

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Batna 2
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT D'Ecologie et environnement

POLYCOPIE DE COURS 3

Chapitre 3 : **Méthodes enzymatiques**

MODULE

MÉTHODES MODERNE D'ANALYSES ET DE
DOSAGES EN BIOLOGIE
MASTER I (BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE)

Réalisé par

Mr. Ghedadba Nabil

Intitulé du Master : Biotechnologie végétale

Semestre : 02

Intitulé de l'UE : UEM1

Intitulé de la matière : Méthodes modernes d'analyses et de dosages en biologie.

Crédits : 4

Coefficients : 2

Objectifs de l'enseignement : Actualiser les connaissances de l'étudiant en matière de nouvelles techniques d'analyse en biologie.

Connaissances préalables recommandées : Biologie.

Contenu de la matière

1. Méthodes spectroscopiques (Spectrophotométrie)
2. Méthodes chromatographiques (chromatographie d'absorption, échange ionique, affinité etc.)
3. **Méthodes enzymatiques (dosage d'enzymes, de substrat etc.)**
4. Méthodes électro-phorétiques et électrochimiques (réaction antigène anticorps, généralités sur les méthodes immunochimiques courantes, immuno-précipitation etc.)
5. Méthodes cytologiques et ultra structurales.
6. Méthodes cytogénétiques moléculaires (hybridation in situ, FISH, GICH.)

Mode d'évaluation : 50% Contrôle continu + 50% examen final

Références : (Livres et photocopiés, sites internet, etc.)

I. Les Méthodes enzymatiques

GENERALITES sur les DOSAGES ENZYMATIQUES

Introduction

Les **méthodes enzymatiques** sont des **méthodes de dosages récentes** basées sur les propriétés des enzymes. Les conséquences directes de cette relation sont :

- ✓ Une excellente reproductibilité
- ✓ Une meilleure spécificité par rapport aux méthodes chimiques.

Quel que soit le type de dosage, nous ferons donc toujours appel :

1. aux notions caractéristiques de l'enzymologie que sont les termes d'enzymes, de coenzymes, de substrat, de catalyse, d'activité enzymatique ;
2. à l'application de la **loi de Lambert Beer**, relation qui permettra l'analyse des résultats.

- Le principe de base d'un dosage enzymatique consiste à **suivre la production ou la disparition d'une molécule en mesurant ses absorbances à une longueur d'onde de travail donnée qui lui est spécifique.**

Selon la nature de l'élément dosé, on distingue deux types de dosages :

- ✚ les dosages de SUBSTRAT par méthode enzymatique en point final ;
- ✚ les dosages d'ENZYMES par détermination de leur concentration catalytique.

Et, selon la longueur d'onde à laquelle la molécule absorbe, on distingue deux cas de figure :

- ❖ Si on mesure une molécule colorée, le domaine de lecture est le visible et on parle alors de **dosage enzymatique colorimétrique** ;
- ❖ Par contre, si on mesure la production ou la consommation d'un coenzyme qui absorberait dans l'UV (par exemple, le NADH qui absorbe à 340 nm), on parlerait alors de **dosage enzymatique UV**.

Nous allons étudier les trois types de dosages enzymatiques :

- Les dosages dits colorimétriques ;
- Les dosages dits UV ;
- Les dosages liés aux activités enzymatiques dans le visible et dans l'UV.

Les exemples étudiés seront issus :

- soit de sérum lyophilisé reconstitué pour permettre le dosage de composés organiques comme le cholestérol, le glucose total ou bien des transaminases ;

- soit de produit alimentaire comme le glutamate des soupes ou les sucres d'un jus de fruit.

Chaque dosage réalisé sera expliqué par des équations bilan résumant soit l'action de catalyse de l'enzyme étudiée soit le mécanisme d'action de l'enzyme sur son substrat.

