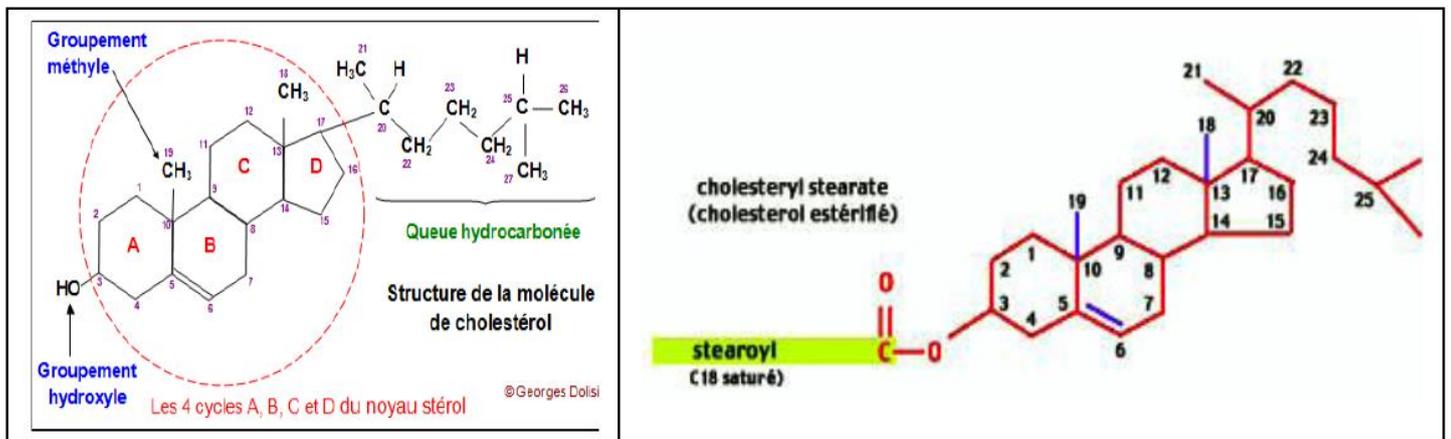




**Dosage de l'activité enzymatique**

**Sujet :**

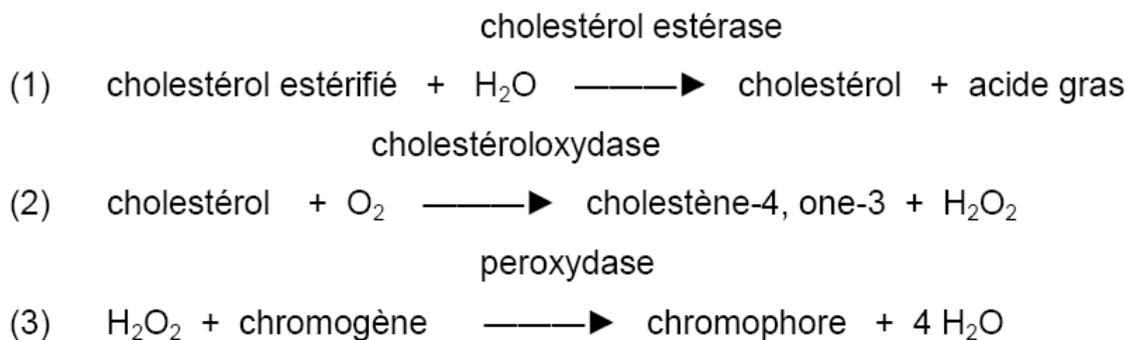
Le cholestérol (**figure 1**) est une graisse apportée pour un quart par l'alimentation et aux trois quart fabriquée par le foie. Lorsque les taux sont normaux, le cholestérol assure la protection de nos artères. Il y a un seul cholestérol mais deux systèmes de transport du cholestérol dans le sang. Les HDL (High Density Lipoproteins), connues sous le nom de "bon cholestérol", récupèrent le cholestérol en excès et le ramènent au foie où il est transformé avant d'être éliminé. Les LDL (Low Density Lipoproteins), transportent le cholestérol du foie vers toutes les cellules. Quand cette belle machine se dérègle, les LDL-cholestérols s'accumulent et peuvent contribuer à la formation des plaques qui peu à peu bouchent les artères.



**Figure 1.** La molécule de cholestérol

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

Les réactions intervenant sont les suivantes :



L'absorbance du chromophore est mesurée à 505 nm

**1- Comment appelle t'on la réaction (1) et (3) ? Justifier**

2- **Déduire** à partir des équations précédentes les composés contenus dans la solution réactionnelle ou « réactifs » indispensables au déroulement des réactions ?

3- **Donner** les conditions nécessaires pour que la totalité du substrat soit dosée ?

