une augmentation de l' $\alpha$ BDH ne se rencontre que dans l'infarctus du myocarde, dans l'anémie mégaloblastique et dans les myopathies.

L'angine de poitrine, particulièrement importante à différencier de l'infarctus du myocarde, ne s'accompagne pas d'une augmentation de l' $\alpha$ HBDH.

La myocardite ne provoque l'élévation du taux enzymatique que dans les cas où des nécroses se sont déjà installées au niveau du myocarde.

#### 4 - ÉVOLUTION DES ACTIVITÉS DE LA CPK ET DE SES ISOENZYMES APRES L'I.M.

Du point de vue clinique, le dosage de la CPK et de ses isoenzymes joue un rôle important d'une part quand il s'agit de confirmer un diagnos-

tic dans lequel les critères typiques de l'infarctus font défaut, d'autre part, pour surveiller l'évolution d'un infarctus.

La CPK étant spécifique des muscles, une augmentation de son activité sérique peut être due à une lésion de la musculature squelettique ou cardiaque.

L'élévation de la CPK sérique débute déjà 3 à 6 heures après un infarctus -le plus tôt de tous les enzymes importants pour le diagnostic- et atteint son maximum après 9 à 48 heures pour retourner à la normale entre le 2<sup>o</sup> et le 4<sup>o</sup> jour. Il existe une certaine corrélation entre le degré d'élévation enzymatique et la gravité d'un infarctus.

Grâce à ces propriétés, le dosage de la CPK est devenu l'indice le plus sensible du diagnostic enzymatique d'un infarctus du myocarde récent.

Le sérum d'un patient chez qui un infarctus du myocarde a été confirmé présente une activité CPK-MB mesurable au moins entre 6 et 28 heures après la manifestation clinique de l'infarctus. Dans des contrôles d'évolution d'infarctus du myocarde confirmés, on a pu mesurer une activité CPK-MB jusqu'à 60 heures après l'irruption clinique de l'infarctus. Au moment du maximum de l'activité de la CPK totale, l'activité CPK-MB représente 6 à 25% de celle-ci, avec une valeur moyenne de 8%. Les activités CPK-MB mesurées après l'infarctus du myocarde varient entre 15 à 160 UI/l, toujours d'après les résultats connus à ce jour.

La cinétique de l'activité de la CPK-MB peut prendre des aspects très différents dans l'infarctus du myocarde. Il y a lieu de remarquer que le dosage de la CPK totale peut parfois aboutir au diagnostic d'un infarctus du myocarde inexistant en réalité, ce danger n'existe pas avec le dosage de l'activité CPK-MB.

Lorsque la phase aiguë de l'infarctus disparaît, la fraction CPK-MB diminue rapidement et il est habituellement indétectable après un intervalle de 48 heures.

Le post-infarctus, intervalle entre 6 et 12 heures, révèle habituellement une augmentation de l'activité de la LDH, mais un taux normal de ses isoenzymes, pendant que la CPK-MB est déjà apparue.

Entre 12 et 24 heures, les isoenzymes LDH<sub>1</sub> et LDH<sub>2</sub> sont augmentés et la LDH<sub>1</sub> présente habituellement le plus grand pourcentage de l'activité totale, avant la LDH<sub>2</sub>. Quand la CPK-MB et l'isoenzyme cardiaque de la LDH augmentent dans un même sérum, cette combinaison assure un diagnostic d'un infarctus du myocarde aigu.

La réapparition de la CPK-MB chez un patient, interprétée comme diagnostic de réinfarctus, est en corrélation avec de nouveaux changements de l'ECG et une altération de l'état clinique.

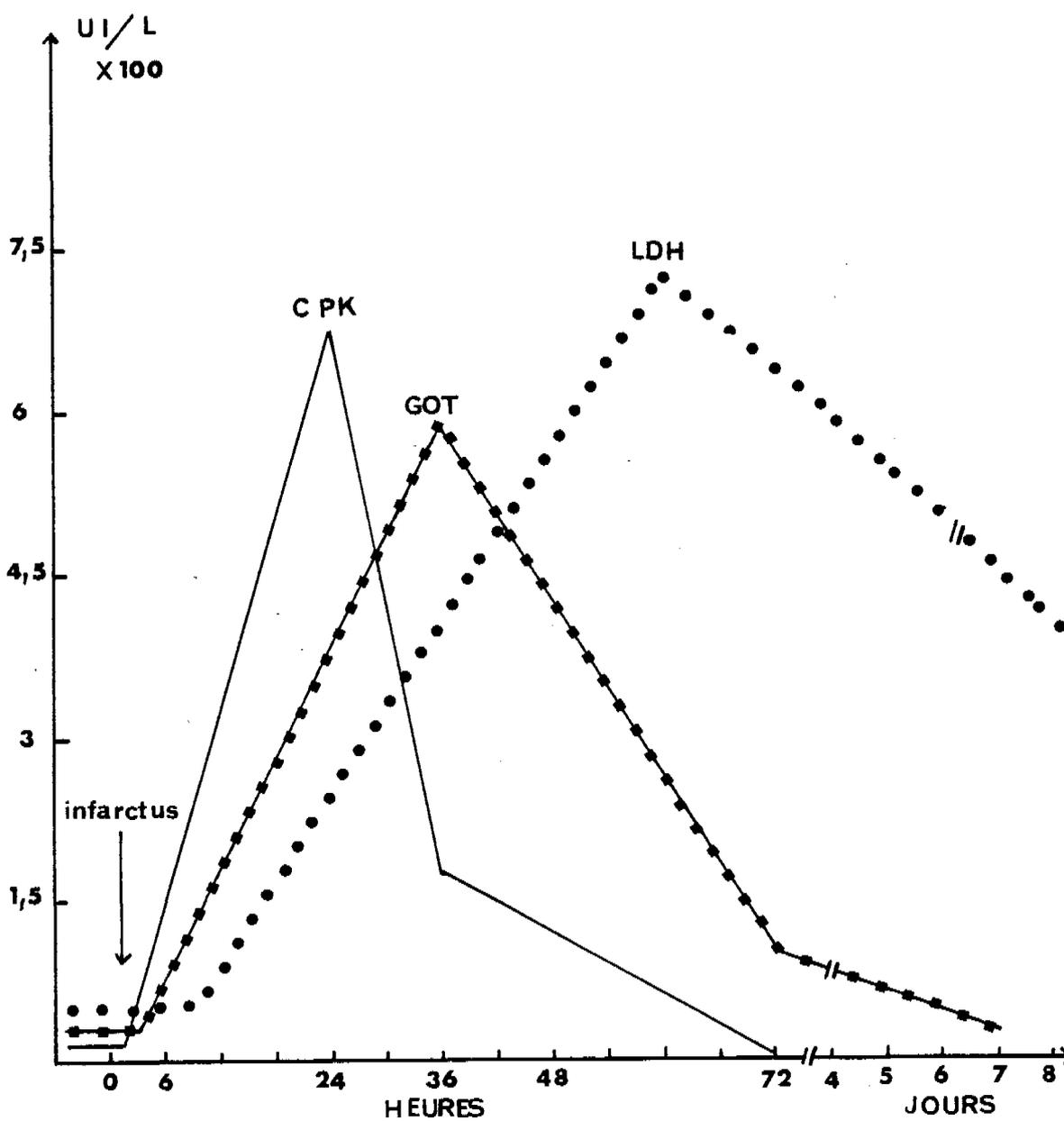
Quoique la CPK-MB soit l'isoenzyme le plus spécifique pour la détection des anomalies du myocarde, l'électrophorégramme de la LDH peut apporter une information complémentaire en vue du diagnostic.

Remarque : Les enzymes que nous venons d'étudier ne sont pas uniquement spécifiques du myocarde. Ils sont très ubiquitaires et leurs altérations peuvent impliquer de nombreux organes et tissus.

En effet, les CPK ont aussi une élévation de leurs activités dans les maladies musculaires comme la dystrophie musculaire progressive, les myotonies, la myosite, la myoglobulinurie aiguë intermittente, etc.

On note également une élévation des activités de la LDH et de ses isoenzymes dans les maladies du sang comme l'anémie pernicieuse, les leucoses.

Les altérations des activités des Transaminases GOT et GPT intéressent aussi bien les affections cardiaques que les atteintes hépatiques.



Apparition et durée des anomalies enzymatiques sériques  
 au cours de l'infarctus du myocarde

Boehringer Mannheim

## CHAPITRE VI

### CONTROLE DE QUALITE DES DOSAGES ENZYMATIQUES

Dans ce chapitre, nous parlerons du contrôle de qualité des dosages enzymatiques. Notre intention n'est pas de faire une étude du contrôle de qualité en soi, mais de décrire d'une façon aussi simple que possible, l'organisation de ce contrôle en ce qui concerne les dosages enzymatiques.

Dans le souci d'améliorer les techniques de dosage, de garantir la fiabilité des méthodes et des appareils, un contrôle de qualité concernant tous les paramètres biochimiques a été organisé. Ce contrôle de qualité revêt plusieurs aspects ; on distingue :

- . un contrôle quotidien au sein du laboratoire,
- . un contrôle bimensuel international,
- . un contrôle national obligatoire imposé par la Société Française de Biologie Clinique.

Tous les dosages effectués au sein du laboratoire sont soumis à ces différents contrôles, mais nous insisterons seulement sur les contrôles relatifs à l'Enzymologie.

#### 1 - CONTROLE QUOTIDIEN

Le contrôle de qualité quotidien est un contrôle local. Il permet de s'assurer du bon fonctionnement des appareils, de l'exactitude et de la précision des techniques.

Le laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Nord fait partie de l'Association pour le Contrôle de Qualité de la Région Sud (ASCOSUD).

Pour ce contrôle journalier, on utilise des sérums de contrôle qui sont des spécialités industrielles dont les titres en différentes activités enzymatiques sont connus ou pas. Selon que l'on connaît les titres des différents sérums de contrôle employés, on distingue deux types de contrôles journaliers :

- . un contrôle journalier à sérums non titrés,
- . un contrôle journalier à sérums titrés.

#### 1-1 - CONTROLE JOURNALIER A SERUMS TITRES

Pour ce contrôle, on emploie trois types de sérums de contrôle :

- . les "Décisions" BECKMAN, à trois taux différents, les titres étant connus du personnel ;
- . les sérums de contrôle Précipath et Précinorm ;
- . un sérum de contrôle titré dont le titre est seulement connu du responsable du contrôle et inconnu du personnel.

Ces différents types de sérums sont placés sur la couronne du Multistat III en même temps que les autres godets contenant les échantillons, leur dosage se fait ainsi au même moment que celui des sérums de malades.

#### 1-1-1 - Sérums de contrôle de titres connus

##### 1-1-1-1 - "Décisions" BECKMAN

Les "Décisions" BECKMAN sont des sérums de contrôle liquides (ce qui est une grande innovation) stabilisés pour contrôler la reproductibilité et l'exactitude des dosages enzymatiques.

Les "Décisions" sont préparés à partir de sérums humains stabilisés par de l'éthylène glycol. Ces sérums de contrôle liquides, stables pendant plusieurs jours au froid, permettent d'éliminer les erreurs liées à la régénération des sérums lyophilisés. Ils sont prêts à l'emploi et se présentent sous trois taux : "Décisions" I, II et III, permettant d'évaluer ainsi les valeurs basses, moyennes et hautes des paramètres enzymatiques.

Leurs titres en activités enzymatiques sont déjà connus du personnel car ils sont enregistrés sur un document affiché au-dessus de l'appareil. L'intérêt de ces "Décisions" BECKMAN, c'est qu'ils sont dosés à 25°C (température à laquelle nous effectuons nos propres dosages).

#### 1-1-1-2 - Sérums de contrôle Précinorm et Précipath -----

Ce sont des sérums lyophilisés. Ils s'appliquent aussi bien aux contrôles d'exactitude qu'à l'évaluation de la précision dans la série et de jour en jour. Leurs valeurs théoriques se situent dans des domaines pathologiques pour le Précipath et dans des domaines normaux pour le Précinorm.

#### 1-1-2 - Sérum de contrôle appelé "Saint du jour"

C'est un sérum lyophilisé dont le titre est connu seulement du responsable du contrôle. Il en existe 6 types différents, conservés au froid. Chaque jour, on utilise un type différent de celui du jour précédent, aussi bien dans les dosages en grande série que dans les dosages effectués pendant la garde, ce qui permet une bonne vérification des procédés de manipulation.

#### 1-2 - SERUM DE CONTROLE NON TITRE -----

C'est le sérum fourni par le Professeur PASTOR dont le titre est inconnu de tout le monde. Les résultats de ce contrôle sont traités

par informatique, ce qui permet de se situer par rapport aux autres laboratoires de la région de Marseille.

### 1-3 - TRAITEMENT INFORMATIQUE DES RESULTATS

---

Il se fait par passage des résultats sur ordinateur. Ce traitement informatique des résultats journaliers se fait dans le Service du Professeur PASTOR qui est chargé du contrôle de qualité journalier de l'ASCOSUD. Ce service reçoit chaque mois, en même temps que les résultats du laboratoire, ceux des autres laboratoires affiliés. Le test auquel aboutit le traitement informatique fournit des documents comprenant :

- . un relevé global par laboratoire,
- . une série d'histogrammes.

#### 1-3-1 - Relevé global par laboratoire

Ce relevé global est une transcription de tous les résultats du mois (on peut ainsi s'assurer si les résultats ont été correctement transcrits). La valeur moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation sont, en outre, calculés. On peut, grâce à ces différentes données, construire les graphiques de contrôle avec deux écarts-types (valeurs limites :  $M \pm 2 \sigma$ ) (voir tableau page suivante).

#### 1-3-2 - Série d'histogrammes

Il existe une série par paramètre enzymatique, comme par paramètre non enzymatique. L'histogramme assure une ventilation partielle par technique.

