

Mesure de l'activité enzymatique

DR AKSAS

Mesure de l'activité enzymatique

- Il est difficile de mesurer la quantité d'enzyme en unités de masse ou de concentration molaire (quantité trop faible et problème de purification);
- l'activité enzymatique est défini en terme de vitesse de réaction (la V étant directement proportionnelle à la quantité d'enzyme).

Mesure de l'activité enzymatique

Cette mesure consiste à évaluer la **Q** de **S**
transformé ou de **P apparu** par **unité de**
temps dans des **conditions opératoires bien**
déterminées.

Mesure de l'activité enzymatique

- *L'activité d'une enzyme se mesure :*

1. Soit par la vitesse de disparition d'un substrat.
2. Soit par la vitesse d'apparition d'un produit.
3. Soit par la vitesse d'utilisation d'un cofacteur.

Méthodes de mesure

2 Méthodes

- Méthode en point final ou « **à deux points** »
- Méthodes **cinétiques**:
 1. Colorimétriques
 2. UV : - directes;
- couplées

Mesure de l'activité enzymatique

- Si nous nous plaçons dans des conditions expérimentales où $[S]_0 \gg [E]$ et $[S]_0 \gg K$
- la vitesse mesurée est la vitesse maximum et elle est proportionnelle à la concentration totale d'enzyme .
- C'est donc une méthode qui peut être utilisée pour doser la concentration et par suite la quantité d'enzyme présente dans la solution.

Conditions opératoires

Conditions qui permettent d'avoir une *vitesse constante et maximale*

- a) Milieu tamponné pour éviter toute variation du pH_0 et déterminer la force ionique. Vérifier que le tampon ne contient pas d'inhibiteurs.
- b) Milieu thermostaté pour stabiliser la température optimale
- c) Choix du substrat (gde affinité) et concentration saturante $[\text{S}] = 10 \text{ Km}$ (pour atteindre la V_{max})
- d) Ajout d'activateurs ou de coenzymes si nécessaire.
- e) La durée d'incubation

Le substrat

- Le S doit être pour lequel l'enzyme a le plus d'affinité
- Pour une [] de $S = 10 K_m$, la $V_i = 91 \% V_m$
- Pour une [] de $S = 100 K_m$, la $V_i = 99 \% V_m$

Il en ressort de ces calculs que la [] optimale de S doit être $> 100 K_m$ **Mais**

Un certain nombre de considération pratique : solubilité du S, prix de revient, inhibition par excès de S, etc., fait que pour les dosages au labo:

on exige que $S > 10 K_m$.

Température

En biologie chimique trois températures sont conventionnellement utilisées : 25°, 30° et 37°C.

La commission des enzymes de la **SFBC** (société française de biologie clinique) préconise la température de 30°C .

La durée de la mesure

$AE = Vi$ en [] saturante de substrat

↔ Période initiale, qui est la durée pendant laquelle une proportion inférieure à **10p100** de la concentration initiale du substrat a été consommée.

Le Témoin

Dans les méthodes « 2 points »

- On utilise une prise d'essai identique mais dans laquelle on a inactivé l'enzyme.
- Ce témoin est nécessaire lorsque le produit de la réaction que l'on dose préexiste dans l'échantillon.

Dans les méthodes cinétiques

- On ne fait généralement pas de témoin, le zéro optique de l'appareil est fait sur l'essai de temps zéro.

Les unités enzymatiques

- L'unité officielle: **katal (kat)**, quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de **1 mole** de substrat par **seconde**. Le katal n'est jamais utilisé, car beaucoup trop grand. On général on utilise le μkat (10^{-6} katal).
- La plupart des biochimistes préfèrent l'**unité internationale (UI)**, qui est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de **1 μmole** de substrat par minute.
- 60 IU valent donc **1 μkat** .