Les dosages enzymatiques colorimétriques et UV

Modes de calculs communs

Quel que soit le type de dosages, colorimétrique ou UV, ces dosages enzymatiques présentent des points communs :

- Les calculs utilisés pour déterminer la concentration de la molécule ou du composé inconnu sont basés sur la loi de Lambert Beer telle que :

$$A = \varepsilon \times l \times C \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}$$

Avec les données suivantes : A, l'absorbance de la molécule, ε le coefficient d'extinction molaire de la molécule colorée ou du coenzyme (en $\text{L.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l, le trajet optique de la cuve de mesure utilisée (en cm), et C la concentration molaire de la molécule mesurée en (mol.L^{-1}).

- dans un souci de qualité de résultats obtenus, il est recommandé de réaliser conjointement des échantillons inconnus et des échantillons étalons.

Les différentes étapes de calculs seront donc :

1. vérifier le titre de l'étalon obtenu et s'assurer de sa concordance avec le titre annoncé ;
2. calculer la concentration de l'inconnue selon deux modes de calculs différents et s'assurer de leur similitude.

Vérification du titre de l'étalon

La relation à utiliser sera :

$$\text{Concentration étalon (mmol.L}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{\text{étalon}} - A_{\text{témoin}}) \times V}{pE_{\text{étalon}} \times \varepsilon \times l}$$

Avec les données suivantes :

- V, le volume total de la cuve (en mL) ;
- $A_{\text{étalon}}$, l'absorbance de l'étalon, ou $\Delta A_{\text{étalon}}$ la variation d'absorbance de l'étalon ;
- $A_{\text{témoin}}$, l'absorbance du témoin ou blanc réactif, ou $\Delta A_{\text{témoin}}$ la variation d'absorbance du témoin ou blanc réactif ;
- $pE_{\text{étalon}}$, la prise d'essai de l'étalon (en mL) ;
- ε , le coefficient d'extinction molaire du coenzyme ou de la molécule colorée (en $\text{L.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ;
- l, le trajet optique de la cuve de mesure utilisée (en cm).

Détermination de la concentration inconnue

Il existe deux modes de calcul légèrement différents mais toujours basés directement ou indirectement sur la loi de Lambert Beer.

La détermination de la concentration de votre inconnue (en g.L⁻¹), **par rapport à l'étalon théorique**, est donnée par le rapport suivant :

$$\text{Concentration inconnue} = \frac{(A_{\text{essai}} - A_{\text{témoin}})}{(A_{\text{étalon}} - A_{\text{témoin}})} \times \text{concentration de l'étalon (g.L}^{-1}\text{)}$$

La détermination de la concentration de votre inconnue, **par rapport à la loi de Lambert Beer**, est donnée par le rapport suivant :

$$\text{Concentration inconnue (mmol.L}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{\text{essai}} - A_{\text{témoin}}) \times V}{pE_x \times \varepsilon \times l}$$

Remarque : les données sont les mêmes que celles utilisées pour le calcul de la concentration de l'étalon théorique à l'exception de la prise d'essai qui est celle de l'inconnue dans notre formule (bien entendu).

Dosages colorimétriques

On parle de dosage colorimétrique lorsque le dosage enzymatique est réalisé dans le domaine du visible (entre 400-800 nm). : le technicien suit alors directement l'apparition ou la disparition d'une molécule colorée absorbant dans ce domaine à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'exemple traditionnel pour ce type de dosages fait appel à la réaction de Trinder : en présence de 4 amino-antipyrine, de phénol, d'eau oxygénée formée par réaction et de peroxydase, il y a formation d'un produit coloré, la quinone imine, qui présente un maximum d'absorption vers les 500 nm. A cette longueur d'onde, l'intensité de la coloration développée est alors directement proportionnelle à la concentration de la molécule quantifiée spectralement.

Cette réaction intervient par exemple dans les dosages du cholestérol, des triglycérides ou du glucose dans un sérum.

Dosages UV

Dans ces méthodes enzymatiques, les réactions utilisées sont NADH ou NADPH dépendantes³.

