

Méthodes de mesure des activités enzymatiques

B. BAUDIN

Service de biochimie A, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris et UFR de pharmacie, Châtenay-Malabry, Université Paris-Sud.

I. Principe de la mesure d'une activité enzymatique

- A. Quelle vitesse faut-il mesurer ?
- B. Faut-il étalonner ?
- C. Nature du substrat
- D. Signification de V_m : unités utilisées en enzymologie

II. Effecteurs de la réaction enzymatique

- A. pH
- B. Système tampon
- C. Température

III. Modalités de la détermination des activités enzymatiques

- A. Méthodes en deux points : cinétiques en un temps fixé
- B. Méthodes cinétiques directes
- C. Méthodes cinétiques indirectes utilisant des réactions consécutives

IV. Mesures des activités des formes isozymiques (isoenzymes)

- A. Séparation des isoenzymes par électrophorèse et détection des activités in situ
- B. Mesure différentielle de l'activité après dénaturation thermique
- C. Mesure directe sélective d'une isoenzyme à l'aide d'un analogue du substrat
- D. Inhibition sélective d'une forme isozymique par un inhibiteur ou par un anticorps constitue une méthode complémentaire différentielle
- E. Méthodes immunologiques

V. Précautions à prendre pour la mesure d'une activité enzymatique

- A. Choix de la méthode : standardisation, optimisation
- B. Utilisation d'un réactif prêt à l'emploi

En biologie clinique, l'enzymologie est surtout utilisée pour connaître la quantité d'une enzyme présente dans le sérum ou un autre milieu biologique. Il n'est pas courant de mesurer directement l'enzyme comme une protéine, c'est sa fonction biologique (activité catalytique) qui est généralement mesurée.

Il existe actuellement une simplicité apparente des méthodes de mesure de ces activités, alors que la mise au point de telles techniques est très délicate. Un certain nombre de précautions dans l'utilisation de ces méthodes sont à prendre. Elles font appel à des notions théoriques complexes et toute modification des conditions opératoires est à proscrire.

I. Principe de la mesure d'une activité enzymatique

L'activité enzymatique se mesure par la vitesse de la réaction de transformation du substrat S en produit P : $S \rightarrow P$ (fig. 1).

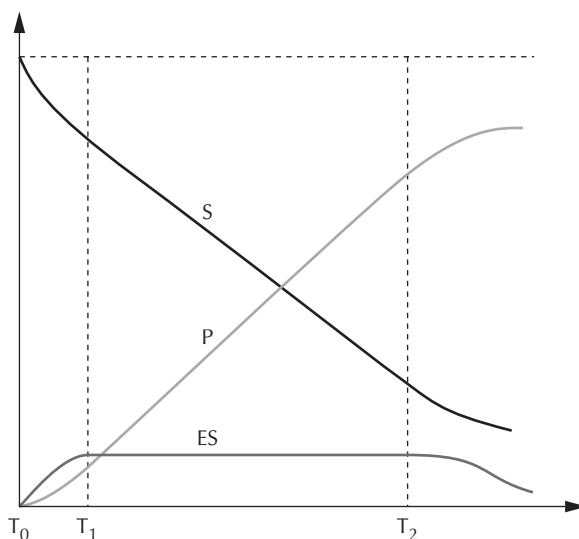


Figure 1. Évolution des concentrations des réactants dans une réaction catalysée par une enzyme (ES = complexe enzyme-substrat, T = temps)

Il est possible d'estimer la vitesse de la réaction de deux manières :

- soit en mesurant la vitesse de disparition du substrat $-\frac{d|S|}{dt}$;
- soit en mesurant la vitesse d'apparition du produit $\frac{d|P|}{dt}$.

Ces deux vitesses sont identiques au signe près :

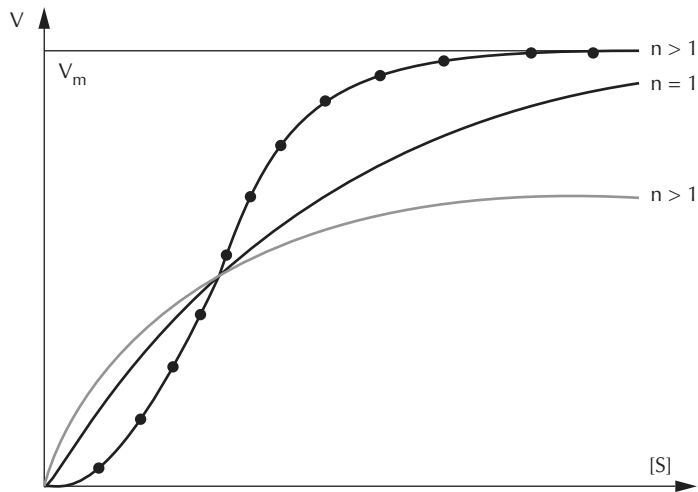
$$-\frac{d|S|}{dt} = \frac{d|P|}{dt} \quad (1)$$