Les unités enzymatiques

- **L'activité enzymatique moléculaire**

Nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme par minute.

$$\mathbf{AEM} = \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol protéine} = \text{UI}/\mu\text{mol protéine}$$

- **L'activité spécifique**

Nombre de molécules de substrat transformées par minute et par mg d'enzymes

$$\mathbf{AS} = \mu\text{mol}/\text{min} / \text{mg de protéine} = \text{UI}/\text{mg de protéines.}$$

Elle mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

Les unités enzymatiques

- **Le rendement de la purification** =
$$\frac{\text{Activité enzymatique totale de l'extrait}}{\text{Activité enzymatique totale de départ}}$$

(x 100 % pour l'exprimer en %)
- **Le taux de purification** =
$$\frac{\text{Activité spécifique de l'extrait}}{\text{Activité spécifique de départ}}$$

1- Méthode en point final ou à « 2 points »

C'est le procédé classiquement utilisé en **méthode manuelle**. Il consiste à :

1. Laisser l'enzyme catalyser la réaction pendant une **durée déterminée d'incubation**,
2. **À arrêter** son action,
3. Puis ajouter un réactif qui réagit avec le S ou le P et avec lequel il est capable de donner un produit coloré dont l'intensité de coloration, lue à une λ déterminée, est directement α à l'AE.

Méthode en point final ou à « 2 points »

- **La durée de la réaction** doit être mesuré avec une extrême précision .
- Le temps (0) est celui ou la réaction est déclenchée lorsque la durée d'incubation s'est écoulée, il est nécessaire de bloquer la réaction :
 - soit en **refroidissant** brutalement,
 - soit en se plaçant rapidement en dehors de la zone de $P\text{H}_0$ en **ajoutant un acide ou une base**,
 - soit en ajoutant un **dénaturant** d'enzyme.

Méthode en point final ou à « 2 points »

- Faire un témoin en utilisant une prise d'essai identique mais dans laquelle on a **inactivé l'enzyme**.
- Ce témoin est nécessaire lorsque le produit de la réaction que l'on dose **préexiste** dans l'échantillon (**Exemple** le dosage du phosphatase sérique avec mesure de phosphate libéré), et lorsque le S risque de se transformer sans l'intervention de l'enzyme, dans les conditions de l'essai.

Méthode en point final ou à « 2 points »

Exemple: **Test colorimétrique du dosage de l'ALAT**



- Tampon contenant: **L-Ala** et **α -cétoglutarate**;
- Prise d'essai de sérum contenant **l'enzyme à doser**;
- Incubation du mélange pendant **30 min à 37°**.
- Additionner le réactif de coloration: **Dinitro-2,4 phénylhydrazine** (agit sur PYR) \longrightarrow P coloré **rouge brun** (Dinitrophénylhydrazone);

Méthode en point final ou à « 2 points »

- Lecture de la DO à 530-546 nm après 20 min d'incubation à 25°C;
- Calcul de l'AE après réalisation d'un étalon ou détermination graphique après réalisation d'une courbe d'étalonnage à l'aide d'une solution mère de PYR.

2- Méthodes cinétiques

- S'adapte parfaitement à l'analyse automatique;
- Consiste à suivre l'évolution de la réaction en fonction de temps;
- La substance dont on mesure la vitesse de disparition ou d'apparition doit posséder une propriété spectrale spécifique dans l'**UV** (NADH) ou le **visible** (PAL);
- lorsqu'aucune de ces conditions n'est réunie, on opère à l'aide de **réactions couplées** appelées *réactions indicatrices*.
- L'enregistrement des variations d'absorbance en f du temps est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus spécifique.

Cinétique enzymatique en Ultra-Violet

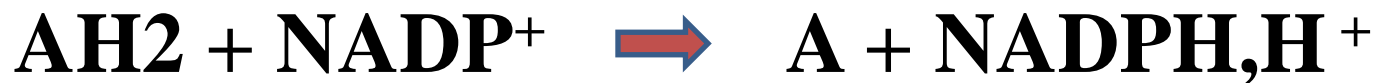
- Le couple **NAD/NADH** ou **NADP/NADPH** est usuellement employé.
- La plupart des enzymes sont mesurées par des réactions en cascades en **UV** mettant en jeu le couple **NAD⁺/NADH₂** qui sont facilement mesurables.
- Ces techniques sont rapides, spécifiques et automatisables.
- Cette méthode présente en outre l'avantage de pouvoir vérifier que la vitesse est constante durant la mesure.

Méthodes cinétiques

- Dans les méthodes cinétiques à enregistrement continu, la durée de réaction n'a pas besoin d'être fixée avec rigueur .
- La réaction est déclenchée, par addition d'un réactif (appelé **réactif déclenchant**) ou par addition de l'enzyme, après avoir attendu que le milieu se stabilise.
- Elle évolue et enregistrement de de la courbe :
P = f(t) permet la détermination de l'activité sur graphe.