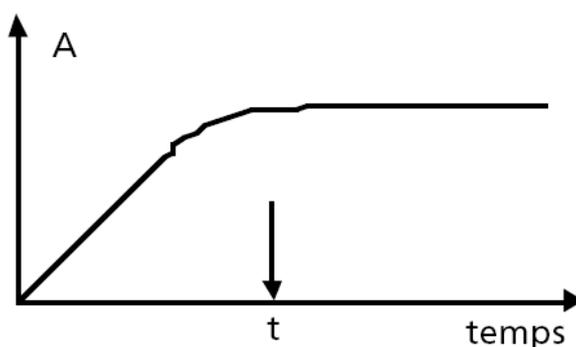
4- **Expliquer** pourquoi la préparation par dissolution des réactifs contenant les enzymes est effectuée en milieu tamponné ?

## II. Etalonnage du spectrophotomètre

1- La concentration de la solution mère en cholestérol est de  $0,517 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

Calculer la masse de cholestérol à peser afin de préparer 1000 mL de cette solution mère.

2- Le graphe ci-dessous représente l'allure de la courbe absorbance (A) = f(temps). La flèche indique le temps correspondant à la mesure de l'absorbance.



2. 1. Que peut-on dire de l'absorbance au voisinage de ce temps ?

2. 2. Ce temps doit-il être exactement respecté ? Justifier la réponse.

### 3. Dosage du cholestérol sérique :

Les Étapes réactionnelles sont indiquées sous dessus. Le protocole opératoire et les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

	Essai 1	Essai 2	témoin réactif
Sérum ( $\mu\text{L}$ )	20	20	
réactif enzymatique (mL)	2	2	2
$A_{505 \text{ nm}}$	0,204	0,204	0

3-1- À partir d'une formule littérale, **calculer la concentration molaire du cholestérol** dans le milieu réactionnel ?

#### Données :

-  $\epsilon$  du chromophore à 505 nm =  $7,3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

- une mole de chromophore correspond à une mole de cholestérol.

**Masse molaire du cholestérol =  $386 \text{ g.mol}^{-1}$**

## Correction

### I.

#### 1- Nom de chaque réaction avec justification :

<u>Réaction (1)</u>	Réaction principale	C'est une réaction qui fait intervenir le <b>substrat à doser</b> (cholestérol)
<u>Réaction (3)</u>	Réaction indicatrice	Réaction qui fait intervenir un <b>chromophore</b> possédant un spectre d'absorption à $\lambda = 505 \text{ nm}$

#### 2. Les « réactifs » indispensables au déroulement des réactions :

- Composition quantitative de la solution réactionnelle : solution tamponnée d'enzymes (cholestérol estérase, cholestérol oxydase, peroxydase) et de chromogène réduit + Cholestérol.

#### 3. Les conditions nécessaires pour un dosage total de substrat :

- ✓ [S] à doser : facteur limitant
- ✓ [E] en grande quantité pour que la réaction soit totale rapidement
- ✓ PH optimal
- ✓ Température optimale (influence la durée de la réaction)
- ✓ Temps de contact : long pour que la réaction soit totale.

4. La préparation par dissolution des réactifs contenant **les enzymes** est effectuée en **milieu tamponné** parce que l'activité enzymatique est fonction du pH. **Le milieu est tamponné pour prévenir toute variation de pH** car une faible variation de pH entraîne une incertitude du résultat.

### II.

#### 1. La masse de cholestérol à peser:

$$n = \frac{m}{M} \rightarrow m = n \times M \dots \dots (1)$$

$$n = ?$$

$$n = C \times V$$

$$= 0,517 \times 10^{-3} \times 1000 * 10^{-3}$$

$$n = 0,517 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

$$(1) \rightarrow m = n \times M = 0,517 \times 10^{-3} \times 386$$

$$\mathbf{m = 0,199 \text{ g}}$$

2. 1. Au voisinage de ce temps **l'absorbance du chromophore étant maximale.**

2. 2. Non  $\rightarrow$  parce que dans le « dosage en point final » ce qui est important c'est que **la réaction doit terminer** pour doser le substrat (ce qui est difficile à savoir, parce que on ne sait pas exactement quand est ce que la réaction sera finie), mais la chose connue c'est que le temps de contact entre l'enzyme et substrat doit être long pour que la réaction soit totale (généralement entre 30 min  $\rightarrow$  2 h).

### 3. Dosage du cholestérol sérique :

Calcul de la concentration molaire du cholestérol dans le milieu réactionnel

- Selon la loi de Beer Lambert :

$$A = \epsilon.l.CMR$$

MR : milieu réactionnel.

$$C_{essai} = \frac{A_{essai}}{\epsilon.l} \times \frac{V_{MR}}{V_{essai}}$$

Or :

$$A_{essai (505 \text{ nm})} = 0,204.$$

$$\epsilon \text{ du chromophore à } 505 \text{ nm} = 7,3.10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$l = 1 \text{ cm.}$$

$$V_{MR} = 2 \text{ mL}$$

$$V_{essai} = \text{prise d'essai (pE)} = 20 \mu\text{l.}$$

Donc : application numérique :

$$C_{essai} = \frac{0,204}{7,3.10^3 . 1} \times \frac{2 \times 10^{-3}}{20 \times 10^{-6}}$$

$$C_{essai} = 0,00279 \text{ mol/L}$$