Sur cet histogramme, la position de notre laboratoire est objectivée par le signe XXX à la partie inférieure et notre technique est notée par le signe ++. De plus, deux lignes verticales objectivent les

## RESULTATS DU LABORATOIRE NUMERO 335

MOIS : AVRIL 1982

DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
1.4.1982	70	76	320	62
2.4.1982	69	65	330	59
3.4.1982	66	77	310	69
4.4.1982	77	78	340	42
5.4.1982	71	78	340	63
7.4.1982	79	75	320	67
8.4.1982	78	74	330	56
9.4.1982	74	74	320	68
10.4.1982	77	82	340	58
11.4.1982	76	81	340	60
13.4.1982	86	87	340	68
14.4.1982	85	85	350	59
15.4.1982	83	85	340	59
16.4.1982	76	83	330	67
17.4.1982	77	78	320	56
18.4.1982	80	80	340	70
19.4.1982	78	76	340	76
20.4.1982	78	79	330	49
21.4.1982	81	83	350	59
22.4.1982	73	69	350	57
23.4.1982	80	79	320	51
24.4.1982	80	77	350	52
26.4.1982	79	80	350	65
28.4.1982	78	0	0	50
29.4.1982	79	0	0	0
30.4.1982	0	0	0	0
MOYENNE	77,20	78,30	334,78	60,08
ECART-TYPE	4,63	4,95	11,75	7,75
C %	6,00	6,32	3,51	12,89

La valeur 0 indique que le laboratoire n'a pas dosé ce paramètre.

Pr J. PASTOR ; Pr. A.M. PAULI  
 BIOLOGISTES DES HOPITAUX  
 HOPITAL Ste MARGUERITE - C.H.R. MARSEILLE (A.A.P.M.)

limites : moyenne générale M (toutes techniques confondues)  $\pm$  deux écarts-types. On trouve en outre sur l'histogramme les valeurs moyennes, les écarts-types et le coefficient de variation par groupe de techniques ainsi que le nombre de laboratoires utilisant cette technique. On peut ainsi se situer par rapport aux autres laboratoires utilisant la même technique (voir graphique page suivante).

A partir de l'histogramme, on peut tracer une courbe de GAUSS dont la médiane est la valeur de la moyenne et elle est entourée des écarts-types  $- 2\sigma$  et  $+ 2\sigma$ . Les résultats se situant dans cette courbe sont acceptables.

## 2 - CONTROLE BIMENSUEL INTERNATIONAL

C'est le contrôle BC 07 WELLCOME auquel sont soumises les méthodes du laboratoire de Chimie Clinique de l'Hôpital Nord. Il est fait deux fois par mois et suit le même principe que le contrôle journalier. Il consiste à doser un échantillon inconnu fourni par le laboratoire WELLCOME, par les méthodes déjà décrites.

Les résultats traités par informatique aboutissent à une série d'histogrammes (un par paramètre), ce qui permet ainsi d'établir des comparaisons entre les laboratoires européens utilisant la même technique.

Dans un rapport bimensuel, il est fourni un coefficient de variation et une déviation standard (voir graphique page suivante).

## 3 - CONTROLE NATIONAL OBLIGATOIRE

C'est un contrôle de qualité auquel sont soumis tous les laboratoires de Biologie Clinique de France. Il est organisé par la Société Française de Biologie Clinique (S.F.B.C.). La S.F.B.C. envoie deux échantillons (sérums de contrôle) dans lesquels il y a un nombre variable de paramètres à doser. C'est un contrôle à sérums de titres inconnus. Les résultats de chaque laboratoire, envoyés à la S.F.B.C., sont

	AVANT ECRETAGE		APRES ECRETAGE				
	POUR CE LABO	POUR L'ENSEMBLE DES LABOS	NON N.A. CYST	ACTIVITE N.A. CYST ////	****	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
NB LABOS	1	51	4	44	0	0	
NB VALEURS	26	657	24	592	0	0	
MOYENNE	171.080	165.334	151.525	170.673	0.0	0.0	
ECART-TYPE	20.908	40.952	23.906	33.555	0.0	0.0	
C %	12.150	24.769	15.777	19.661	0.0	0.0	

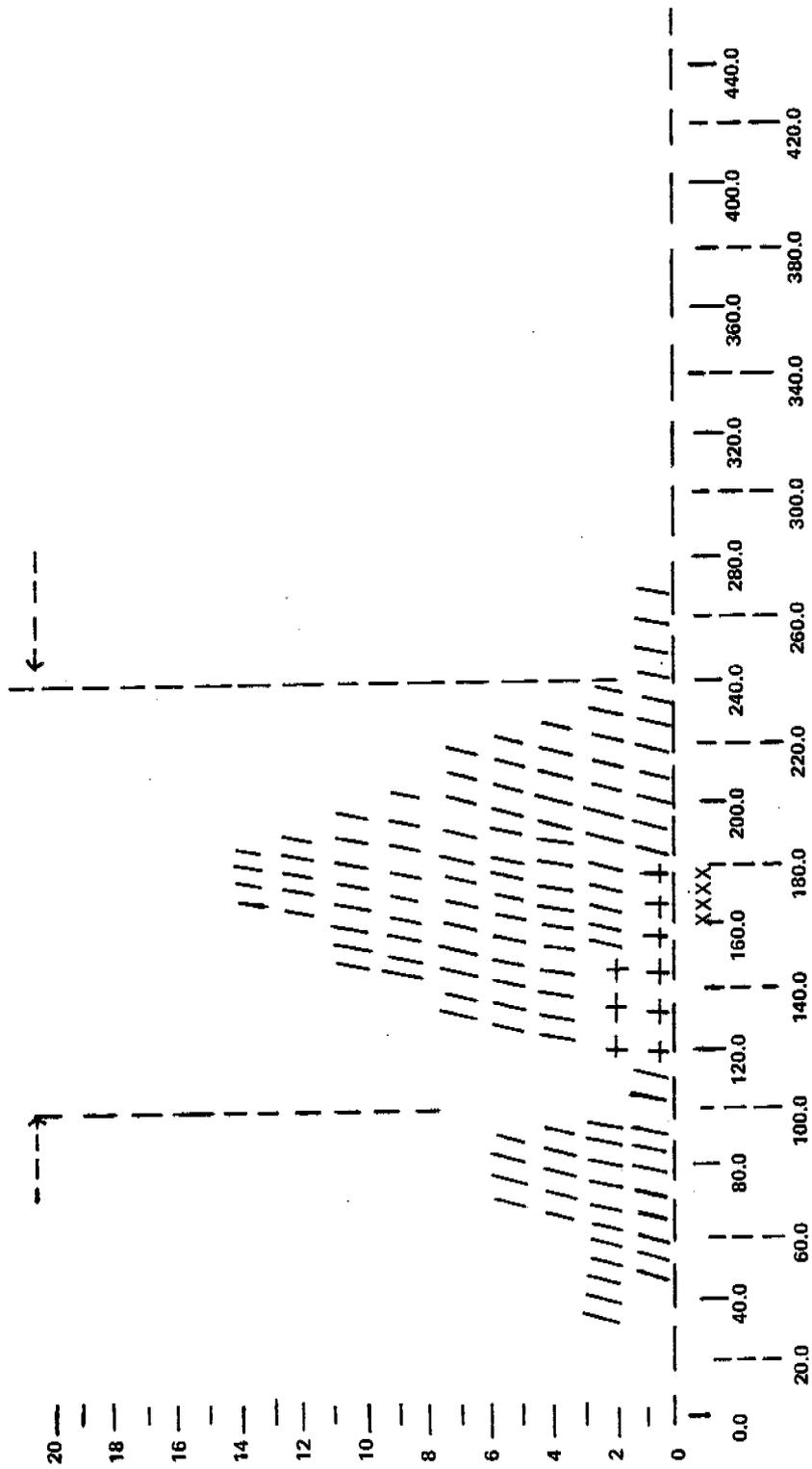
NON. N.A. CYST : Technique n'utilisant pas la N. Acétylcystéine

N.A. CYST : Technique utilisant la N. Acétylcystéine

Autres techniques :

HISTOGRAMME DE CPK 1982

XXXX indique la position de votre laboratoire.  
 La technique de votre laboratoire est : ////



N.B. : Les paramètres statistiques ne doivent pas être pris en considération quand le nombre de labos est inférieur à 5.

WELLCOME

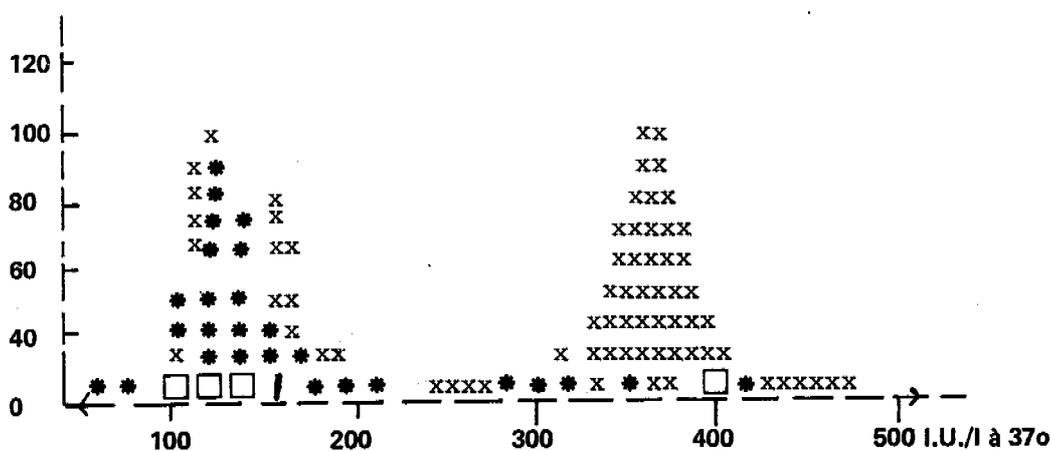
**PROGRAMME DE CONTROLE DE CHIMIE CLINIQUE  
RESULTATS POUR ECHANTILLONS DATES DU 17/1/83**

**HISTOGRAMME DES RESULTATS POUR LA LACTATE DESHYDROGENASE**

Légende de l'histogramme :

- I** : Votre résultat    □ Résultats par votre méthode  
 \* Résultats par des méthodes semblables aux vôtres  
 X Résultats par toutes les autres méthodes  
 > plus de 2 S.D. au-dessous de la moyenne  
 < plus de 2 S.D. au-dessus de la moyenne

**NOMBRE DE  
LABORATOIRES**



	Nbre de labos	Moyenne	S.D.
Résultats par toutes les autres méthodes	908	302.5	131.1
Résultats du groupe de votre méthode	209	157.3	48.0
Résultats de votre méthode	8	169.5	Trop faible

Votre valeur est : 73

Votre propre unité : 182.5 IU/L à 37°C

**VOTRE VALEUR EST : 16% DE LA MOYENNE DU GROUPE DE VOTRE METHODE  
(0,5 S.D.)**

traités par informatique, et il est fourni un rapport de la Commission de Contrôle. Ce rapport, comme les précédents, situe les laboratoires les uns par rapport aux autres.

#### 4 - CONCLUSION

L'intérêt d'un contrôle de qualité en enzymologie et ailleurs n'est plus à démontrer. Mais il faut noter cependant que ce contrôle n'est pas facile et que les comparaisons interlaboratoires sont rendues délicates pour plusieurs raisons :

- a) - la possibilité d'erreurs inhérentes à la nature des enzymes : on mesure des activités et non des concentrations, et l'on sait déjà de combien de facteurs physiques et chimiques les activités enzymatiques sont dépendantes (température, pH, force ionique, concentration du substrat, présence d'activateurs ou d'inhibiteurs, nature protéique) ;
- b) - l'utilisation de sérums de contrôle de nature différente : sérums humains et animaux ;
- c) - l'appareillage est aussi un facteur déterminant qui peut affecter considérablement les résultats de dosage ;
- d) - les coefficients de transformation utilisés pour les changements de température des contrôles internationaux paraissent assez aléatoires.

Les techniques du Multistat III sont assez reproductibles, mais l'appareil est moins sensible aux valeurs basses. Par ailleurs, le micro-analyseur centrifuge présente l'avantage de permettre une économie de réactifs et d'éviter de gaspiller le sang des patients.

***Troisième Partie***

**TRAVAUX PERSONNELS**

---

## CHAPITRE I

### CADRE DE TRAVAIL - DEFINITION DE L'ECHANTILLON

#### 1 - CADRE DE TRAVAIL

Les travaux personnels ont été réalisés à Marseille au Laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalier Universitaire Nord. Ce laboratoire, dirigé par Monsieur le Professeur MIRANDA, est chargé d'effectuer tous les dosages biochimiques de routine demandés par les différents services de l'hôpital. La plupart des examens sont effectués sur des appareils automatiques : IL MULTISTAT III (qui dose les paramètres auxquels nous sommes particulièrement intéressé), TECHNICON SMA II, BECKMAN ASTRA, SEBIA CELLOSYSTEM, et, tout récemment, un TECHNICON QUANTACHEM qui porte à environ 90% le pourcentage des examens effectués de façon entièrement automatique. Ce laboratoire, qui a une activité annuelle d'environ 10 millions de B (l'Hôpital Nord possède environ 800 lits), a, en outre, un système informatique qui permet la gestion des statistiques hospitalières, la cotation des examens pour chaque malade, ainsi que l'édition des listes de travail pour les différents postes de dosages.

#### 2 - DEFINITION DE L'ECHANTILLON

Les échantillons sont des prélèvements de sang de malades hospitalisés dans les différents services de l'Hôpital. Nous distinguons deux types d'échantillons :

- . les échantillons formés par les prélèvements chez des malades déjà hospitalisés et sous surveillance médicale ;
- . les échantillons formés par les prélèvements chez des malades hospitalisés d'urgence.

## CHAPITRE II

### MATERIELS DE TRAVAIL - TECHNIQUES

#### 1 - GENERALITES

Le Laboratoire étant informatisé sur une grande échelle, le matériel utilisé est conforme aux conditions d'exploitation des différents appareils, d'une part, et aux analyses effectuées d'autre part.

Les matériels accessoires sont généralement du type à usage unique et sont détruits après avoir servi.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons surtout utilisé le IL MULTISTAT III qui effectue les dosages enzymatiques. Nous donnerons, dans la suite, une brève description de cet appareil.

#### 2 - PRELEVEMENTS

Les prélèvements sont faits au niveau du Service hospitalier qui demande l'analyse. On distingue deux types de prélèvements :

- . prélèvements dans les tubes secs à bouchons rouges ayant un volume de 10 ml,
- . prélèvements dans les tubes secs à bouchons verts, ayant un volume de 10 ml, contenant un anticoagulant : l'Héparinate de Lithium. Ces tubes sont utilisés pour les malades soumis à un traitement anticoagulant.