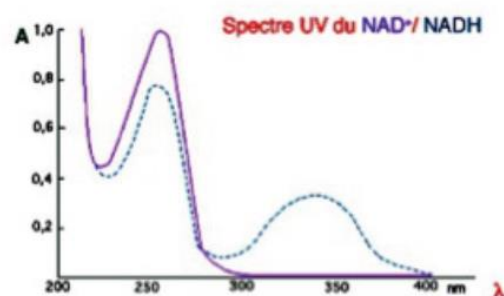
Elles font donc intervenir l'apparition ou la disparition de ces coenzymes d'oxydo-réduction dans la réaction qui présentent un maximum d'absorption à 340 nm, soit le domaine de l'UV.

Cette propriété est utilisée pour mesurer la production de NADH, par exemple puisque

l'absorption de la lumière à 340 nm est proportionnelle au nombre de molécules de NADH

présentes dans la solution et augmente donc avec l'activité de l'enzyme alors que la forme NAD^+ n'absorbe pas à cette longueur d'onde (cf. figure 3 : spectres d'absorption du couple NAD^+/NADH).

Chaque molécule inconnue est alors dosée selon un principe simple : les variations d'absorbances du coenzyme lié à la réaction enzymatique permettent de déterminer proportionnellement la concentration de celui-ci et donc également celle de la molécule dosée.



Généralités sur les enzymes

Une enzyme est une protéine douée d'activité catalytique spécifique, c'est-à-dire qu'elle agit sur la cinétique d'une réaction chimique en augmentant la vitesse de réaction.

Sa propriété majeure est d'être un catalyseur, dont les caractéristiques sont :

- D'être actif en faible quantité ;
- De se retrouver intact en fin de réaction ;
- De n'exercer aucune influence sur l'équilibre d'une réaction chimique réversible s'il est en faible concentration par rapport à la concentration de son substrat.

Les enzymes peuvent être structurellement classées en 2 catégories. Il s'agit :

- soit d'holoenzyme : enzyme entièrement protéique (constituée uniquement d'acides aminés) ;
- soit d'hétéroenzyme : enzyme constituée en deux parties : une partie protéique, appelée « apoprotéine » et une non protéique dite « coenzyme ».

Dans les faits, les réactions chimiques se produisent avec le coenzyme qui permet la transformation de 10-1000 molécules de substrat (S) par seconde.

La partie protéique intervient dans la spécificité de la réaction : la fixation du substrat.

Généralités sur l'activité enzymatique

Dans ce type de dosages enzymatiques, le domaine de lecture importe peu ; seule, la notion d'activité enzymatique liée à l'enzyme étudiée est utilisée.

La catalyse enzymatique de la transformation d'un substrat S en un produit P par une enzyme E fait intervenir un complexe enzyme - substrat ES qui peut s'écrire



où : k_1 , k_{-1} , k_2 et k_{-2} sont les constantes de vitesses des réactions ;

[E] est la concentration en enzyme libre ;

[ES] est la concentration en enzyme complexée ;

[S] est la concentration en substrat ;

[P] est la concentration en produit.

Trois possibilités expérimentales pour déterminer l'activité enzymatique :

- mesure de la quantité de substrat (S) consommé pendant la réaction par dosage colorimétrique ;

- mesure de la quantité de produit formé (P) au cours de la réaction par dosage colorimétrique ;

- dosage d'un coenzyme transformé au cours de la réaction comme les couples

NAD/NADH, H⁺ ou NADP/NADPH, H⁺ à 340 nm.

Pour mesurer cette activité enzymatique, on peut travailler selon deux options :

- à l'enregistreur : quand on travaille dans la zone linéaire, cela correspond à un travail en V_{\max} ;

- en cinétique stoppée : dans ce dernier cas, on ne voit pas quand on quitte la V_{\max} . On prend alors la mesure en Δt et en ΔAbs en espérant être en V_{\max} . La pente obtenue permet alors de déterminer l'activité enzymatique recherchée et à l'aide d'un facteur

dit facteur de concentration noté **F**, on peut ensuite calculer la **concentration catalytique (CAC)**.