Cinétique enzymatique en Ultra-violet

NAD ou NADP se lient réversiblement avec l'apoenzyme au cours de la réaction, ils peuvent être considérés comme des **co-substrat (réaction à 2 S)**:



$$[\text{NAD}^+] > 10 \text{ Km}_{\text{NAD}^+}$$

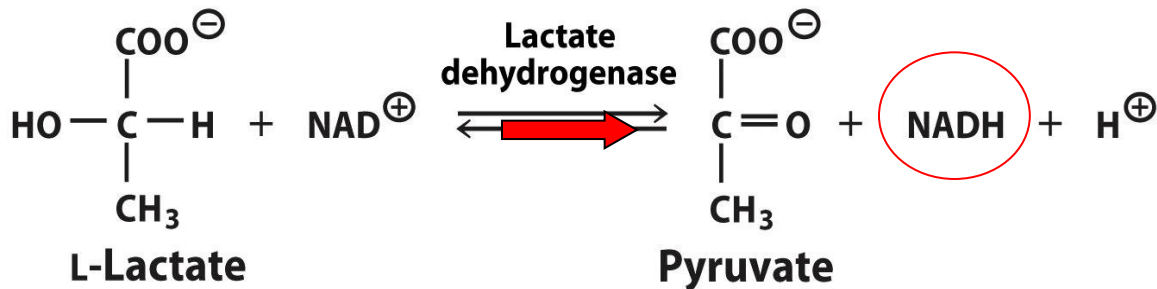
Cinétique enzymatique en Ultra-Violet

- **NADH** présente deux bandes d'absorption : l'une a **260nm**, l'autre a **340 nm**;
- **NAD⁺**, une seule a 260 nm.
- Si la réaction enzymatique évolue dans le sens de la *réduction* du **NAD⁺**, **la DO 340 nm augmente** ;
- inversement, si elle évolue dans le sens d'*oxydation* de NADH, la **DO 340 nm diminue**.
- Le coefficient d'extinction molaire du NADH ou NADPH a 340 nm est : **$\epsilon = 6300 \text{ mol.l}^{-1}\text{cm}^{-1}$**

Cinétique enzymatique en Ultra-Violet

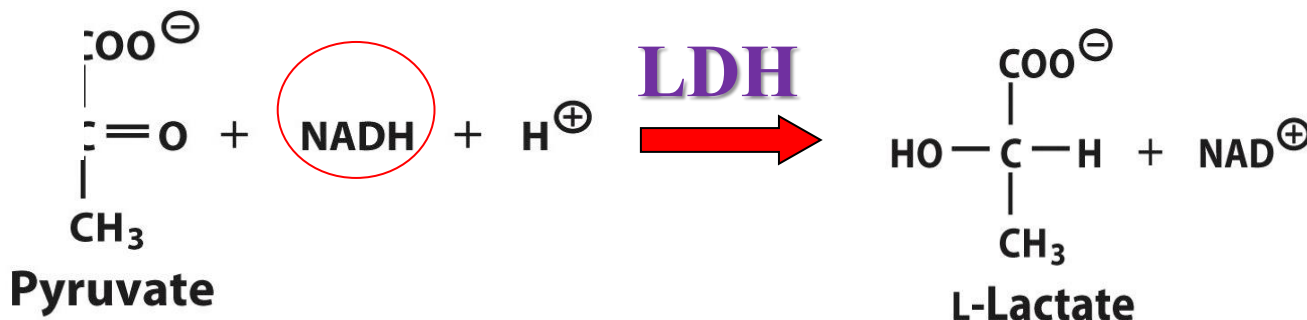
NADH = absorbe fortement à 340 nm ($\epsilon = 6.3 \text{ molL}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