Les tubes de prélèvement ont une étiquette sur laquelle sont mention-

nés le nom du malade, le service demandeur, la nature des examens demandés. Ils sont accompagnés de bons de demande d'examens où figurent les mêmes renseignements, bons qui sont plus particulièrement destinés au Secrétariat du laboratoire qui attribuera à chaque malade un numéro informatique.

### 3 - TECHNIQUES

Le IL MULTISTAT III est chargé d'effectuer les dosages enzymatiques :

- . Transaminases GOT et GPT
- . Lactico déshydrogénases LDH
- . Créatine phosphokinase CPK
- . Amylase
- . ~~Phosphatases~~ <sup>Phosphatases</sup> alcalines et acides
- . Gamma Glutanyl Transpeptidase  $\gamma$ GT

et aussi des dosages de paramètres non enzymatiques :

- . Cholestérol total
- . Bilirubine totale
- . Triglycérides

#### 3-1 - DESCRIPTION SOMMAIRE DE L'ANALYSEUR MULTISTAT III

---

Cet appareil comprend deux modules distincts : un module distributeur de réactifs et de sérums et un module analyseur comprenant un ordinateur dont le rôle est de contrôler le bon déroulement des réactions.

##### 3-1-1 - Module distributeur

Il effectue automatiquement les dilutions nécessaires et le chargement

du disque d'analyse en réactifs et sérums. Il comporte :

- . un système de seringues de précision avec programmation possible des volumes à distribuer ;
- . une plaque tournante qui supporte une couronne de godets contenant les différents sérums à doser. Au centre de cette couronne se trouve un disque d'analyse en plastique comprenant 20 cuvettes de lecture ;
- . deux bras articulés permettent de déposer dans chaque cuvette de lecture le sérum à doser et le réactif, le mélange s'effectuant dans l'analyseur par rotation du disque d'analyse.

### 3-1-2 - Module analyseur

Il possède une enceinte thermostatée dans laquelle est déposé le disque d'analyse. Un clavier permet d'indiquer par un numéro de code le dosage à effectuer, l'ordinateur se charge alors de sélectionner filtre et température, de mémoriser les différentes lectures de DO et d'exprimer les résultats en concentration ou en activité enzymatique par l'intermédiaire d'une imprimante.

Sur décision du manipulateur, ces résultats pourront être envoyés dans la mémoire centrale du système informatique.

## CHAPITRE III

### RESULTATS DES ANALYSES

Nous avons étudié les dossiers de malades hospitalisés dans deux services de l'hôpital :

- . le Service de Médecine Générale, dirigé par M. le Professeur LUCCIONI,
- . le Service de Cardiologie dirigé par M. le Professeur TORRESANI.

Nous avons retenu pour notre étude dix-sept malades dont sept du Service du Professeur LUCCIONI et dix du Service du Professeur TORRESANI. Ces malades ont été suivis pendant la période de Janvier à Décembre 1982.

Chez tous ces malades, des dosages enzymatiques plus ou moins réguliers ont été effectués au cours de leur hospitalisation. Ces dosages concernent essentiellement les principaux enzymes caractéristiques de la pathologie cardio-vasculaire ; ce sont :

- . Transaminases GOT et GPT,
- . Lacticodéshydrogénases LDH,
- . Créatine phosphokinase CPK,

Les dosages ont été faits suivant les méthodes précédemment décrites, grâce à la technique informatisée du MULTISTAT III dont nous avons déjà donné une description sommaire.

Chez ces malades, des bilans SMA ont souvent été demandés.

Pour chaque malade, nous avons dressé un tableau récapitulatif des résultats obtenus et tracé les courbes d'évolution dans le temps des diverses activités enzymatiques.

Nous avons tenté enfin d'analyser et d'interpréter nos résultats et les avons comparés avec ceux de la clinique par une consultation des dossiers médicaux que les chefs de service ont eu l'obligeance de mettre à notre disposition.

*N.B. Dans les représentations graphiques qui suivent, nous avons porté en abscisse le temps T qui exprime le nombre de jours d'hospitalisation.*

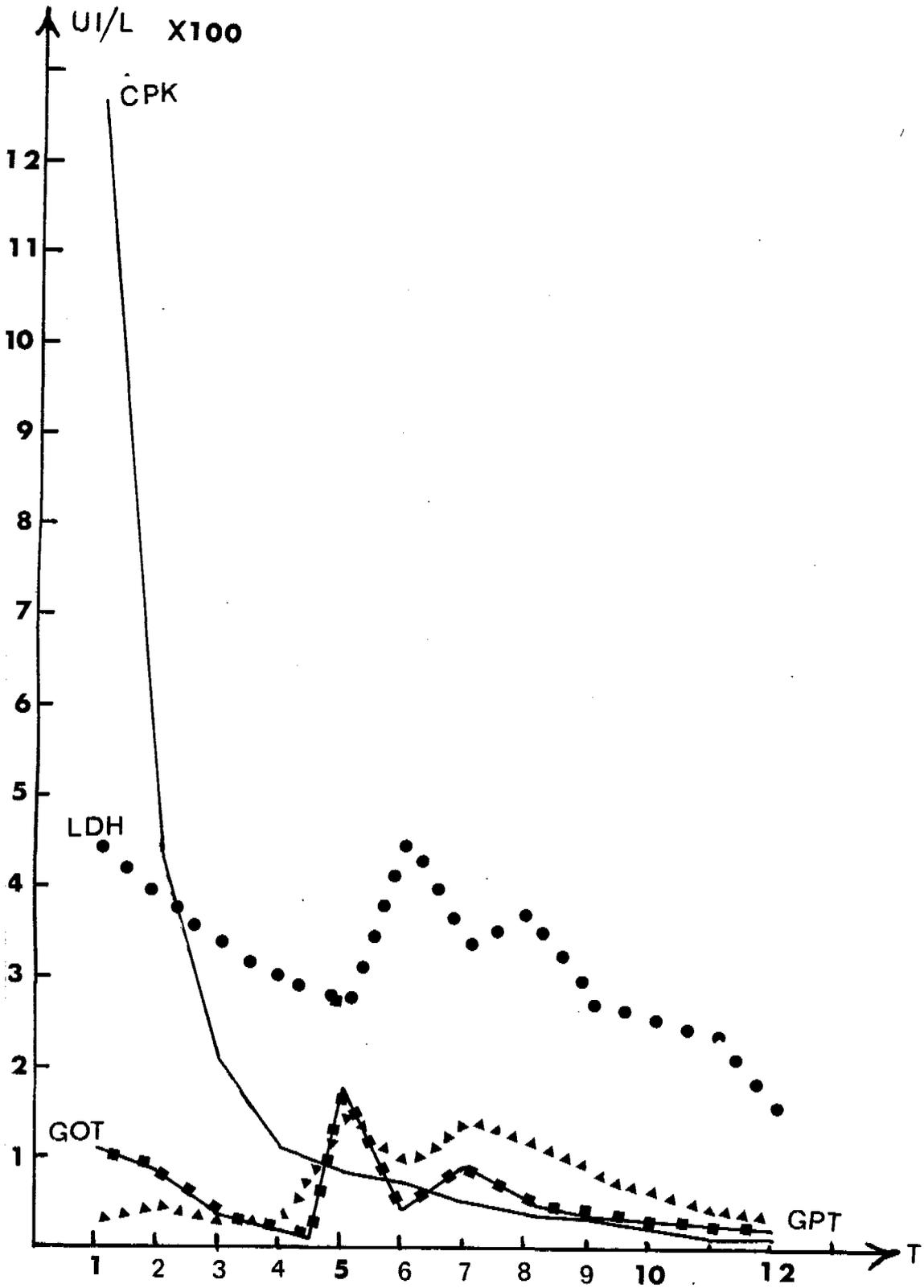
SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

CAS No 1

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Roger LEL.	4.1.1982	108	38	402	1260
	5.1.1982	85	43	377	439
	6.1.1982	39	33	338	215
	7.1.1982	27	32	297	110
	7.1.1982	9	35	270	103
	8.1.1982	177	161	454	82
	9.1.1982	53	100	338	70
	10.1.1982	92	144	370	56
	11.1.1982	55	128	279	44
	12.1.1982	28	88	238	43
	14.1.1982	17	45	166	22
	18.1.1982	14	29	122	15
	20.1.1982	9	22		
	21.1.1982	9	18	103	14
27.1.1982	15	20	73	12	

Panorama enzymatique compatible avec l'infarctus du myocarde. Les enzymes cardiaques sont très élevés dès le premier jour : CPK, LDH, GOT. Tandis que la CPK diminue ensuite régulièrement, les trois autres enzymes : LDH, GOT et GPT remontent le quatrième jour (8.1.82) ; le fait que la GPT qui, jusqu'ici, présentait des valeurs proches de la normale s'élève brusquement et atteint, dans les jours suivants, un niveau plus élevé que celui de la GOT suggère une complication hépatique par stase sanguine.

Syndrome douloureux thoracique trinitrorésistant apparu au repos après prise d'alcool. Malade hospitalisé antérieurement pour angor. Le tableau est en faveur d'une nécrose myocardique antéro-septale récidivante.



CAS N° 1

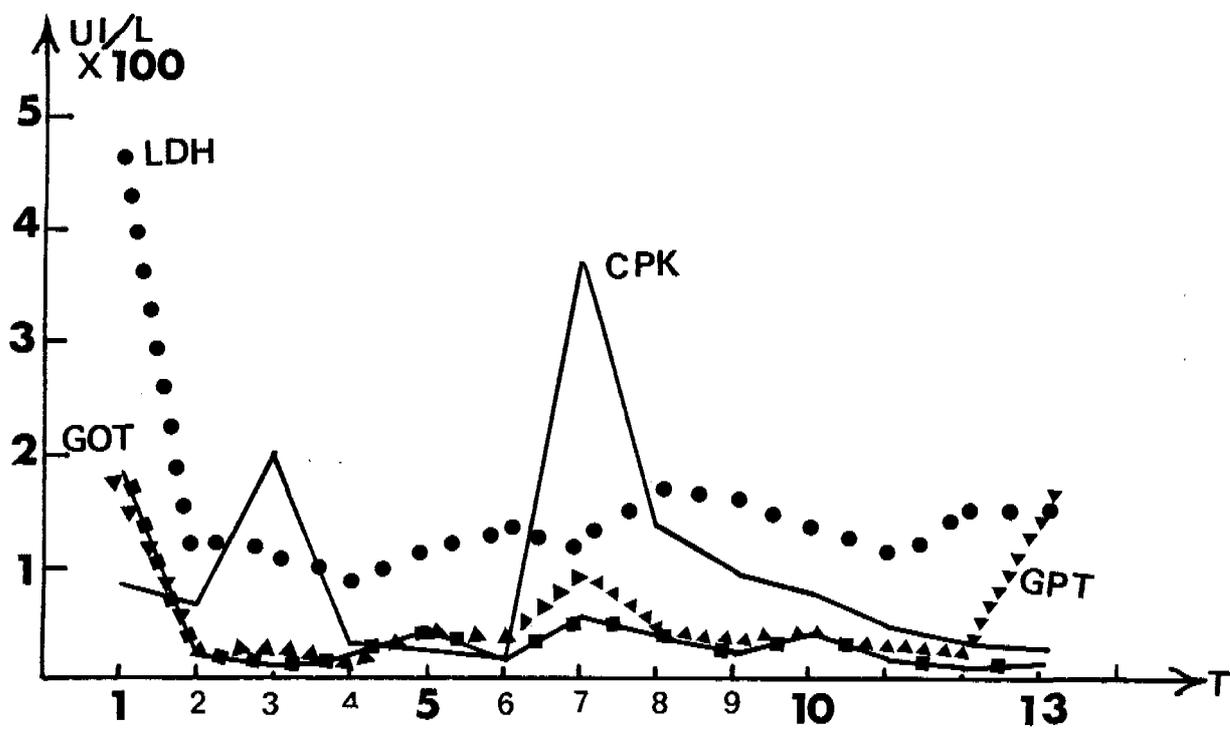
SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

CAS No 2

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Julia P.	8.1.1982	182	164	470	84
	9.1.1982	24	24	125	66
	10.1.1982	15	22	118	49
	10.1.1982	14	13	83	206
	11.1.1982	18	19	122	30
	12.1.1982	41	46	129	29
	13.1.1982	25	29	122	23
	14.1.1982	61	90	172	373
	15.1.1982	35	40	160	137
	16.1.1982	24	32	137	65
	17.1.1982	36	29	120	38
	18.1.1982	17	27	148	26
	20.1.1982	11	20	158	23

Panorama enzymatique compatible avec l'infarctus du myocarde. Au départ, les enzymes sont élevés, sauf la CPK qui a déjà bien régressé. On observe ensuite deux redémarrages de la CPK : le troisième (10.1.82) et le septième (14.1.82) jours, accompagnés ou suivis par ceux des trois autres enzymes. Vers la fin, la GPT tendant à devenir plus élevée que la GOT, on pense à une légère atteinte hépatique faisant suite aux différentes poussées de nécrose myocardique. La LDH, quant à elle, se maintient à des niveaux assez constants, franchement supérieurs à la normale.

Angor de Prinzmetal suivi d'un infarctus avec nécrose sous-endocardique antérieure.