Ce facteur de concentration F dépend donc de la température du dosage, de la prise d'essai de l'enzyme et du volume total de la cuve. **Il se note dans la même unité que l'activité enzymatique.** On détermine ce facteur F d'après la loi de Lambert Beer tel que

$$F = \frac{Vol_{total}}{pE \times \epsilon \times l}$$

Et

$$CAC = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times F$$

L'unité internationale utilisée de la CAC est l'**UI/L**, ce qui correspond au nombre de μmol de substrat transformé par unité de temps en minute et par litre de solution à une température donnée. Mais il existe une autre unité usuelle : le katal/L ou **kat/L** qui correspond à des moles de substrat transformées par seconde et par L de solution.

Si le dosage de la CAC est effectué à une température (T) différente de 25 °C, on doit appliquer une correction de température donnée par la relation suivante :

$$CAC_{25^{\circ}C} = CAC_T * 1,093^{(25 - T)}$$

Avec T la température du dosage en °C.

Et avec CAC_T la concentration catalytique obtenue à la température T.

Remarque : on distingue d'autres expressions caractéristiques de l'activité enzymatique : l'activité totale (nombre d'unités de la fraction protéique) et l'activité spécifique enzymatique (nombre d'UI/ mg de protéines).

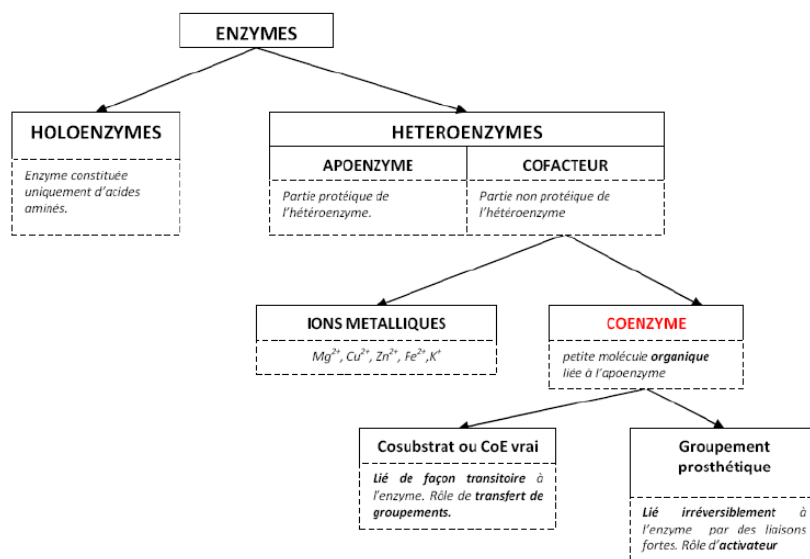
DOSAGES ENZYMATIQUES SIMPLES ET COUPLES UV

Les coenzymes

Généralités sur les coenzymes

Hormis les hydrolases, les enzymes en général sont constituées de plusieurs éléments :

- une **apoenzyme** de nature protéique ;
- une partie non protéique appelée **cofacteur** qui est soit un ion métallique (appelé cofacteur minéral) soit une molécule organique (appelée coenzyme).



La combinaison des deux éléments forme l'hétéroenzyme (enzyme complète).

Plus de 3000 enzymes sont recensées mais en revanche, on ne connaît qu'une vingtaine de coenzymes.

La plupart des coenzymes sont des dérivés des vitamines amenées par l'alimentation chez l'homme et les organismes supérieurs.

Ils présentent les caractéristiques suivantes :

- d'être thermostables donc non protéiques ;
- de posséder un faible poids moléculaire.

Enfin, ils :

- participent de manière stoechiométrique aux réactions ;
- se retrouvent à l'état initial en fin de réaction ;

- permettent le transfert d'une entité X d'une molécule à une autre (électrons, protons, phosphate) ;
- n'interviennent pas dans la spécificité de la réaction enzymatique.

