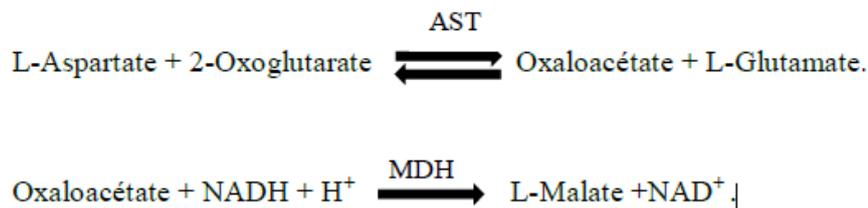


TP-4 Dosages biochimiques - ALAT/ASAT

1) Dosage d'ASAT : L'AST est répandue dans tous les tissus du corps, mais la plus forte activité est mesurée dans le foie, le cœur, les muscles squelettiques et dans les érythrocytes. Dans la peau, les reins et le pancréas, on mesure une activité plus faible. Bien que l'activité de l'AST et de l'ALT dans le sérum soient augmentée dans tous les cas où l'intégrité des cellules hépatiques est atteinte (hépatite virale, nécrose hépatique, cirrhose), une augmentation de l'activité AST dans le sérum ou le plasma apparaît dans 97% des cas après un infarctus du myocarde. Une activité AST élevée (et occasionnellement ALT) peut être rencontrée dans des cas de dystrophie musculaire progressive, embolie pulmonaire, pancréatite aiguë.

PRINCIPE : La détermination quantitative de ASAT se fait selon la méthode de l'IFCC (2002) en suivant la réaction suivante : La diminution de l'absorbance proportionnelle à l'activité AST dans le spécimen, est mesurée à 340 nm



MODE OPERATOIRE : Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Introduire dans une cuve de lecture de 1 cm de trajet optique (thermostatée à 37°C) :	
Réactif 1	1000 µL
Laisser la température s'équilibrer à 37°C puis ajouter :	
Calibrateur, Contrôle ou Spécimen	100 µL
Mélanger. Après 60 sec, lire l'absorbance initiale à 340 nm puis toutes les 60 sec pendant 180 sec.	
Mesurer la moyenne des variations d'absorbance par minute (□Abs/min).	

REACTIFS

R1	AST (TGO) IFCC	Réactif 1
EDTA		5 mmol/L
2-Oxoglutarate		12 mmol/L
L-Aspartate		200 mmol/L
MDH		495 U/L
LDH		820 U/L
NADH		≤ 0,18 mmol/L
Tampon Tris		80 mmol/L
pH à 30°C		7,80 ± 0.1

CALCUL

Avec Multicalibrateur sérique :

$$\text{Activité AST} = \frac{(\Delta\text{Abs/min}) \text{ Dosage}}{(\Delta\text{Abs/min}) \text{ Calibrant}} \times \text{Activité du Calibrant}$$

Avec facteur théorique :

$$\text{Activité en U/L} = \Delta\text{Abs/min} \times \text{Facteur}$$

$$\text{Facteur} = \frac{\text{VR} \times 1000}{6.3 \times \text{VE} \times \text{P}}$$

Où:

VR = Volume réactionnel total en mL

VE = Volume Echantillon en mL

6.3 = Coefficient d'extinction molaire du NADH à 340nm

P = Trajet optique en cm.

Exemple en technique manuelle.

(1 cm de trajet optique, à 37°C, 340 nm):

$$\text{U/L} = (\Delta\text{Abs/min}) \times 1746$$

$$\mu\text{Kat/L} = \frac{\text{U/L}}{60}$$

2) Dosage d'ALT : L'ALT est très largement répandue dans les tissus hépatiques et rénaux, et dans une moindre mesure dans le muscle squelettique et cardiaque. Bien que l'activité ALT et AST augmentent dans le sérum quel que soit l'atteinte des cellules hépatiques, l'ALT est l'enzyme la plus spécifique. Une augmentation importante de l'activité ALT dans le sérum ou le plasma est rarement observée dans d'autres conditions qu'une atteinte hépatique (cirrhose, carcinome, hépatite, ictère par obstruction biliaire ou congestion hépatique).

PRINCIPE : Méthode développée par Wroblewski et La Due, optimisée par Henry et Bergmeyer (conforme aux recommandations de l'IFCC). La diminution de l'absorbance proportionnelle à l'activité ALT dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. Le schéma réactionnel est le suivant :



MODE OPERATOIRE : Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Introduire dans une cuve de lecture de 1 cm de trajet optique (thermostatée à 37°C) :	
Réactif 1	1000 µL
Laisser la température s'équilibrer à 37°C puis ajouter :	
Calibrateur, Contrôle ou Spécimen	100 µL
Mélanger. Après 60 sec, lire l'absorbance initiale à 340 nm puis toutes les 60 sec pendant 180 sec.	
Mesurer la moyenne des variations d'absorbance par minute (□Abs/min).	

▲ REACTIFS

R1	ALT (TGP) IFCC	Réactif 1
2-Oxoglutarate		15 <u>mmol/L</u>
L-Alanine		500 <u>mmol/L</u>
LDH		≥ 1600 <u>U/L</u>
NADH		≤ 0,18 <u>mmol/L</u>
Tampon Tris		100 <u>mmol/L</u>
pH à 30°C		7,50 ± 0.1

CALCUL

Avec Multicalibrateur sérique :

$$\text{Activité AST} = \frac{(\Delta\text{Abs/min}) \text{ Dosage}}{(\Delta\text{Abs/min}) \text{ Calibrant}} \times \text{Activité du Calibrant}$$

Avec facteur théorique :

$$\text{Activité en U/L} = \Delta\text{Abs/min} \times \text{Facteur}$$

$$\text{Facteur} = \frac{\text{VR} \times 1000}{6.3 \times \text{VE} \times \text{P}}$$

Où:

VR = Volume réactionnel total en mL

VE = Volume Echantillon en mL

6.3 = Coefficient d'extinction molaire du NADH à 340nm

P = Trajet optique en cm.

Exemple en technique manuelle.

(1 cm de trajet optique, à 37°C, 340 nm):

$$\text{U/L} = (\Delta\text{Abs/min}) \times 1746$$

$$\mu\text{Kat/L} = \frac{\text{U/L}}{60}$$