CAS N° 2

SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

CAS No 3

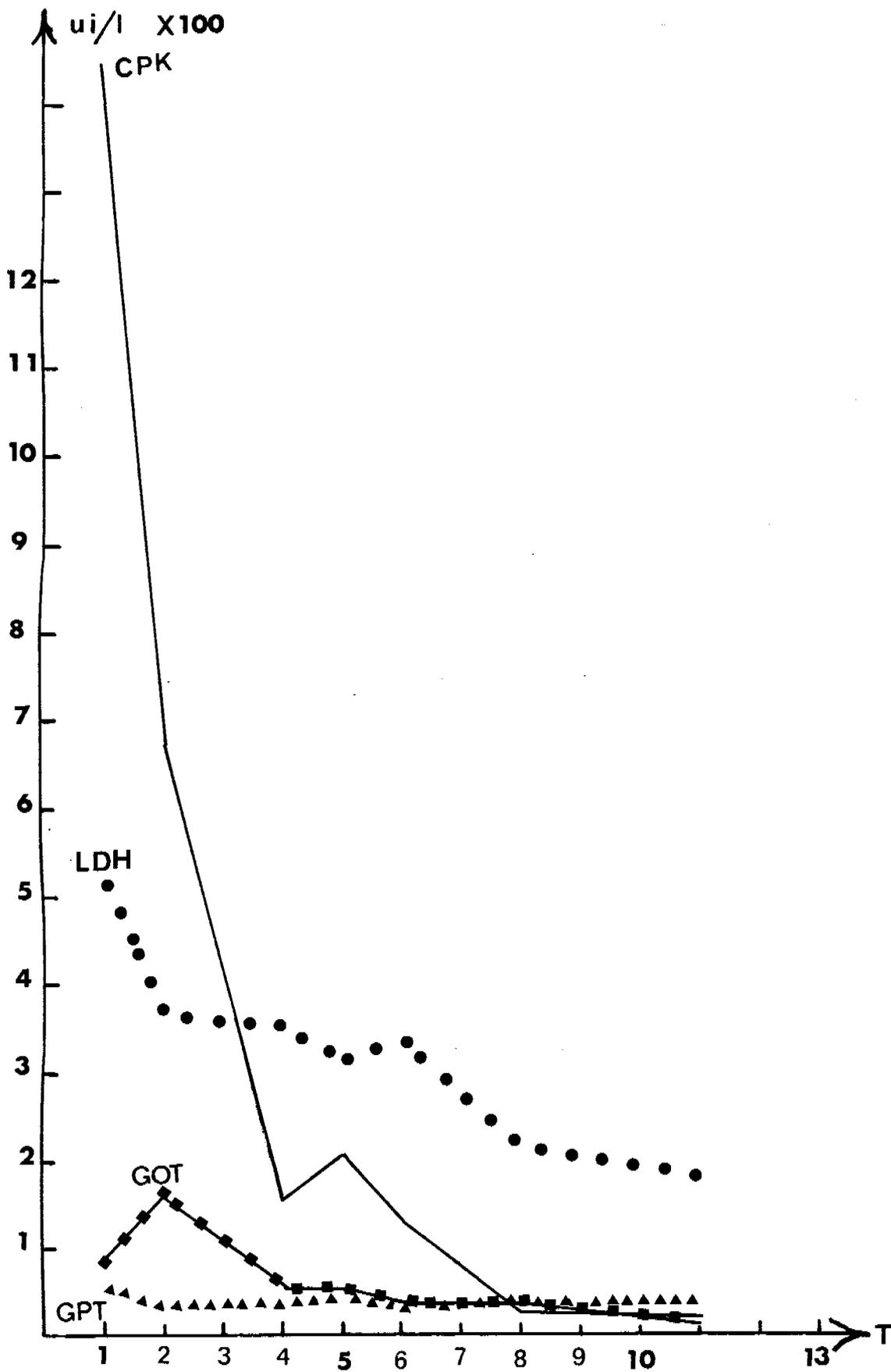
NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Simone DU.	11.1.1982	89	48	520	1440
	12.1.1982	159	33	374	687
	14.1.1982	57	29	347	158
	15.1.1982	48	37	312	211
	16.1.1982	42	33	329	132
	18.1.1982	28	34	212	36
	21.1.1982	19	34	180	26

Panorama enzymatique compatible avec l'infarctus du myocarde.

Dès le premier jour, on observe une baisse importante de la CPK et de la LDH, suivie d'une légère remontée le cinquième (15-1-82) et le sixième (16-1-82) jours respectivement.

Accident le 10-1.

Diagnostic : nécrose septale profonde évolutive.



CAS N° 3

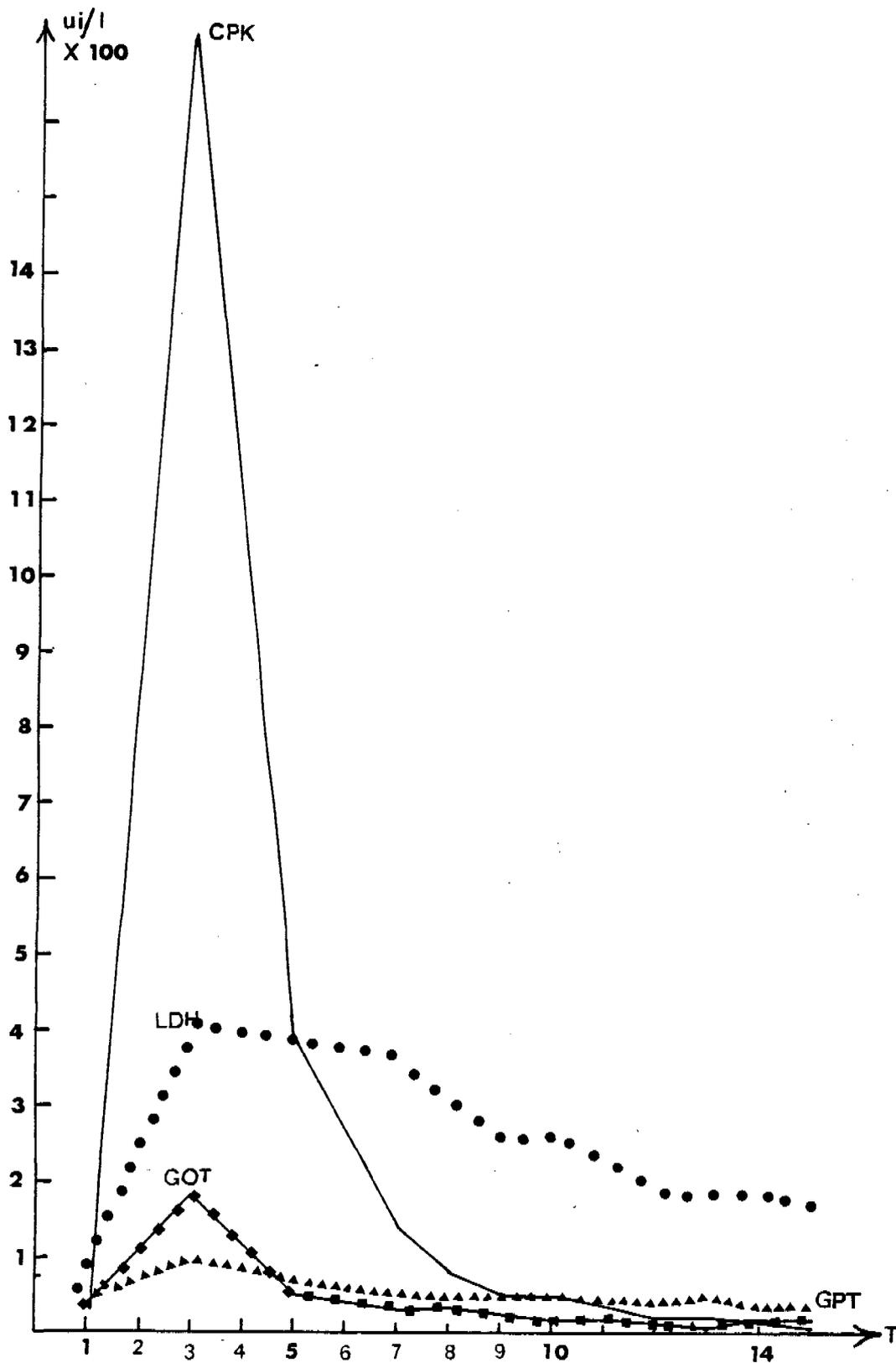
SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

CAS No 4

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Marcel C.	4.2.1982	40	39	93	33
	6.2.1982	186	91	396	1725
	8.2.1982	61	70	395	404
	10.2.1982	32	55	373	139
	11.2.1982	30	42	318	89
	12.2.1982	22	42	264	57
	13.2.1982	25	40	267	46
	15.2.1982	19	38	197	28
	16.2.1982	26	41	185	26
	17.2.1982	22	38	185	17
	18.2.1982	18	36	174	17
	19.2.1982	13	30	136	14
	20.2.1982	13	30	114	12
	22.2.1982	14	28	113	17

Panorama enzymatique complet et spectaculaire d'un infarctus apparemment survenu pendant le séjour à l'hôpital. La variation brusque de la CPK dans les deux sens contraste avec le lent retour à la normale de la LDH. A partir du cinquième jour, la GPT constamment plus élevée que la GOT semble témoigner d'une légère stase hépatique.

Oblitération coronaire droite proximale avec nécrose septale profonde en évolution.



CAS N° 4

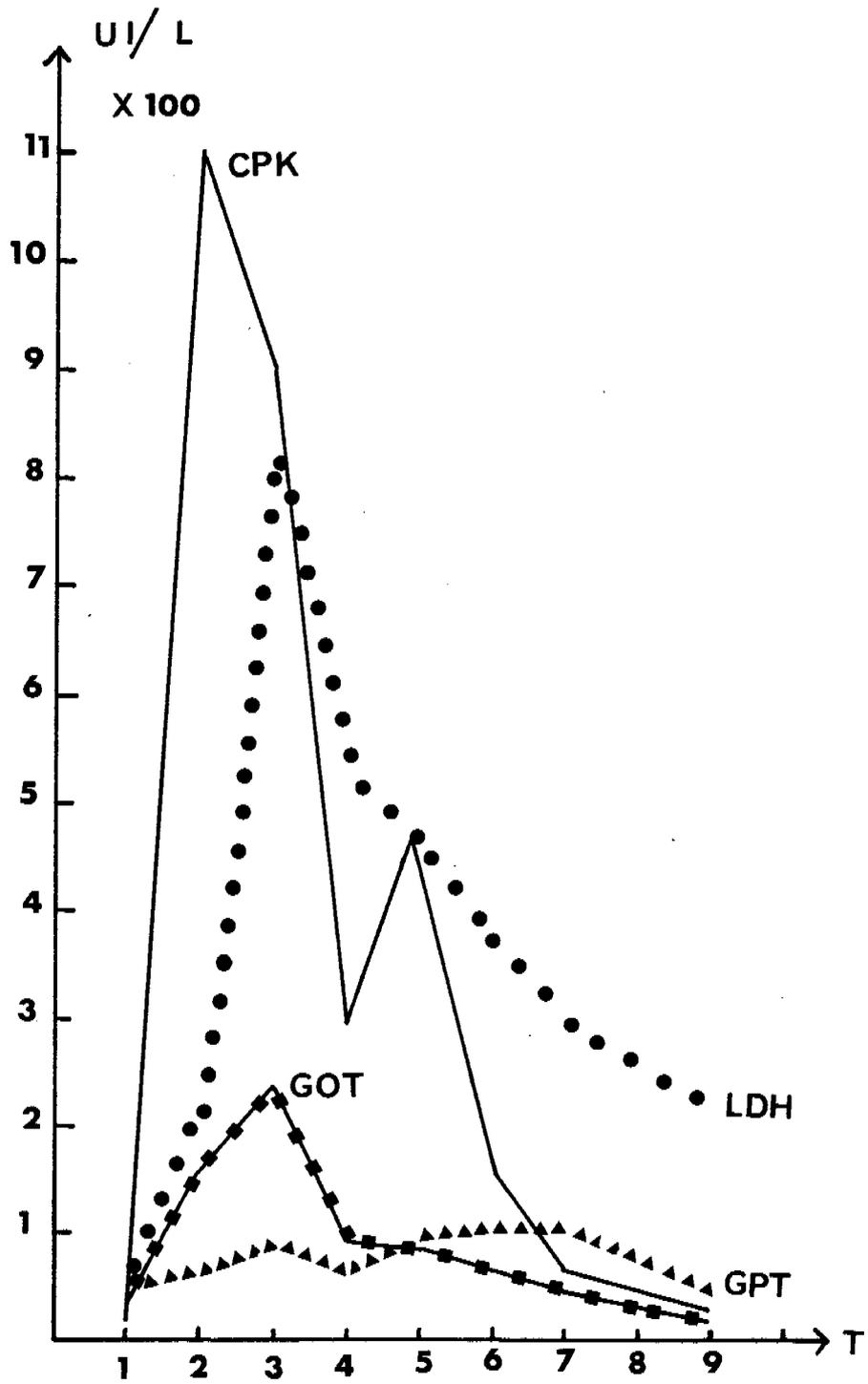
SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

CAS No 5

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Anna DA.	21.3.1982	32	38	47	21
	22.3.1982	158	60	217	1099
	23.3.1982	242	80	821	912
	24.3.1982	93	59	532	305
	25.3.1982	84	93	471	464
	26.3.1982	67	102	377	167
	27.3.1982	45	98	297	72
	29.3.1982	19	48	221	29

Panorama également complet et classique de l'évolution des enzymes cardiaques au cours de l'infarctus, avec des signes nets d'intoxication hépatique, la GPT étant souvent, et curieusement dès le début de l'observation, plus élevée que la GOT.

Nécrose antérieure étendue.