L'équation de Michaelis-Menten démontre que l'enzyme est un catalyseur saturable : la vitesse initiale de la réaction V_i a pour valeur :

$$V_i = \frac{k_{\text{cat}}|E_t||S|}{K_m + |S|} \quad (2)$$

avec
$$V_m = k_{\text{cat}}|E_t| \quad (3)$$

k_{cat} et K_m sont les deux constantes de la réaction caractéristique du couple enzyme-substrat pour des conditions physicochimiques données (pH, température, etc.), et V_m est la vitesse maximale de la réaction obtenue théoriquement pour une concentration saturante, donc infinie, en substrat. E_t est la concentration totale en enzyme (fig. 2).



Quand l'enzyme n'est pas michaelienne, le graphe $V = F([S])$ n'est pas hyperbolique (cas des enzymes allostériques, $n > 1$ ou $n < 1$), mais on peut mesurer une V_{max} (V_m).

Figure 2. Représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten (courbe $n = 1$)

A. Quelle vitesse faut-il mesurer ?

L'équation (2) montre que pour une concentration donnée en substrat, v_i et V_m sont constantes et proportionnelles à la concentration totale en enzyme $|E_t|$. Toutefois, pour deux raisons pratiques (sensibilité et linéarité de la mesure), c'est la vitesse maximale (V_m) qu'il est préférable de mesurer. En effet, d'une part, en mesurant V_m , la sensibilité de la mesure est maximale et, d'autre part, il est plus certain que la vitesse soit linéaire dans le temps. Un autre avantage de la mesure de V_m est l'homogénéisation des résultats, puisque la plupart des mesures sont effectuées à concentration saturante en substrat.

On remarque que pour $|S| = 10 k_m$, $v_i = 91\%$ de V_m . Dans la mesure du possible, le choix d'une concentration finale en substrat supérieure ou égale à $10 k_m$ permet d'approcher correctement la valeur de V_m . Les facteurs limitant l'utilisation de telles concentrations en pratique sont : la valeur du K_m de l'enzyme considérée, la

solubilité du substrat et l'absorbance propre du substrat en spectrophotométrie (linéarité du spectrophotomètre).

B. Faut-il étalonner ?

On remarquera que si la valeur de k_{cat} est connue (équation 3), il est tout à fait possible de connaître la concentration en enzyme. Toutefois, k_{cat} dépend des conditions opératoires (température, effecteurs) ; elle n'est donc utilisable que pour une méthode donnée qui sera étalonnée avec une enzyme très purifiée.

En pratique courante, cette façon d'opérer n'est pas retenue parce que dans le sérum sont présents simultanément des isoenzymes en concentration variable selon la pathologie. Ces isoenzymes présentent des k_{cat} et des K_m assez différents ; on mesure donc une vitesse qui correspond à une *activité globale* des isoenzymes présentes.

C. Nature du substrat

Si la spécificité de l'enzyme est large, c'est-à-dire si elle tolère plusieurs substrats, la vitesse de la réaction est généralement caractéristique d'un substrat donné. *Dans ce cas assez répandu, l'expression des résultats de la mesure d'une activité enzymatique dépendra au premier chef de la nature du substrat choisi, ce qui n'apparaît pas dans la définition des unités internationales qui est une simple expression de la vitesse de la réaction.* Le choix du substrat idéal est en fait un compromis entre la spécificité de ce substrat pour l'enzyme (qui est garante de l'exactitude des mesures) et les contraintes analytiques liées à la sensibilité et à la praticabilité des mesures. Pour atteindre ce dernier but, on choisira le substrat qui est transformé à la vitesse la plus élevée et qui génère des produits facilement mesurables.

Les phosphatases, par exemple, présentent une faible spécificité. Les phosphomonoestérases, comme leur nom l'indique, sont spécifiques de la fonction monoester. Elles catalysent aussi bien l'hydrolyse du paranitrophénylphosphate, produit de synthèse, que l'hydrolyse des glycérophosphates naturels.