NAD+ = n'absorbe pas à 340 nm



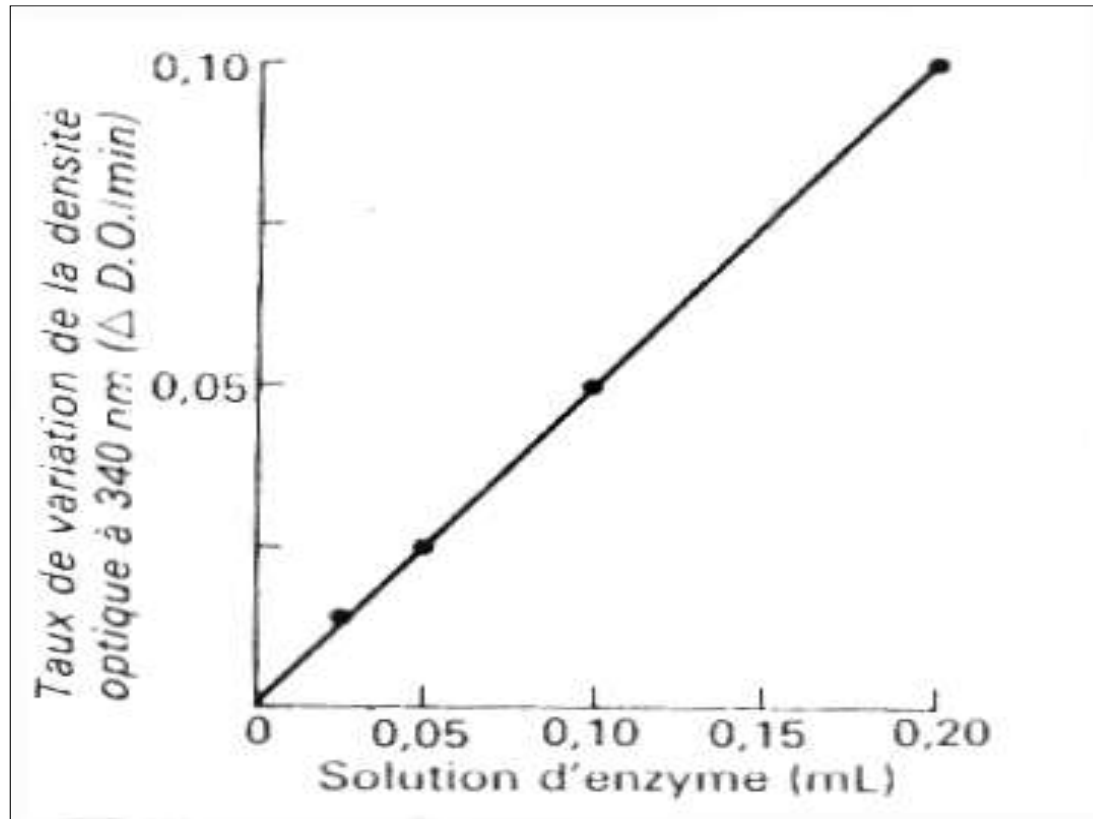
→ Mesure
l'augmentation
de $A_{340\text{nm}}$