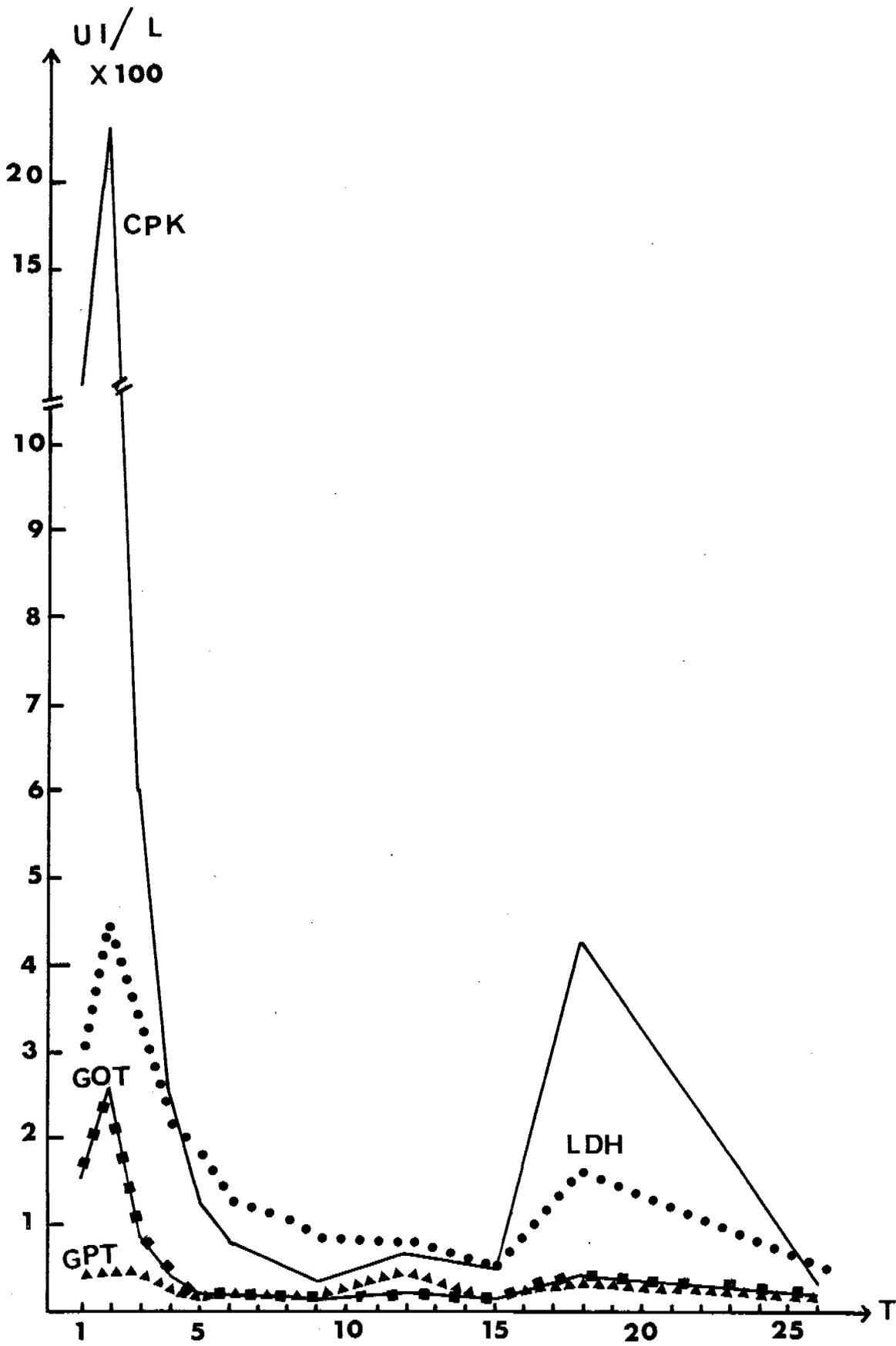
SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

CAS No 6

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Ramon LO.	5.7.1982	150	44	310	1240
	6.7.1982	265	44	459	2250
	7.7.1982	87	31	339	595
	8.7.1982	38	25	225	246
	9.7.1982	23	19	178	124
	10.7.1982	22	26	132	81
	12.7.1982	16	18	105	39
	13.7.1982	13	23	94	31
	16.7.1982	25	33	85	66
	19.7.1982	19	13	48	45
	22.7.1982	38	32	151	425
	30.7.1982	13	14	59	21

Panorama enzymatique compatible avec l'infarctus du myocarde. Bien que l'on ne saisisse pas le début de l'évolution, on assiste à l'acmé des activités des enzymes cardiaques et l'on peut aussi parfaitement discerner une récurrence au dix-huitième jour (22.7.1982). L'intoxication hépatique est ici très discrète.

Nécrose antérieure étendue sur un coeur déjà malade (antécédent de nécrose inférieure trois ans auparavant).



SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

CAS No 7

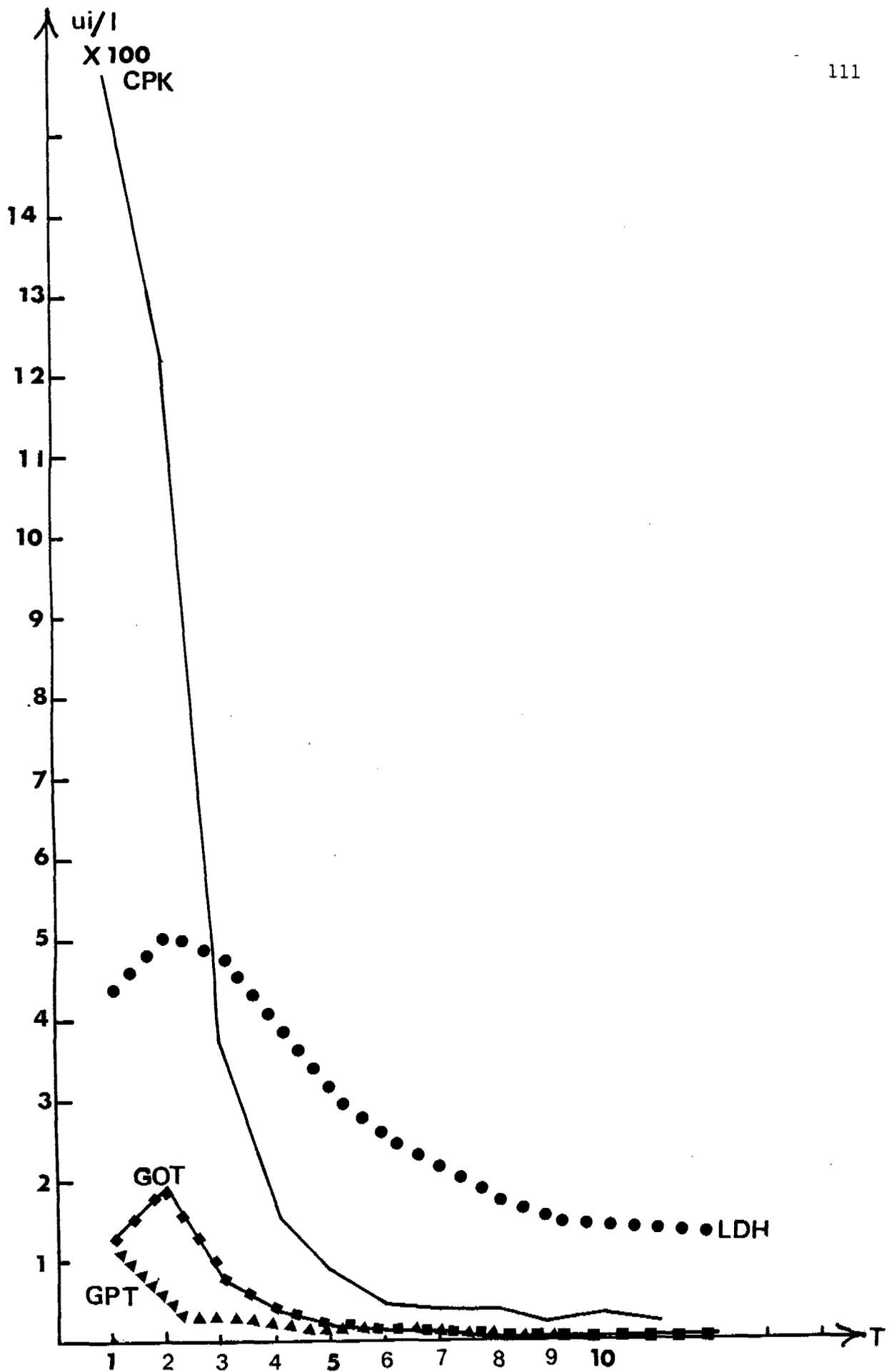
NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Albert LA	14.9.1982	125	120	433	1574
	15.9.1982	194	39	510	1221
	16.9.1982	79	28	478	375
	17.9.1982	34	22	398	157
	18.9.1992	21	16	312	89
	20.9.1982	12	14	255	68
	21.9.1982	12	13	222	52
	22.9.1982	9	11	185	34
	23.9.1982	8	9	158	35
	24.9.1982	10	11	137	26
	25.9.1982	9	10	131	29
	26.9.1982	9	10	129	25

Panorama enzymatique compatible avec l'infarctus du myocarde.

On n'observe que le flanc descendant du pic de la CPK. Par contre, les pics de la GOT et de la LDH, d'apparition classiquement plus tardive, sont plus complets, leurs sommets ayant pu être enregistrés. La GPT ne montre pas de signe de stase hépatique.

Accident le matin même.

Occlusion de l'interventriculaire antérieure avec nécrose antérieure étendue.



CAS N° 7

SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

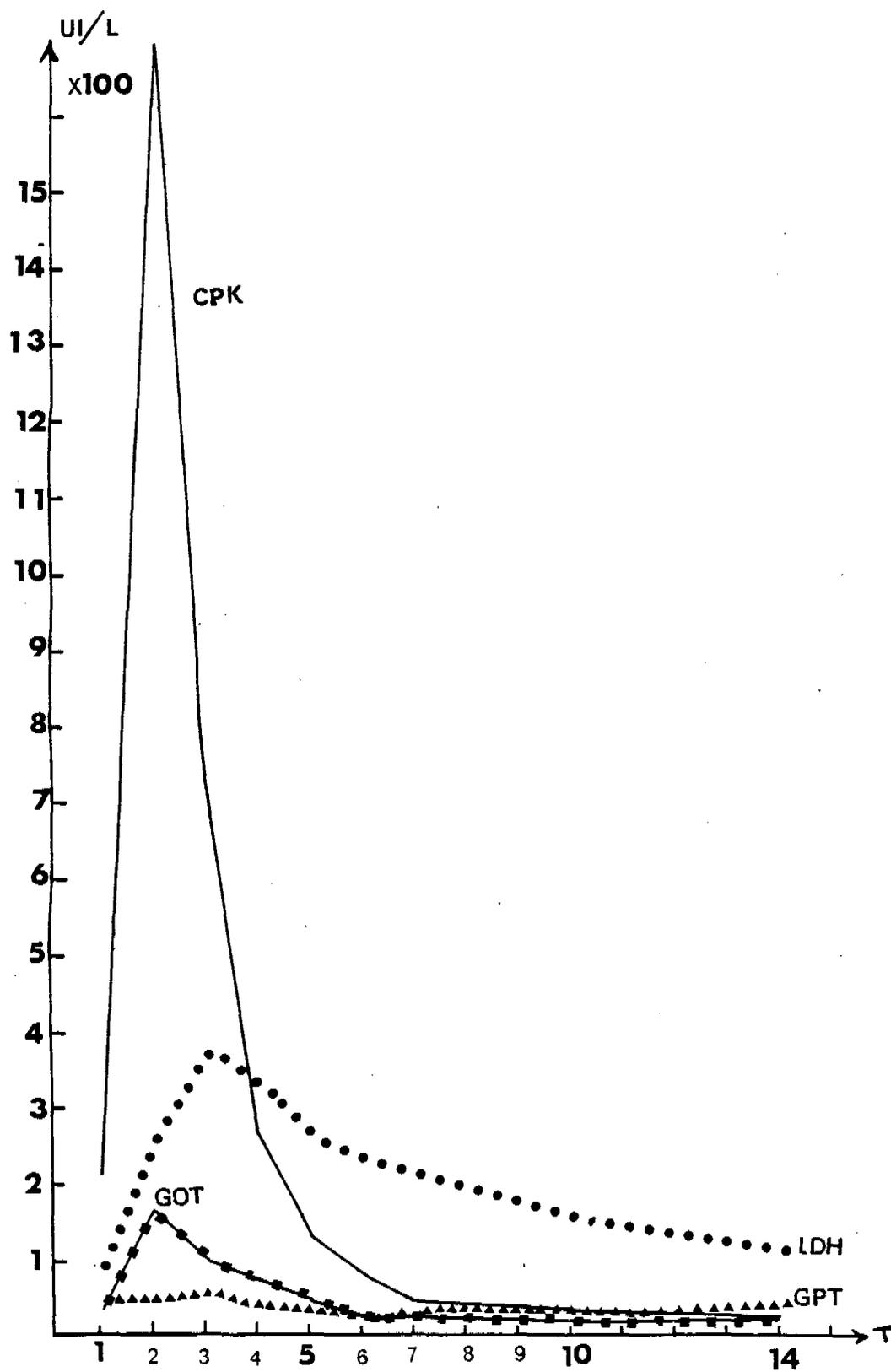
CAS No 8

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Georges M.	28.9.1982	30	34	89	210
	29.9.1982	169	40	259	1692
	30.9.1982	97	44	373	730
	1.10.1982	37	34	328	264
	2.10.1982	25	32	267	126
	3.10.1982	16	28	230	79
	4.10.1982	16	30	220	58
	7.10.1982	10	28	158	29
	11.10.1982	20	37	121	25

Panorama complet d'une poussée de nécrose myocardique unique. Les signes de stase hépatique sont très discrets.

Précordialgie irradiant dans le bras gauche.

Récidive de nécrose dans le territoire inférieur (en quatre mois d'intervalle).



SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

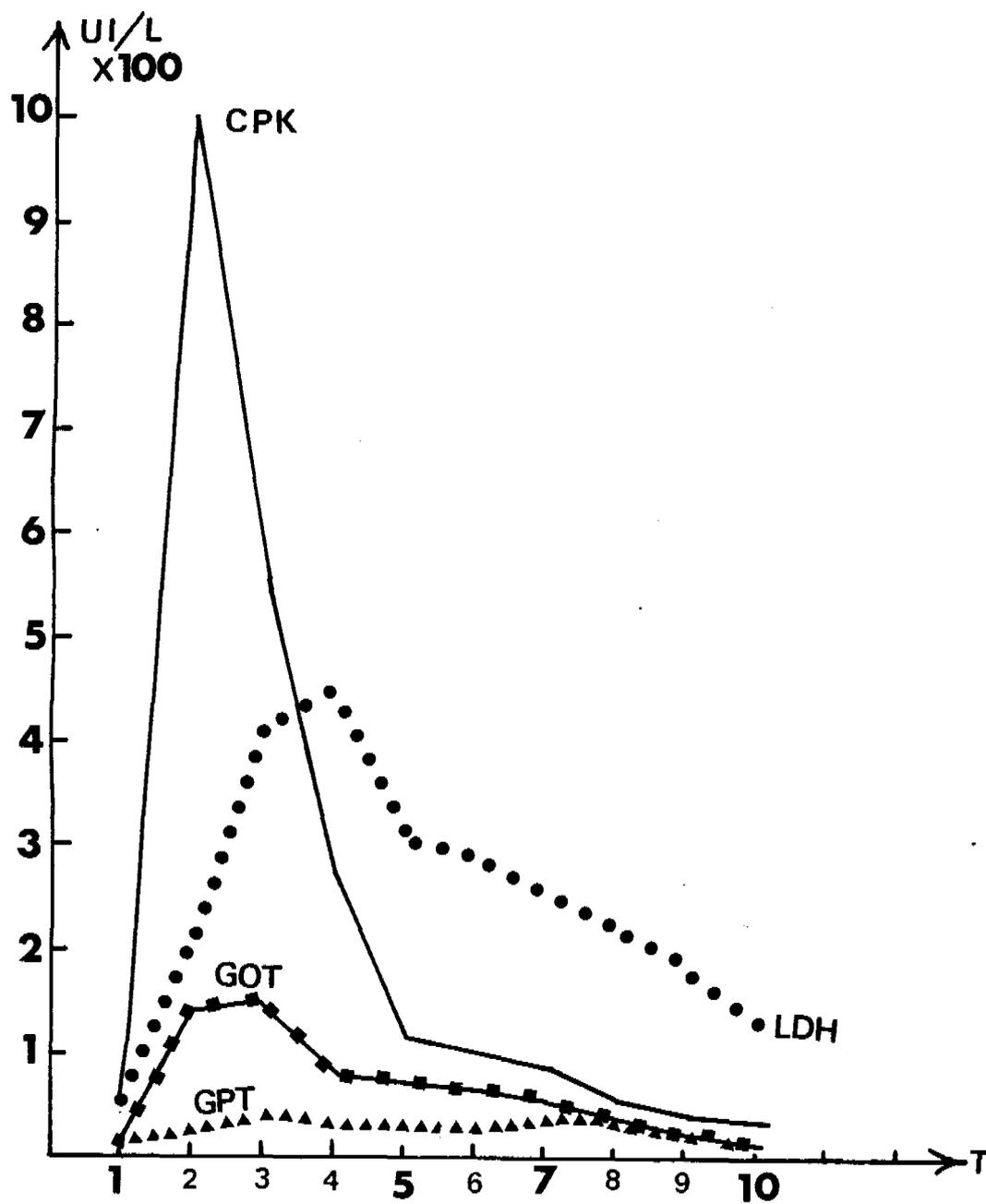
CAS No 9

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Pierre LET.	21.11.1982	13	10	66	62
	22 11 1982	133	24	199	995
	23.11.1982	138	36	412	552
	24.11.1982	79	32	450	273
	25.11.1982	37	23	303	116
	26.11.1982	27	25	289	77
	27.11.1982	24	27	256	62
	29.11.1982	15	20	172	47
	30.11.1982	13	17	121	31

Schéma tout à fait propédeutique d'une nécrose myocardique montrant le décalage entre les maximums des trois activités enzymatiques cardiaques : en tête la CPK, suivie de près par la GOT, alors que la LDH est franchement décalée. Par ailleurs, le retour à la normale de l'activité LDH est, de loin, le plus lent.

Dans le cas présent, les signes d'intoxication hépatique, fournis par la GPT, sont négligeables.

Le patient a présenté la veille une douleur thoracique en barre constrictive prolongée avec irradiations dans le dos et les deux bras. L'ECG montre une nécrose myocardique inférieure en  $V_4$   $V_5$ .



CAS N° 9

SERVICE DU PROFESSEUR TORRESANI

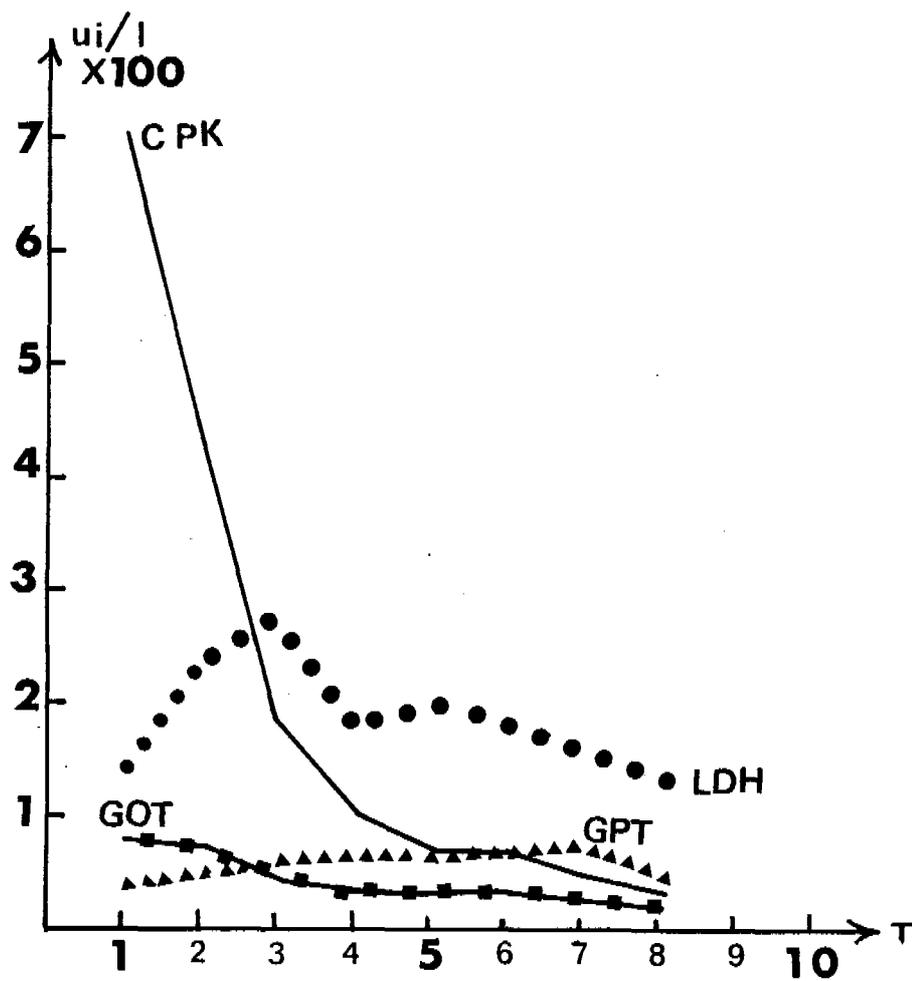
CAS No 10

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Boghos AD.	22.11.1982	81	29	141	698
	23.11.1982	77	32	227	436
	24.11.1982	53	46	274	186
	25.11.1982	35	46	179	94
	26.11.1982	32	50	190	66
	27.11.1982	31	53	178	59
	28.11.1982	27	65	160	45
	29.11.1982	20	39	133	28

Panorama enzymatique compatible avec l'infarctus du myocarde. Lorsqu'on compare les trois enzymes cardiaques, on peut bien observer le décalage des maximums entre CPK, GOT et LDH.

L'activité GPT, non négligeable, est en faveur d'une stase hépatique.

Précordialgie en barre à irradiations brachiale et cervicale apparue à l'effort avec séquelle de nécrose transmurale septale profonde.



CAS N° 10

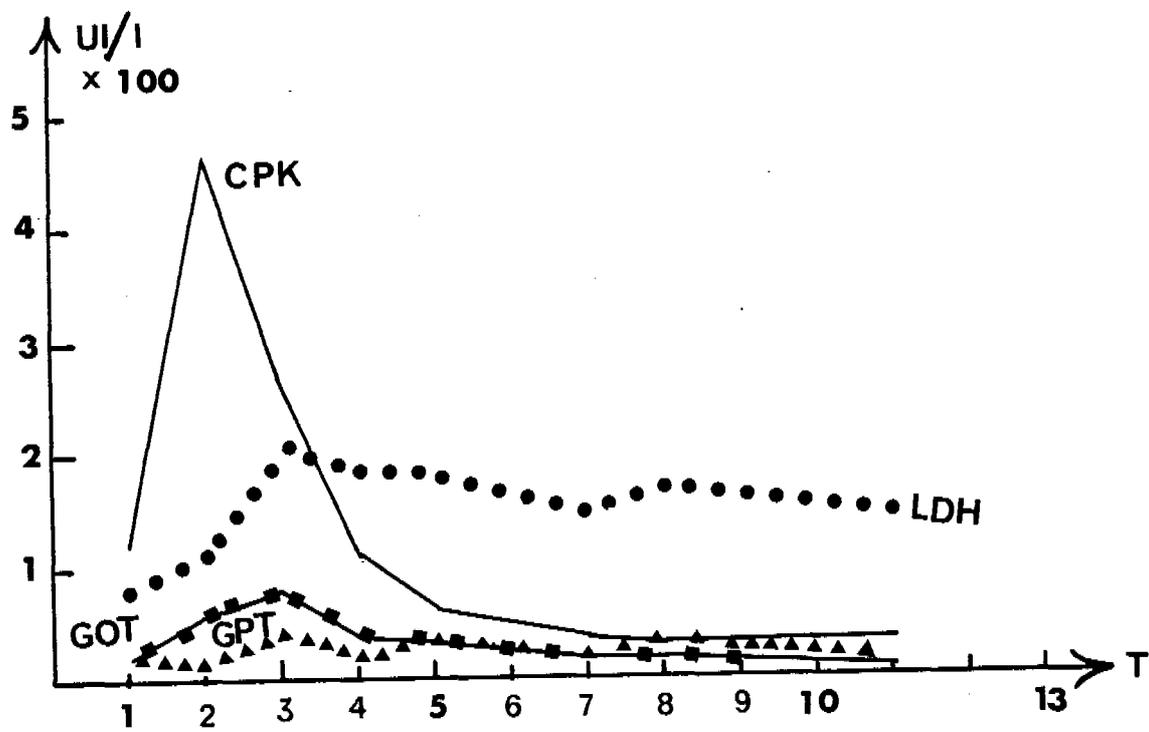
SERVICE DU PROFESSEUR LUCCIONI

CAS No 11

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Marcel P.	12.2.1982	20	19	77	116
	13.2.1982	65	7	113	472
	14.2.1982	86	35	200	270
	15.2.1982	37	25	196	108
	16.2.1982	29	28	182	66
	18.2.1982	17	29	144	42
	19.2.1982	17	27	171	40
	22.2.1982	13	22	139	32

Schéma classique d'une nécrose myocardique de faible étendue.

IDM chez un malade traité pour angor.



CAS N° 11

SERVICE DU PROFESSEUR LUCCIONI

CAS No 12

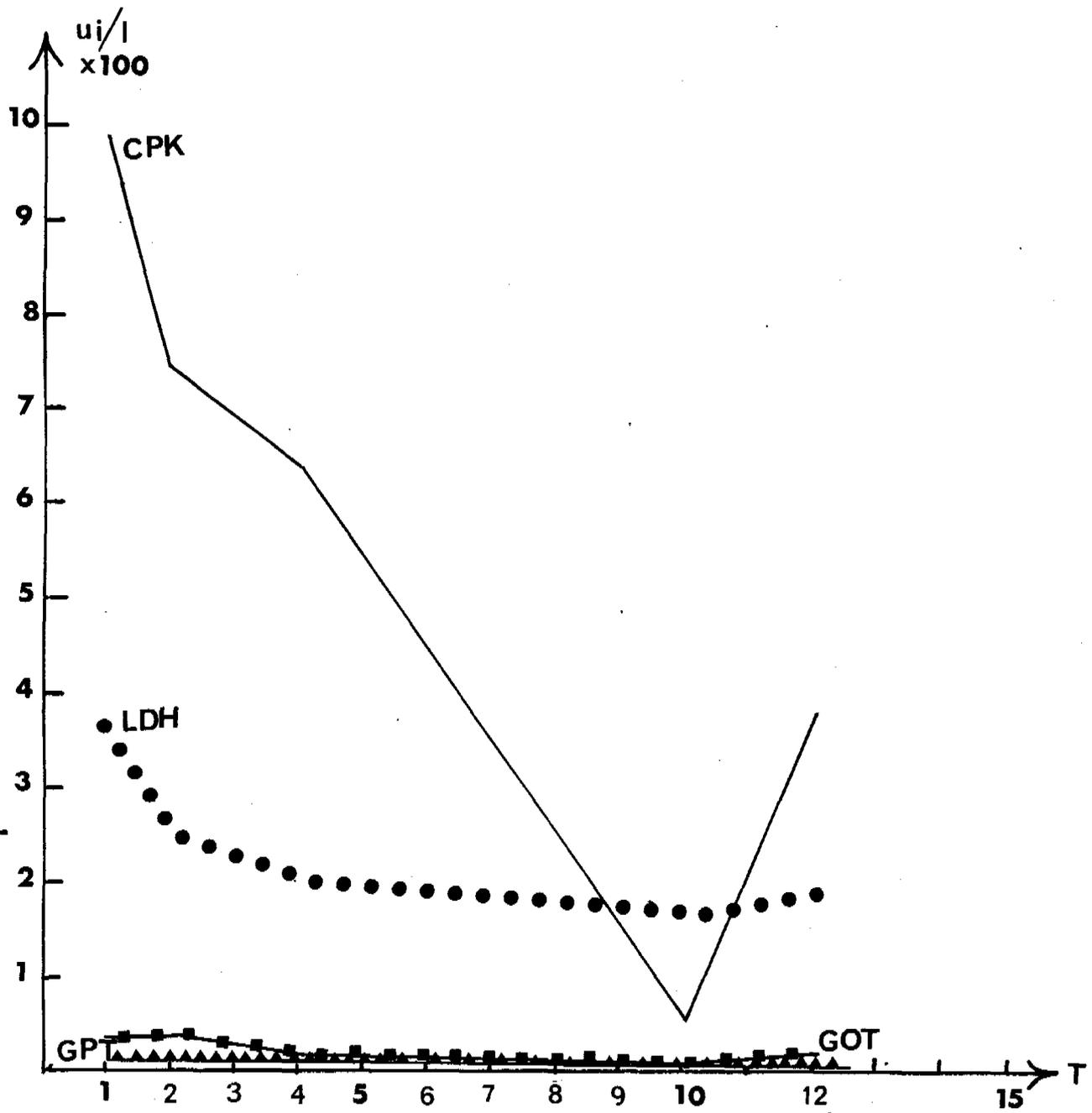
NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Madeleine Z.	16.2.1982	42	14	370	989
	17.2.1982	37	13	264	736
	19.2.1982	25	11	213	644
	25.2.1982	18	7	167	50
	27.2.1982	20	11	191	377
	3.3.1982	16	10	176	306

Panorama enzymatique assez déroutant : si la CPK et la LDH peuvent laisser croire à une nécrose myocardique, la GOT n'est manifestement pas en accord avec ce diagnostic.