D. Signification de V_m : unités utilisées en enzymologie

La vitesse maximale de la réaction ne représente pas par elle-même une quantité d'enzyme mais cette vitesse est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme (cf. équation 3).

1. Unité enzymatique

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une certaine quantité de substrat par unité de temps.

Deux types d'unités sont actuellement utilisés, qui correspondent à deux modes d'expression de la V_m :

- l'*unité internationale (UI)*, qui n'est pas cohérente, correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute ;

- le *katal* (*kat*), cohérent, correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde (les sous-multiples sont seuls utilisés : millikatal, microkatal et nanokatal).

Le passage d'une unité à l'autre s'effectue aisément de la façon suivante :

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} = 10^{-6}/60 \text{ mol}\cdot\text{sec}^{-1} = 10^{-6}/60 \text{ kat} = 0,01667 \mu\text{kat} = 16,67 \text{ nkat}$$

2. Concentration d'enzyme dans un milieu biologique et activité spécifique

a) Concentration

La vitesse de la réaction enzymatique étant assimilée à la quantité d'enzyme, il est possible de parler de concentration d'activité catalytique soit en unités internationales par litre (UI/L) soit en katals par litre (kat/L).

b) Activité spécifique

Les unités dérivées sont : la quantité d'activité catalytique spécifique (UI/kg ou kat/kg) et la quantité d'activité catalytique molaire (UI/mol ou kat/mol).

c) Remarque importante

La comparaison de résultats exprimés en UI/L n'est possible en enzymologie clinique que dans le cas où les conditions opératoires sont dûment précisées (nature du substrat, température, etc.).

II. Effecteurs de la réaction enzymatique

A. pH

Notons que l'effet du pH est complexe puisqu'il agit à la fois :

- sur l'équilibre de la réaction si celle-ci implique la libération ou la capture d'un proton (cas de la coenzyme nicotinamide-dinucléotide NAD) :



- sur la conformation de la protéine enzyme et l'ionisation des groupes impliqués dans la catalyse au niveau du site actif de l'enzyme.

Toutefois, il y a toujours un pH optimal pour lequel l'effet catalytique de la protéine enzyme est maximum.

Pour certaines enzymes, de petites variations du pH provoquent des grandes variations de l'activité. Pour d'autres enzymes au contraire, l'effet du pH est moindre. L'ensemble de ces contraintes exige que le milieu réactionnel soit rigoureusement tamponné. De façon générale, c'est le pH optimal qui est choisi ; il est pour la plupart des enzymes proche de la neutralité. Cependant, si le pH est le seul paramètre qui permette de séparer deux isoenzymes, des pH alcalins ou acides sont utilisés.

C'est le cas des phosphatases alcalines (PAL) qui se différencient aisément des phosphatases acides (PAC) par le pH choisi pour la mesure. En d'autres termes, le pH alcalin permet une mesure correcte des phosphatases alcalines en présence de phosphatases acides.

Il est impératif dans tous les cas de bien vérifier que les constituants du tampon ne sont pas, ou ne contiennent pas d'inhibiteurs.

B. Système tampon

Effecteur important, le tampon doit présenter une capacité tampon suffisante. La molarité et le pK des composés devront donc être sélectionnés. Le choix est difficile et il faut bien dire que cette question n'a pris de l'intérêt que depuis quelques années, et les équipes qui s'occupent d'optimisation ont été d'emblée au cœur du problème.

Les paragraphes suivants résument les principaux problèmes à résoudre.

1. Tampons inhibiteurs

Cette inhibition peut avoir des causes multiples. Citons :

- le tampon complexe un cation activateur de l'enzyme ; par exemple, Ca^{2+} des DNAses ou Zn^{2+} des métalloprotéases ;
- l'un des composants du tampon est proche stériquement de l'un des substrats ou produit de la réaction. C'est le cas de l'ion phosphate qui se fixe sur le site récepteur du pyridoxal-phosphate ;
- le système tampon contient une impureté organique ou minérale inconnue.

Il faut remarquer à ce propos l'extraordinaire pouvoir de détection des impuretés d'un réactif de la réaction enzymatique. La sensibilité de la réaction permet de mettre en évidence une inhibition significative. Aussi, il est certain que les normes de pureté des réactifs destinés à l'enzymologie devront à l'avenir être définies avec une plus grande rigueur.