Types de coenzymes

Selon leur mode de liaison à l'apoenzyme, on distingue 2 types de coenzymes :

- les **coenzymes liés** (ou groupement prosthétique) : coenzyme activateur (exemple du coenzyme flavinique, c'est-à-dire flavine adénine dinucléotide FAD) dont la caractéristique principale est de faire partie intégrante de l'enzyme ;
- les **coenzymes libres** (ou cosubstrat) : coenzyme transporteur (cas du coenzyme NAD, c'est-à-dire nicotinamide adénine dinucléotide) dont la principale propriété est de ne pas être une partie intégrante de l'enzyme.

Classification des coenzymes : coenzymes d'oxydoréduction

On distingue deux sortes de coenzymes :

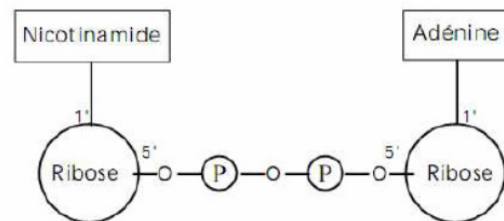
- les coenzymes d'oxydoréduction ;
- les coenzymes de transfert de groupements.

Structure des coenzymes pyridiniques

Il s'agit par exemple du

NAD⁺ nicotinamide adénine dinucléotide

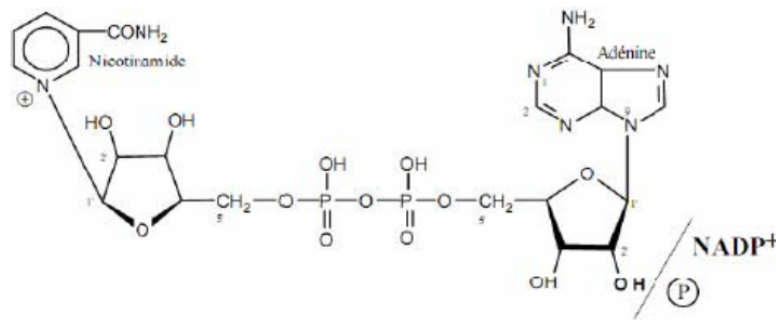
NADP⁺ nicotinamide adénine dinucléotide phosphate



Ils fonctionnent avec les déshydrogénases, enzymes appartenant au groupe des **oxydoréductases**.

Ils sont composés de **deux nucléotides reliés entre eux par un groupement pyrophosphate**.

Le NAD⁺ et NADP⁺ ne diffèrent que par un résidu phosphate estérifié en C₂' du ribose lié à l'adénine.

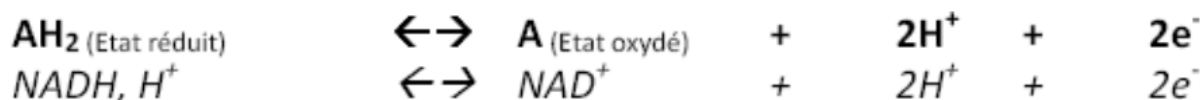


Mécanismes réactionnels

Rappels d'oxydoréduction : un réducteur est un composé ayant tendance à fournir un ou plusieurs électrons (exemple : NADH, H⁺) et un oxydant est un composé ayant tendance à capter un ou plusieurs électrons (exemple : NAD⁺)

La forme réduite et la forme oxydée d'un même composé constituent un couple rédox (exemple NAD⁺/NADH).

Dans les faits, dans les systèmes biologiques, les couples rédox font intervenir des électrons et des protons tels que :



Les mécanismes d'action de NAD^+ et NADP^+ sont identiques : il y a transfert de deux électrons et d'un proton au coenzyme.