Malade hypothyroïdienne.

Le 16.2.82 à 3h. du matin, existence d'une douleur de survenue nocturne au niveau de l'épaule droite, irradiant dans le haut du bras droit.

ECG = RAS.



CAS N° 12

SERVICE DU PROFESSEUR LUCCIONI

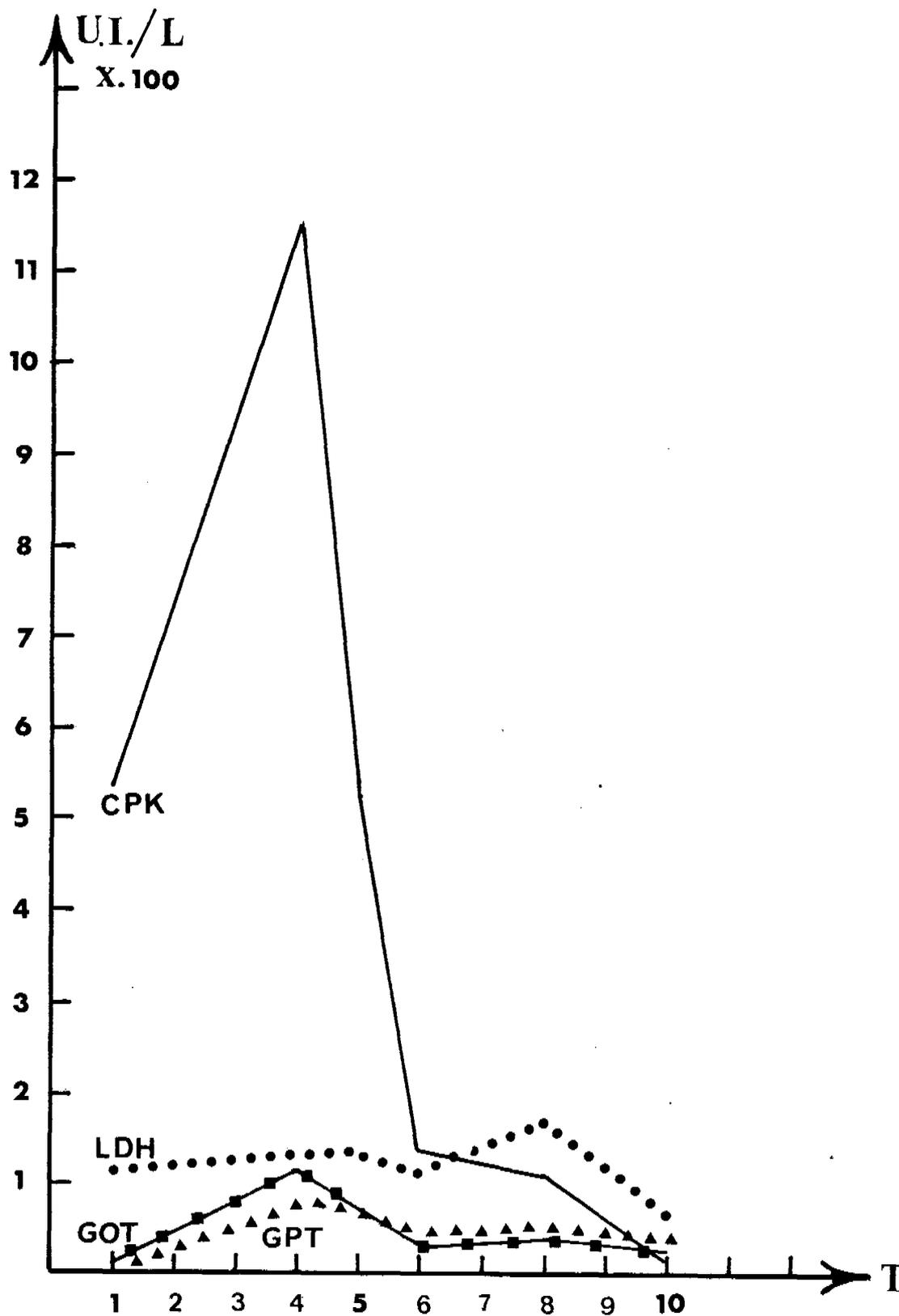
CAS No 13

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Pierre D.	17.2.1982	16	9	108	537
	20.2.1982	116	86	128	1156
	21.2.1982	70	71	129	537
	22.2.1982	38	52	114	142
	24.2.1982	42	56	174	105
	26.2.1982	31	45	67	29

Le sens de l'évolution des activités de la CPK, de la LDH et de la GOT s'accorde avec l'existence d'une nécrose myocardique, bien que, quantitativement, la LDH augmente assez peu.

La GPT montre des signes de stase hépatique.

Depuis le 18.2, signes électriques de nécrose sous-endocardique.



CAS N° 13

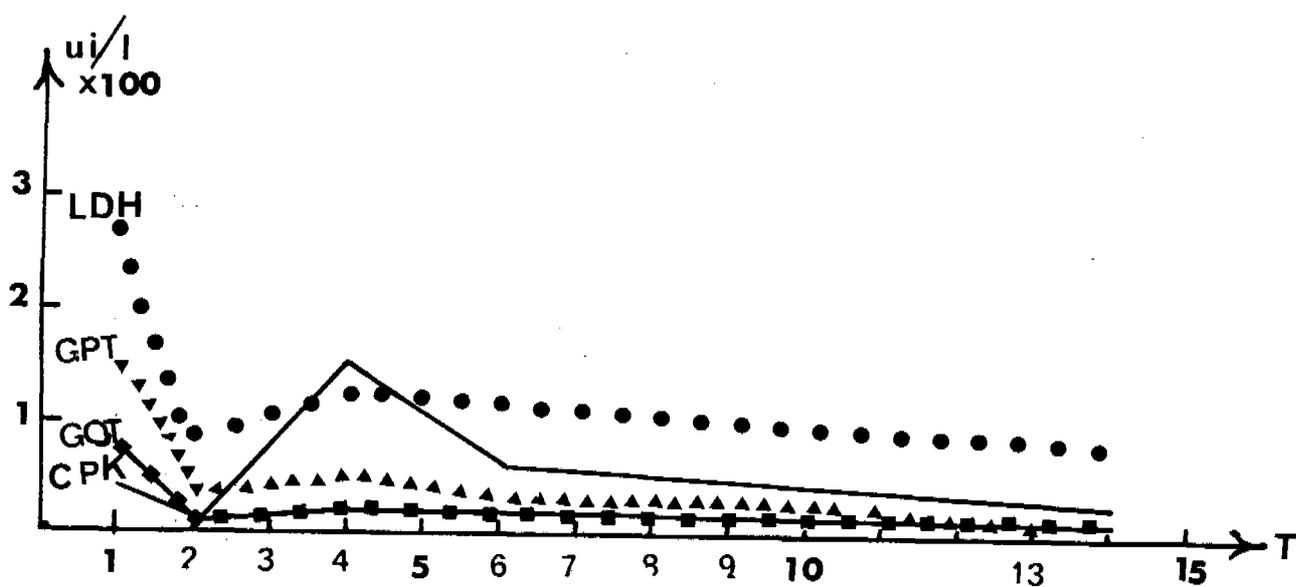
SERVICE DU PROFESSEUR LUCCIONI

CAS No 14

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Gabriel B.	4.7.1982	82	160	270	41
	5.7.1982	14	27	82	16
	7.7.1982	21	49	124	144
	9.7.1982	23	28	115	65
	17.7.1982	11	23	81	17

Panorama enzymatique apparemment sans rapport avec une nécrose myocardique (en particulier à cause du taux normal de la GOT).

Insuffisance cardiaque avec oedème aigu du poumon.



CAS N° 14

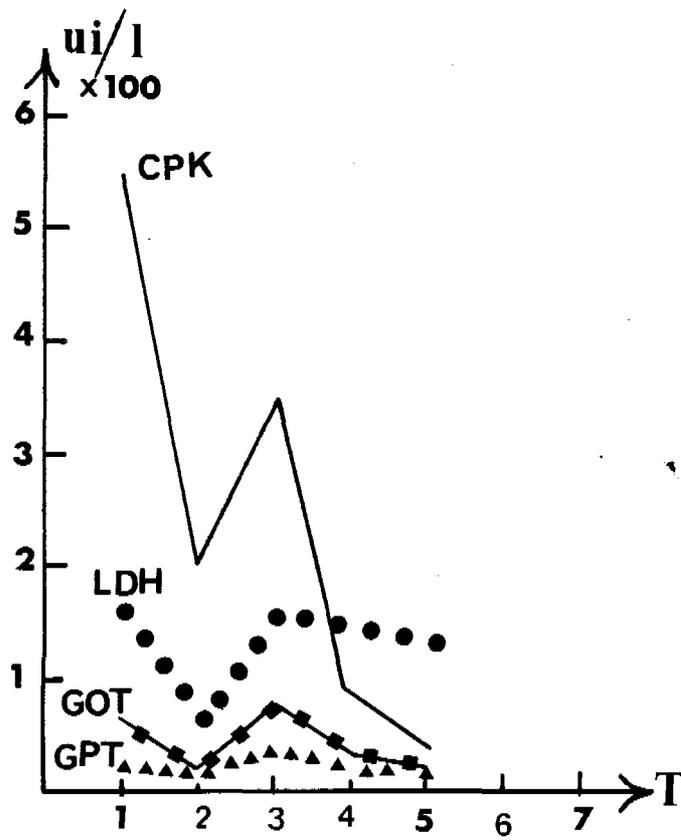
SERVICE DU PROFESSEUR LUCCIONI

CAS No 15

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Henri C.	26.7.1982	68	22	167	537
	27.7.1982	21	15	67	206
	28.7.1982	78	28	165	349
	29.7.1982	33	22	153	93
	30.7.1982	22	19	127	39

Signes nets d'une nécrose myocardique en évolution avec récurrence.  
Pas de complications hépatiques.

Nécrose antéro-septale.



CAS N° 15

SERVICE DU PROFESSEUR LUCCIONI

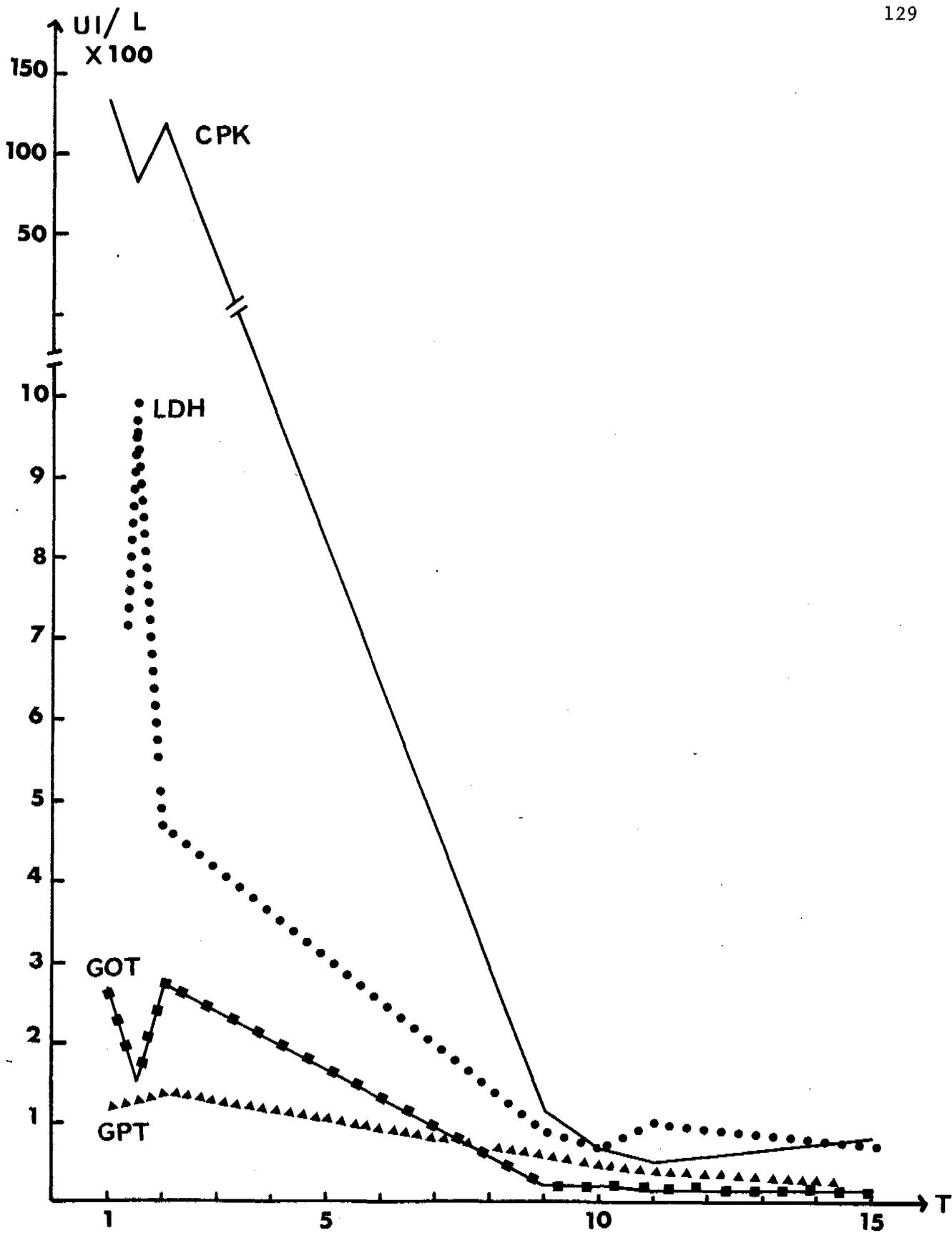
CAS No 16

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Marguerite N.	13.8.1982	263	113	514	13600
	13.8.1982	144	120	1000	8670
	14.8.1982	274	128	470	12000
	21.8.1982	22	59	87	118
	22.8.1982	15	43	67	73
	23.8.1982	14	32	94	59
	27.8.1982	11	14	71	74

Ce tableau pourrait correspondre à une nécrose myocardique massive avec récidence ; mais les valeurs considérables de la CPK paraissent tout à fait inhabituelles.