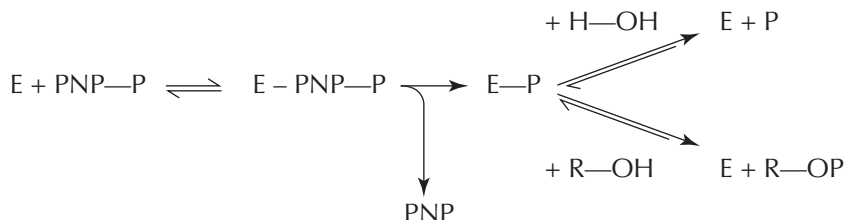
2. Force ionique du milieu réactionnel et du système tampon

Elle est très souvent à l'origine des différences observées entre deux systèmes tampons au même pH. Au niveau de l'enzyme, pH et force ionique sont deux paramètres intimement liés. En effet, le pK d'ionisation d'une molécule organique varie en fonction de la force ionique du milieu (par exemple, le pK d'ionisation de l'imidazole varie d'une unité si la force ionique du milieu passe de 0 à 1). Autrement dit, à pH constant, si on fait varier la molarité du tampon, l'activité enzymatique évolue. De même, à molarité constante, si on fait varier le pH, l'activité enzymatique varie aussi. En d'autres termes, l'effet de la force ionique peut être nul au pH optimal et important à d'autres pH.

Pratiquement, on détermine au pH optimal l'influence de la molarité du tampon et l'on choisit la molarité optimale si il y en a une.

3. Système tampon activateur

Le choix d'un système tampon activateur peut être expliqué schématiquement par l'utilisation d'un composé qui entre dans la composition du tampon et qui « piège » un des produits de la réaction enzymatique afin de libérer plus rapidement « l'enzyme libre » qui pourra à nouveau transformer une autre molécule de substrat. C'est le cas particulier posé par les PAL, mais qui est applicable à beaucoup d'hydrolases ; exemple : action de la PAL sur le paranitrophénylphosphate.



Au tout début de la réaction, la vitesse de libération du PNP est supérieure à la vitesse de libération de P. Pour ces enzymes, l'étape limitante est donc l'étape d'hydrolyse du complexe enzyme-produit de la réaction, c'est-à-dire du *phosphorylenzyme* (EP). Si le milieu réactionnel contient un alcool qui présente plus d'affinité pour EP que l'eau, il y a diminution de la concentration de EP et déplacement plus rapide de la réaction de gauche à droite, puisque c'est cette étape qui est limitante. Il se forme un ester phosphorique de l'alcool.

La vitesse augmente avec la concentration en alcool et si l'on utilise un *aminoalcool*, on peut tamponner en même temps la réaction en milieu alcalin (phosphatases alcalines).

C. Température

L'effet de la température sur la réaction enzymatique est simple jusqu'à 40 °C : on obtient une accélération de la réaction proportionnelle à cette température. Augmenter la température est donc le moyen le plus pratique pour augmenter la sensibilité de la méthode. Pour un gain de 10 °C, on peut pour certaines réactions doubler la vitesse. En règle générale, on obtient un gain de 5 à 10 % de vitesse par degré, ce qui rend obligatoire la thermorégulation à 0,05 °C près. Au-delà de 40 °C, un phénomène commence à apparaître : la *dénaturation* de l'enzyme, elle-même fonction du temps. Nous voyons sur la *figure 3* qu'à 60 °C la vitesse est plus élevée qu'à 30 ou 40 °C pendant un temps très court. Donc, *la vraie température optimale pour un essai est la température pour laquelle l'enzyme présente une activité constante pendant une période de temps au moins aussi longue que le temps de l'essai.*

La température est en relation directe avec la vitesse de la réaction, et par conséquent avec la consommation en substrat. Aussi, pour une même concentration en enzyme et une concentration saturante en substrat à 30 °C pendant 3 minutes, la concentration est également saturante à 25 °C, mais pas forcément à 37 °C. Notons que 30 °C est un compromis dans la mesure où les enzymes du plasma sont fragilisées dans un environnement très différent du milieu intracellulaire dans lequel elles sont beaucoup plus concentrées.