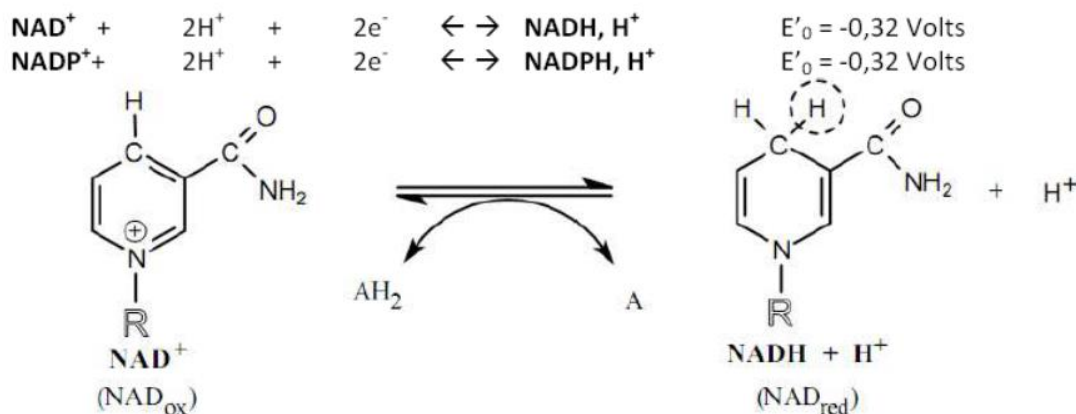


Figure 6 : mécanismes d'action du NAD^+ et NADP^+

Application expérimentale

Dans les méthodes désignées en tant que tests UV, les réactions utilisées sont NADH ou NADPH dépendantes.

L'absorption maximale de ces deux coenzymes se situe à 340 nm ; cette propriété est utilisée pour mesurer la production de NADH , par exemple puisque l'absorption de la lumière à 340 nm est proportionnelle au nombre de molécules de NADH présentes dans la solution et augmente donc avec l'activité de l'enzyme alors que la forme NAD^+ n'absorbe pas à cette longueur d'onde.

Réactions enzymatiques en point final

Principe

En condition d'excès d'enzyme, on dose un substrat selon la méthode en point final une fois que celui-ci aura été entièrement transformé. La réaction s'arrête alors et on peut suivre la variation d'absorbance du coenzyme lié à l'enzyme de la réaction.

Réactions enzymatiques simples ou directes

Dans certaines réactions, la molécule absorbante dont on va suivre l'absorbance est directement liée au substrat à doser.

Réactions enzymatiques couplées ou indirectes

Cependant, dans certains dosages enzymatiques, il est nécessaire de faire intervenir plusieurs réactions enzymatiques successives jusqu'à obtenir une réaction qui présenterait un spectre UV détectable et quantitatif.

Vocabulaire associé

On distingue différents types de réactions :

- la réaction dite **principale** : il s'agit de la **réaction spécifique du substrat à doser** ; on parle d'enzyme principale ;

- la réaction dite **indicateur** : il s'agit de la réaction qui met en jeu une **molécule dont on peut suivre l'absorbance**, comme le NADH, par exemple ; l'enzyme utilisée est alors appelée enzyme indicatrice ;
- la réaction dite **auxiliaire** : il s'agit de la **réaction par laquelle le produit dosé est transformé** ; on parle également d'enzyme auxiliaire.

Détermination expérimentale

Dans ce type de dosage, chaque molécule inconnue est dosée selon un principe simple : les **variations d'absorbances du coenzyme** lié à la réaction enzymatique permettent de calculer **proportionnellement** la concentration de celui-ci et donc également celle de la molécule dosée.

Par exemple, dans le cas de l'aspartate et selon la première équation du principe du dosage de l'aspartate : pour 1 molécule d'aspartate, 1 molécule d' α -cétoglutarate est utilisée pour donner 1 molécule d'oxalo-acétate et 1 molécule de glutamate.