Unnumbered figure pg 131a Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

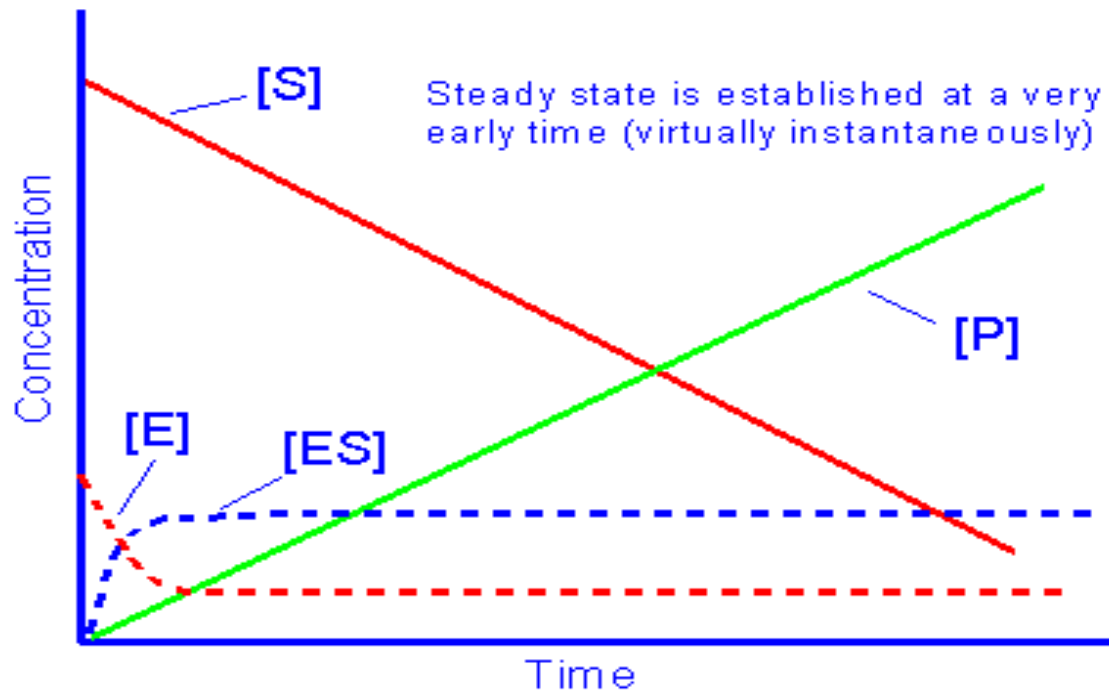


→ Mesure la *diminution*
de $A_{340\text{nm}}$

NAD⁺ et NADH₂ présentent un pic d'absorption
(surtout NAD⁺) a 260 nm
alors on mesure électivement Le NADH₂ a **340nm (UV)**



A 340 nm (UV) Si on mesure :
formation du produit (NADH₂) = DO positives
consommation du substrat (NAD⁺) = DO négatives

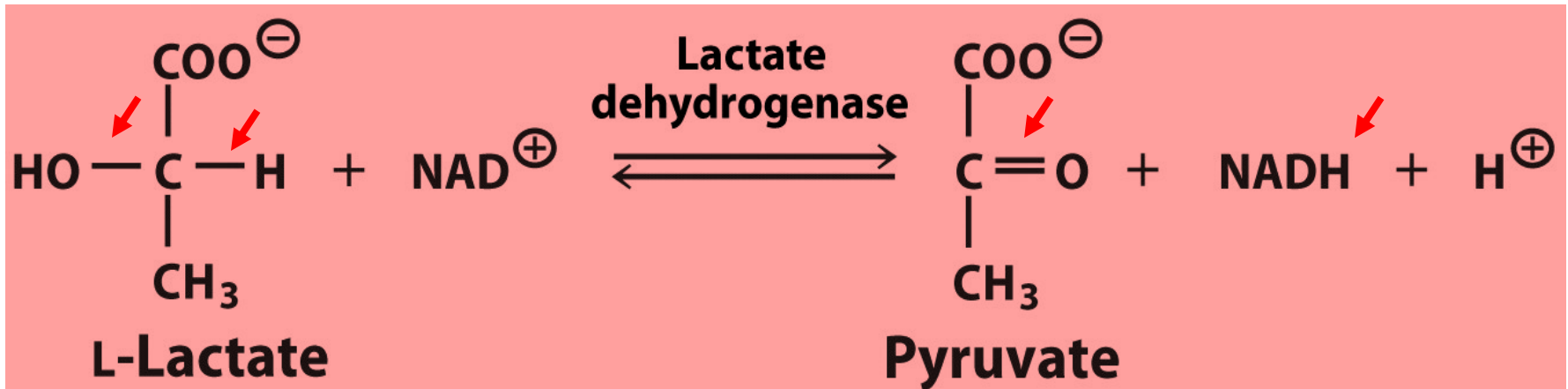


Cinétique enzymatique en Ultra Violet

- **Condition** : la V de R **cte** durant la mesure/ l'observation en continu de la variation de DO permet de le vérifier à chaque instant.
- Dans un tube à essai thermostaté on introduit le **tampon (PH 7,5)**, **l'échantillon de LDH** à doser, le **NADH,H⁺**.
- Puis on ajoute le **pyruvate** (réactif déclenchant);
- On observe **la baisse régulière de la DO**.
- La vitesse est cte tant que la courbe décrit une droite.