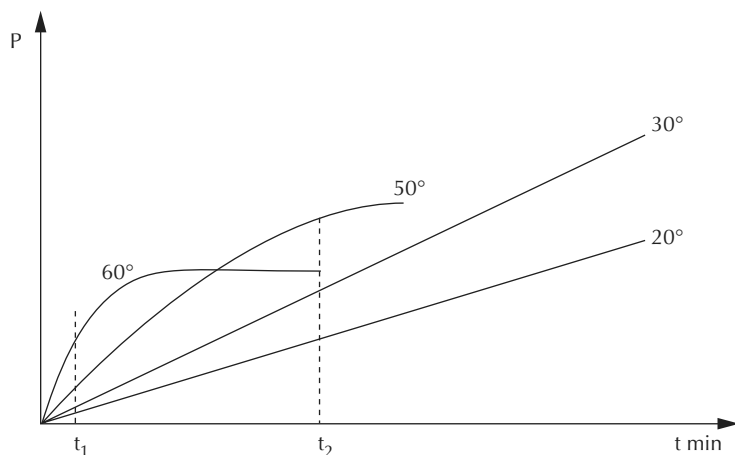


Figure 3. Influence de la température sur la réaction enzymatique
Critères de choix de la température optimale

III. Modalités de la détermination des activités enzymatiques

Nous venons de voir que l'activité catalytique se mesure par la détermination de la V_m de la réaction ou une v_i proche de la V_m . L'aspect pratique de cette mesure repose sur la connaissance de nombreux paramètres qu'il est impératif de maintenir à une valeur constante pendant tout le temps de la mesure. En effet, V_m est fonction de la nature et de la concentration de l'enzyme, de la nature du substrat si l'enzyme en tolère plusieurs, du pH, de la température, et des effecteurs divers. *Stricto sensu*, toutes les méthodes utilisées sont nécessairement des méthodes cinétiques puisque l'on mesure des vitesses dans tous les cas. Il est habituel cependant de faire une distinction entre les méthodes dites « en deux points » (mesure discontinue) et les méthodes dites « cinétiques » qui estiment la pente de la droite correspondant à la V_m (mesure « continue »).

A. Méthodes en deux points : cinétiques en un temps fixé

On mesure la quantité de produit apparue ou la quantité de substrat disparue au bout d'un temps fixé. Ce sont les méthodes qui étaient utilisées au tout début de l'enzymologie et qui le sont encore quand il est impossible de mesurer directement S ou P.

Généralement, on arrête brutalement la réaction au bout du temps fixé soit par action de la chaleur soit par un changement de pH (entre autres) et l'on mesure la concentration en S ou P dans le milieu réactionnel, avec ou sans extraction préalable, à l'aide de n'importe quelle méthode analytique convenable et appropriée.

Exemple : mesure de l'activité de la diamine-oxydase par radiométrie. La méthode utilise comme substrat la ^{14}C -putrescine qui est transformée par la diamine-oxy-

dase en ^{14}C -delta-1-pyrroline. Après quinze minutes exactement, la réaction est arrêtée par l'addition d'un inhibiteur puissant, l'aminoguanidine. Le produit de la réaction (pyrroline) est extrait sélectivement par un liquide scintillant et la radioactivité de la pyrroline marquée est mesurée à partir de cet extrait.

Remarque : mise à part la faible praticabilité de ces méthodes, peu automatisables et consommatrices de temps, leur valeur n'est pas inférieure à celle des autres si les conditions opératoires sont rigoureuses et standardisées (température, pH, substrats, limite de linéarité...). C'est, en fait, le nombre d'étapes nécessaires à la mesure de la concentration de substrat ou de produit en fin de réaction qui, en augmentant les causes d'erreurs, conditionne la reproductibilité des résultats. Ces méthodes sont remplacées avantageusement par les méthodes immunologiques qui mesurent directement la protéine-enzyme (ex. : dosage de la rénine).

B. Méthodes cinétiques directes

La mesure de la vitesse de la réaction est effectuée de façon continue. En fait, la variation d'un signal est appréciée dans des temps très rapprochés. Cette façon d'opérer permet de calculer, dans de bonnes conditions, la pente de la droite correspondant à la vitesse de la réaction. Seules quelques méthodes analytiques sont adaptées à cette mesure directe dans le milieu réactionnel. Ce sont essentiellement la spectrophotométrie d'absorption dans le visible et l'ultraviolet, la spectrofluorimétrie, la turbidimétrie, la conductimétrie, la potentiométrie et la polarographie.

1. Spectrophotométrie d'absorption

On enregistre en continu une variation d'absorbance (densité optique) en fonction du temps : dA/dt .