A 340 nm, (longueur d'onde de travail pour laquelle le NADH, H^+ absorbe), l'absorbance est forte puis au fur et à mesure que les molécules d'aspartate sont utilisées, des molécules de NAD^+ sont fabriquées entraînant ainsi une diminution de l'absorbance mesurée (car à 340 nm, cette forme du coenzyme n'absorbe pas).

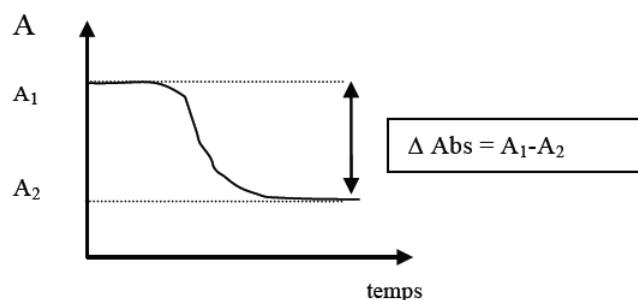


Figure 8 : variation d'absorbances pour la détermination de l'aspartate

Il est alors possible de déterminer à l'aide de la loi de Lambert Beer les concentrations des échantillons étalon et inconnue d'après les variations d'absorbances mesurées au cours du dosage à la longueur d'onde d'absorbance maximale du coenzyme.

Quel que soit le type de dosage, couplé ou simple, deux méthodes de travail peuvent être appliquées ; il s'agit de :

- la **méthode de l'étalon externe** : dans ce cas, l'étalon est déposé seul dans le milieu réactionnel et son absorbance est lue directement sur l'appareil ; cette méthode sera utilisée pour les dosages de l'aspartate et l'asparagine et des sucres dans le jus de

fruit ; cette méthode présente alors l'avantage de diminuer l'influence du spectrophotomètre sur les résultats.

- La méthode de l'étalon interne : il s'agit d'une méthode d'ajouts telle que l'étalon et l'inconnue sont présents dans le milieu réactionnel et l'absorbance due à l'étalon est calculée indirectement à l'aide d'une propriété simple des absorbances, le respect de la loi d'additivité des absorbances ; cette méthode permet d'éliminer les effets d'inhibitions dues aux enzymes présentes dans le produit alimentaire et les erreurs dues à un mauvais calage du spectrophotomètre.

Cependant, quelle que soit la méthode des étalons utilisée, le contrôle du titre de votre étalon se calculera toujours par l'intermédiaire de la relation suivante :

$$\text{Concentration étalon (mmol.L}^{-1}\text{)} = \frac{(\Delta A_{\text{étalon}} - \Delta A_{\text{témoin}}) \times V}{pE_{\text{étalon}} \times \varepsilon \times l}$$

Avec les données suivantes :

- V, le volume total de la cuve (en mL) ;
- $pE_{\text{étalon}}$, la prise d'essai de l'étalon (en mL) ;
- ε le coefficient d'extinction molaire du coenzyme (en $\text{L.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ;
- l, le trajet optique de la cuve de mesure utilisée (en cm).

La détermination de la concentration de votre inconnue (en g.L^{-1}), par rapport à l'étalon théorique, sera donnée par le rapport suivant :

$$\text{Concentration inconnue} = \frac{(\Delta A_{\text{essai}} - \Delta A_{\text{témoin}})}{(\Delta A_{\text{étalon}} - \Delta A_{\text{témoin}})} \times \text{concentration de l'étalon (g.L}^{-1}\text{)}$$

La détermination de la concentration de votre inconnue, par rapport à la loi de Lambert Beer, sera également donnée par le rapport suivant :

$$\text{Concentration inconnue (mmol.L}^{-1}\text{)} = \frac{(\Delta A_{\text{essai}} - \Delta A_{\text{témoin}}) \times V}{pE_x \times \varepsilon \times l}$$

Remarque : les données sont les mêmes que celles utilisées pour le calcul de la concentration de l'étalon théorique à l'exception de la prise d'essai qui est celle de l'inconnue dans notre formule (bien entendu).