Lactate déshydrogénase

(EC 1.1.1.27)



Unnumbered figure pg 131a Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

- Lactate = substrat
- Pyruvate = produit
- NAD⁺/NADH = cofacteur

Cinétique enzymatique en Ultra-Violet

- On calcule la variation de **DO/min** : lorsque la R est déclenchée, on mesure les DO toutes les min pendant 5 à 10 min.
- Les $\Delta\text{DO}/\text{min}$ doivent être égales (ou très proches) indiquant que la R est linéaire.
- On calcule alors la $\Delta\text{DO}/\text{min}$ moyenne.

$$\mathbf{AE} = (\Delta\text{DO}/\text{min})/6,3 \times V_T / V_E \times 10^3 \text{ UI.l}^{-1}$$

- V_T et V_E en cm^3

Cinétique enzymatique en Ultra-Violet

$$\mathbf{DO} = \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{C} \mathbf{l}$$

$$\mathbf{DO}_1 = \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{C}_1 \mathbf{l} \quad \longrightarrow \quad \mathbf{C}_1 = \mathbf{DO}_1 / \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{l}$$

$$\mathbf{DO}_2 = \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{C}_2 \mathbf{l} \quad \longrightarrow \quad \mathbf{C}_2 = \mathbf{DO}_2 / \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{l}$$

$$\begin{aligned} \Delta \mathbf{C} &= \mathbf{C}_2 - \mathbf{C}_1 = (\mathbf{DO}_2 / \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{l}) - (\mathbf{DO}_1 / \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{l}) \\ &= \Delta \mathbf{DO} / \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{l} \end{aligned}$$

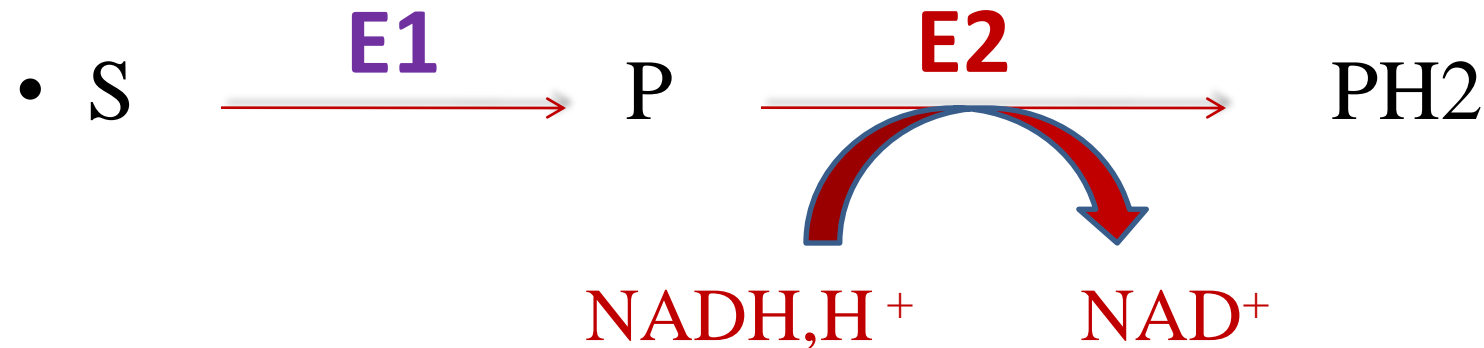
$$\mathbf{AE} = \Delta \mathbf{C} / \mathbf{min} = \Delta \mathbf{DO} / \mathbf{min} / \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{l}$$

Cinétique enzymatique en Ultra-Violet

- $$AE = \frac{\Delta DO / \text{min}}{\epsilon \cdot l} \times \frac{V_T}{V_E} \times 10^6$$
- A 340 nm $\epsilon_{\text{NADH}, \text{H}^+} = 6300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}.$
- AE en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{l}$

Réactions enzymatiques couplées

- Lorsque E, dont on mesure l'activité, n'est pas une déshydrogénase à **NAD⁺** ou **NADP⁺** et que ni S et ni P ne possèdent de propriétés spectrales, alors on couple la première R à une deuxième, catalysée par une déshydrogénase dont P est le substrat.



Réactions enzymatiques couplées

- La 1^{ere} réaction est dite **R principale**
- La 2^{eme} réaction est dite **R indicatrice**

Réactions enzymatiques couplées

Exemple : *dosage de l'ASAT*

- *Ac aspartique + Ac α -cétoglutarique*



- *AOA + NADH, H⁺ **MDH** Malate + NAD⁺*

Réactions enzymatiques couplées

- L'AOA, produit de la 1^{ere} R (principale) est le S de la R indicatrice.
- A chaque molécule d'AOA apparaissant, correspond l'oxydation d'une mole de **NADH,H⁺**.
- Dans ces conditions la variation de DO/min à 340 nm correspond à l'activité de la transaminase.