Malade hypertendue ayant présenté une paralysie flasque des quatre membres d'apparition rapide le 11.8.82.

L'étiologie semble être une hypokaliémie majeure ( $K^+ = 1,5$  mmol/l) probablement d'origine iatrogène (induite par diurétiques et laxatifs).



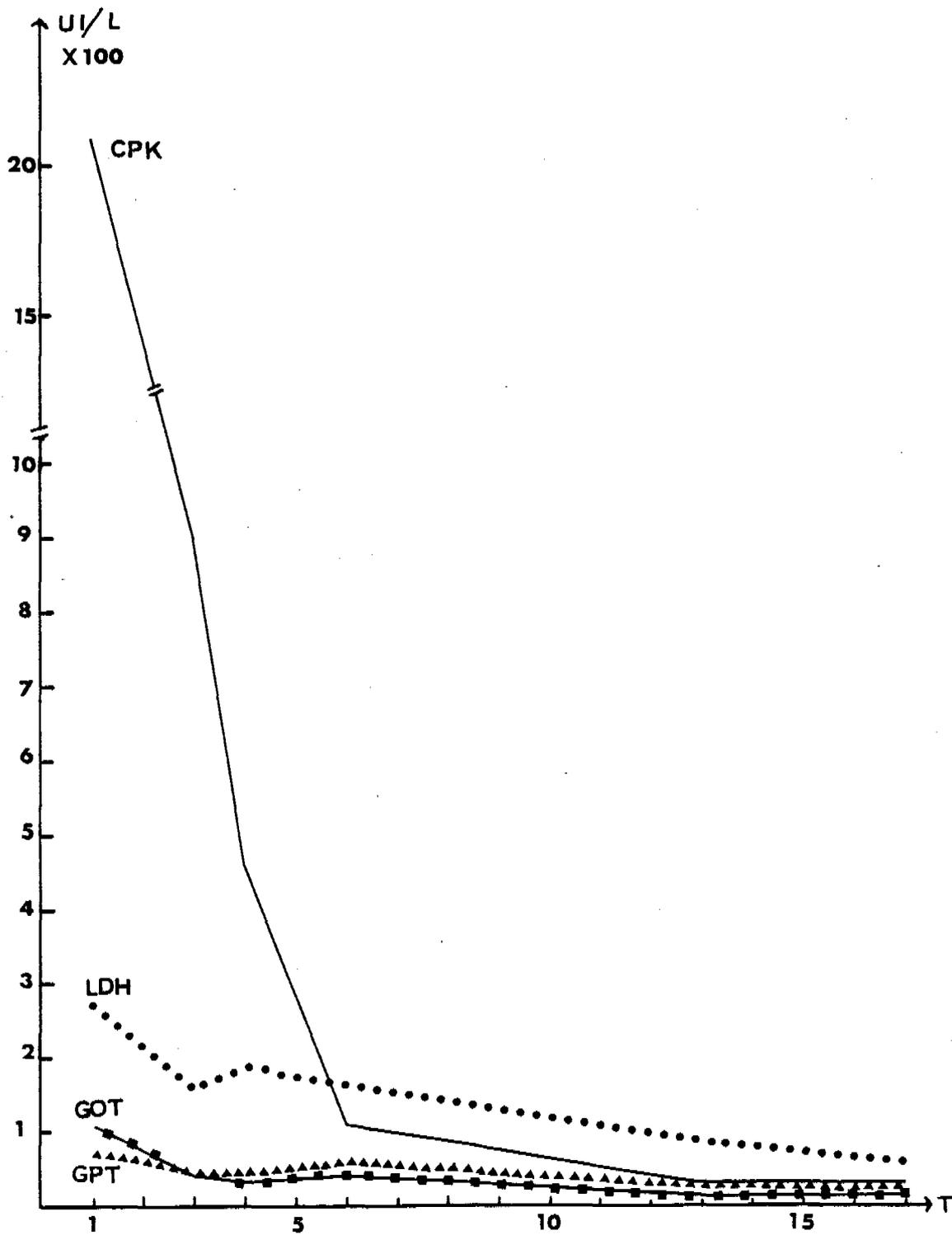
SERVICE DU PROFESSEUR LUCCIONI

CAS No 17

NOM	DATE	GOT	GPT	LDH	CPK
Laure L.	11.9.1982	110	67	274	2152
	13.9.1982	40	39	157	908
	14.9.1982	31	41	189	462
	16.9.1982	35	58	158	108
	23.9.1982	10	20	86	27
	25.9.1982	15	20	74	22
	27.9.1982	13	18	65	17

Panorama enzymatique compatible avec un infarctus du myocarde en voie de stabilisation.

Accident ischémique aigu du membre supérieur droit survenu à la suite d'un IDM postéro-inférieur passé cliniquement inaperçu.



## CONCLUSION

Le propos de ce travail a été l'étude de quelques dossiers de malades pour lesquels étaient demandés des dosages enzymatiques. Nous avons focalisé notre attention sur les trois enzymes "cardiaques" : CPK, LDH et GOT, ainsi que sur la GPT qui signe les complications hépatiques.

Nous avons voulu comparer les malades hospitalisés dans deux services qui nous ont paru caractéristiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires : un service de Cardiologie où l'on pouvait observer facilement des cas d'infarctus typiques et un service de Médecine Générale, à prédominance cardiologique, où, à côté d'infarctus authentiques, pouvaient se rencontrer des symptomatologies très variées.

Nous avons donc commencé par travailler au laboratoire en sélectionnant quelques dossiers de l'année 1982 où figuraient un nombre suffisant de dosages enzymatiques, permettant de suivre une évolution sur plusieurs jours et nous sommes allés enquêter ensuite dans deux services de médecine où les dossiers complets des malades ont été mis à notre disposition.

Les panoramas enzymatiques pouvant correspondre à l'infarctus du myocarde ont été les plus nombreux et, comme il fallait s'y attendre, on en a trouvé davantage dans le service de Cardiologie que dans le service de Médecine Générale. Six panoramas complets (N° 4, 5, 8, 9, 11 et 13) dont les quatre premiers en provenance du service de Cardiologie ont été dénombrés. Parmi eux, nous avons pu isoler un schéma que nous avons qualifié de propédeutique, tant il est en accord parfait avec les données classiques de la littérature (p.81), concernant

l'apparition échelonnée dans le temps des trois enzymes cardiaques dans le sang (n° 9).

Neuf panoramas incomplets ont été décrits (N° 1, 2, 3, 6, 7, 10, 15, 16, 17) les six premiers relevant du service de Cardiologie.

Enfin, deux dossiers du service de Médecine Générale (N° 12 et 14) nous sont apparus comme incompatibles avec l'infarctus du myocarde.

La consultation des dossiers dans les services de clinique nous a confirmés dans ce dernier point de vue. Le dossier n° 12 concerne une malade hypothyroïdienne dont l'électrocardiogramme était normal ; quant au dossier n°14, il porte le diagnostic d'insuffisance cardiaque avec oedème aigu du poumon.

Deux autres dossiers appartenant également au service de Médecine Générale et que nous n'avons pas formellement exclus des cas d'infarctus doivent être disjoints. Le dossier clinique du cas n° 16 fait état d'une paralysie flasque des quatre membres d'apparition rapide, attribuée à une hypokaliémie majeure ( $K^+ = 1,5$  mmol/l - valeurs normales : 3,5 à 5,0 mmol/l) faisant probablement suite à un surdosage de diurétiques et de laxatifs ; c'est cette atteinte générale des muscles squelettiques qui expliquerait le niveau extraordinairement élevé observé pour la CPK, fait que nous avons signalé dans les commentaires joints au tableau des résultats. Quant au cas n° 17, son dossier clinique fait état d'un accident ischémique aigu du membre supérieur droit, survenu à la suite d'un infarctus du myocarde postéro-inférieur passé cliniquement inaperçu ; l'issue sera l'amputation du membre.

Tous les autres dossiers, comprenant l'intégralité de ceux du service de Cardiologie, portaient le diagnostic d'infarctus du myocarde, confirmé en particulier par les données de l'électrocardiogramme.

Ainsi, dans treize cas sur quinze, incluant les dix cas du service de Cardiologie, le diagnostic d'infarctus du myocarde était évident à la seule vue des panoramas enzymatiques. Pour le service de Méde-

# BIBLIOGRAPHIE

---

CK, R.V. ; DAYHOFF, M.O. : Atlas of Protein Sequence and Structure,  
NBRF, Washington, 1972.

AUBRY, J.P. ; AULAGNER, G. and All. : Contrôle de qualité des examens  
de laboratoire. Journées Nationales de Biologie.  
Lyon 5-6-7 - Novembre 1971.  
SIMEP Edition, Villeurbanne, 1972.

KRUH, J. : Biochimie : Etudes Médicales et Biologiques - Hermann Ed.  
2° Ed., Paris, 1973.

## MEMOIRES ORIGINAUX

COODLEY, E.L. : Am. J. Med. Sci. ; 256, 300, 1968.

WROBLEWSKI, F. ; LADUE, J.S. : Lactico Dehydrogenase Activity in Blood.  
Proces. Soc. Expl. Biol. Med. 90 ; 210-213 ; 1955.

ELLIOT, A. ; WILKINSON, J.H. : Serum  $\alpha$  Hydroxybutyric Dehydrogenase  
in Myocardial Infartion and in Liver damage ;  
The Lancet ; 1961, 698-699.

ROSALKI, S.B. : J. Lab. and Clin. Med. 1967, 69, 696.

SWANSON, J. ; WILKINSON, J.H. : St. Meth. of Clin. Chem. ; 1970 ; 7 ; 33.

WILKINSON, J.H. ; STECIN, B. : Clin. Chem. ; 1970 ; 16 ; 370.

WARREN, W.A. : Clin. Chem. ; 1972 ; 18 ; 473.

HENLEY, K.S. ; POLLARD, H.M. ; A new method of the determination of  
glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase in plasma.  
J. Lab. Clin. Med. 46, 786, 1955.

WROBLEWSKI, F. : The clinical significance of transaminase activities  
of serum. Am. J. Med. ; 27 ; 911 ; 1959.

WROBLESKI, F. and LADUE, J.S. : Serum pyruvic transaminase in cardiac  
and hepatic desease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91 ; 569 ; 1956.

ELLIS, G. ; GOLBERG, D.M. : Serum  $\alpha$  hydroxybutyric dehydrogenase activity.  
Am. J. Clin. Path. 56 ; 627 ; 1971.

ROSALKI, S.B. ; WILKINSON, J.H. : Serum  $\alpha$  hydroxybutyric dehydrogenase.  
JAMA, 189 ; 61 ; 1964.

KARMEN, A. ; WROBLEWSKI, F. ; LADUE, J. : Transaminase Activity in human blood. J. Clin. Invest. ; 34 ; 126 ; 1955.

WROBLEWSKI, F. ; Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction - Science - 120, 479, 1954.

DREYFUS, J.C. ; SHAPIRA, G. et coll. : Etude de la créatine phosphokinase sérique chez les myopathes et leurs familles. Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 5, 384, 1960.

ROE, C.R. ; LIMBIRD, L.E. ; WAGNER, G.S. ; NERENBERG, S.T. : Combined isoenzyme analysis in the diagnosis of myocardial injury : Application of electrophoretic methods for the detection and quantitation of the creatine phosphokinase MB isoenzyme. J. Lab. Clin. Med. 80, 577, 1972.

FORSTER, G. ; ESCHER, J. : Die Kreatinine Phosphokinase in der Diagnostic von Herzinfarkt und Myopathien - Helv. Med. Acta. 28, 513, 1961.

AMADOR, E. ; DORFMAN, L.E. ; WACKER, W. E.C. : Serum lactic dehydrogenase activity : An analytical assessment of current assays. Clin. Chem. 9, 391, 1963.

MAC DONALD, R.P. ; SIMPSON, J.R. ; NOSSAL, E. : Serum lactic dehydrogenase - A diagnostic aid in myocardial infarction. JAMA, 165, 35, 1957

THIERS, R.E. ; VALLEE, B.L. : Analytical consideration in serum enzyme Determination Am. N.Y. Acad. Sci. 75, 214, 1958.

WACKER, W.E.C. ; ULMER, D.D. ; VALLEE, B.L. : Metalloenzymes and Myocardial infarction. New. Eng. J. Med. 225, 449, 1956.

WACKER, W.E.C. ; SNODGRASS, P.J. : Serum LDH activity in pulmonary embolism diagnosis. JAMA, 174, 2142, 1960.

WACKER, W.E.C. ; ROSENTHAL, M. ; SNODGRASS, P.J. ; AMADOR, E. : A triad for the diagnosis of pulmonary embolism and infarction. JAMA, 178, 8, 1961.

WROBLEWSKI, F. : The significance of alteration in LDH activity of body fluids in the diagnosis of malignant tumors. Cancer, 12, 27, 1959.

Mme DIALLO AMINATA SIDIBE : Bilan lipidique et atherosclerose. Mem. Pharm. Bamako, 1981.

JAMES, G.P. ; HARRISON, R.L. : Creatine kinase isoenzymes of mitochondrial origin in human serum. Clin. Chem. 6, 25, 943-947, 1979

USATEGUI-GOMEZ, M. ; WICKS, R.W. ; FARRENKOPF, B.F. ; HAGER, H. ;  
WARSHAW, M. : Immunochemical determination of CK-MB isoenzyme in human serum : A radiometric approach. Clin. Chem. 6, 27, 823-827, 1981.

BURLINA, A. : Improved electrophoretic separation of creatine kinase isoenzyme. Clin. Chem. 2, 26, 317-320, 1980.

DREYFUS, J. Cl. ; SCHAPIRA, G. ; RESNAIS, J. ; SCEBAT, L. ; ALEXANDRE, Y. :  
la creatine-kinase sérique dans le diagnostic de l'infarctus myocardique.  
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol. 5, 386-387, 1960.