Réactions enzymatiques couplées

$$AE1 = AE2$$

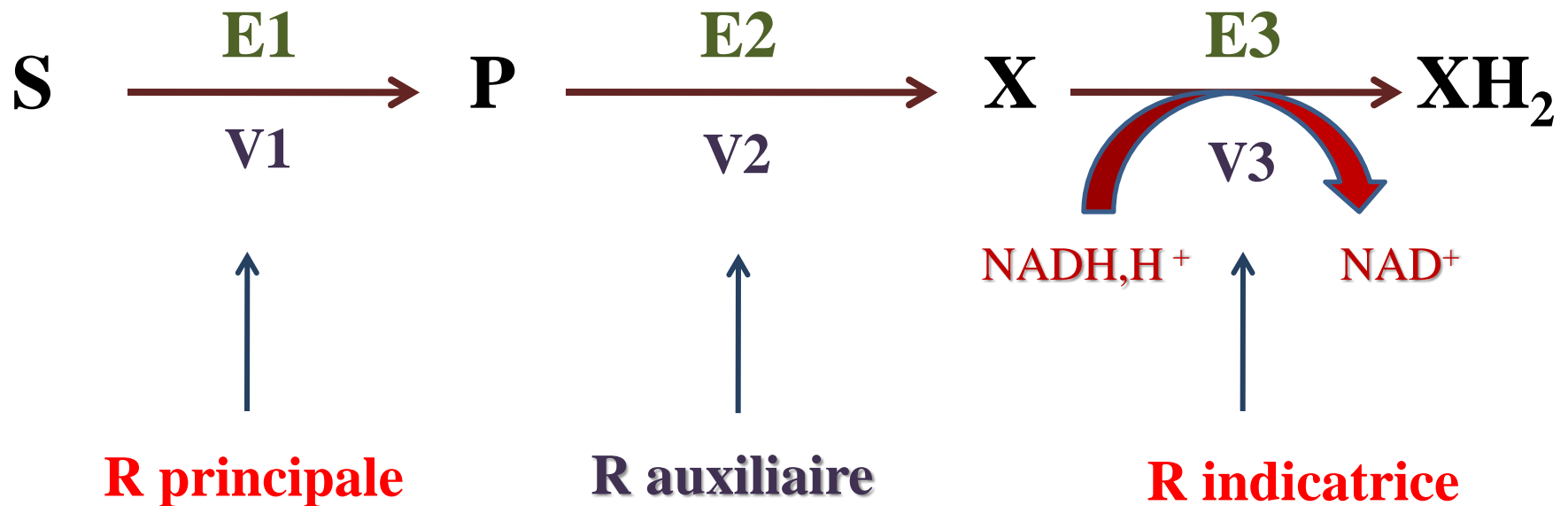
Pour que la deuxième R soit indicatrice de la première, les conditions à respecter sont :

1. La réaction principale doit être **d'ordre 0** pendant la mesure (S de la 1ere R doivent être en large excès = V_1 maximale et constante);
2. La R indicatrice doit être **d'ordre 1** par rapport à P qui devient S de la 2eme.

Dans ces conditions la R principale est limitante pour la seconde $\Rightarrow V_1 = V_2$

Etude de trois R couplées

Lorsque P n'est pas le S d'une déshydrogénase, on couple la 1^{ère} R à une **réaction auxiliaire**, elle-même couplée à une R indicatrice.



Etude de trois R couplées

Exemple: *détermination de l'activité de la **CK** sérique.*

- **R principale:**



- **R auxiliaire:**



- **R indicatrice:**



On suit l'évolution de la R indicatrice par spectrophotométrie à 340 nm.

Cinétique enzymatique colorimétrique

- Exemple: Dosage des phosphatases alcalines (**PAL**)
- p-nitrophénylphosphate $\xrightarrow{\text{PAL}}$ p-nitrophénol + phosphate
- Le substrat = p-nitrophénylphosphate;
- Le tampon = diéthanolamine+ MgCl₂;
- Dosage colorimétrique directe du produit formé (**PNP**) à 405 nm :
enregistrement des DO à des intervalles de temps réguliers (1 min).
- $$AE = \Delta DO / \text{min} / \epsilon l \times V_T / V_E \times 10^6 \text{ UI.l}^{-1}$$
- $$\epsilon \text{ PNP}_{405\text{nm}} = 18000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}.$$