Plusieurs cas sont à envisager :

- le substrat n'absorbe pas à une longueur d'onde donnée alors que le produit absorbe. On suit par conséquent l'augmentation d'absorbance. Exemple : Substrats qui libèrent le paranitrophénol en milieu alcalin ($\lambda = 405 \text{ nm}$) ou transformation du NAD^+ en NADH, H^+ ($\lambda = 340 \text{ nm}$) ;
- le produit n'absorbe pas à une longueur d'onde donnée alors que le substrat absorbe, on mesure donc une diminution d'absorbance. Exemples :
 - $\text{NADH}, \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$ ($\lambda = 340 \text{ nm}$),
 - acide urique \rightarrow allantoiné ($\lambda = 293 \text{ nm}$) ;
- il existe une différence d'absorption entre le substrat et le produit à une certaine longueur d'onde. Il est encore possible de suivre la cinétique en utilisant un coefficient d'extinction molaire différentiel. En effet, la loi d'additivité des absorbances permet d'écrire pour un trajet optique de 1 cm :

$$A_\lambda = \varepsilon\lambda_s |S| + \varepsilon\lambda_p |P|$$

Par un artifice de calcul faisant ressortir $|S| + |P|$ on a :

$$A_\lambda = \varepsilon\lambda_s (|S| + |P|) + (\varepsilon\lambda_p - \varepsilon\lambda_s)|P|$$

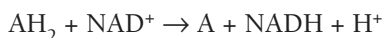
- $\varepsilon\lambda_s$ et $\varepsilon\lambda_p$ sont les coefficients d'extinction molaire de S et P respectivement pour 1 cm de trajet optique (= épaisseur de la cuve de mesure).

Pour une réaction enzymatique, à chaque instant, le substrat est transformé en produit. Si on s'exprime en moles, la concentration de $|S| + |P|$ est une constante. Il s'ensuit que la variation de $A\lambda$ est fonction uniquement de la variation de P : le coefficient d'absorption molaire différentiel ($\epsilon\lambda_p - \epsilon\lambda_s$) étant le facteur de proportionnalité. Dans des conditions opératoires données, la longueur d'onde choisie devra nécessairement correspondre à la valeur la plus élevée de ce coefficient pour obtenir la meilleure sensibilité de la méthode.

a) Utilisation du coenzyme NAD en spectrophotométrie

■ Réactions

Ce coenzyme d'oxydoréduction est en grande partie responsable, par ses qualités, du développement des méthodes spectrophotométriques en enzymologie ; il est commun à de nombreuses oxydoréductases qui apportent la spécificité à la réaction catalysée.



Les réactions enzymatiques pour lesquelles le NAD est impliqué sont considérées comme des réactions à deux substrats. En conséquence, la concentration de NAD (ou NADH) doit être choisie selon les mêmes critères que dans le cas des substrats. La variation de NAD (ou NADH), puisqu'il interagit mole à mole avec le substrat, est directement utilisable pour mesurer la vitesse de la réaction. Les mêmes avantages sont retrouvés pour le couple $NADP^+/NADPH, H^+$.

■ Qualités du couple NAD/NADH en enzymologie

Le spectre d'absorption (fig. 4) présente un maximum d'absorbance à 340 nm pour le NADH alors que le NAD^+ n'absorbe pas à cette longueur d'onde.

Le coefficient d'extinction différentiel est élevé. Cette absorption dans le proche UV ne nécessite pas l'emploi de cuves spéciales.

En l'absence d'enzyme, le NADH est peu auto-oxydable et sa conservation est bien supérieure à celle d'autres composés fréquents dans les milieux réactionnels.

b) Utilisation du coefficient d'extinction molaire pour le calcul des activités à partir des variations d'absorbance

Dans la pratique quotidienne, on n'enregistre plus en continu la variation d'absorbance. On mesure l'absorbance à intervalles de temps réguliers et rapprochés (entre la seconde et 15 secondes selon les automates) ce qui permet une bonne estimation de la pente obtenue par différents modes de calcul (voir plus loin). La pente $\Delta A/\Delta t$ devient $\Delta A/\Delta t$ correspondant à la V_m mesurée.

Connaissant le coefficient d'extinction molaire de la substance qui absorbe à la longueur d'onde choisie, on calcule l'activité en UI/L ou kat/L :

$$A = \epsilon \cdot I \cdot C \quad C = \frac{A}{\epsilon \cdot I}$$

avec :

- ϵ = l'absorbance A d'une solution à 1 mole/L mesurée pour un trajet optique de 1 cm ;
- c = concentration molaire dans la cuve de S ou P mesuré ;
- I = trajet optique = épaisseur de la cuve en cm.

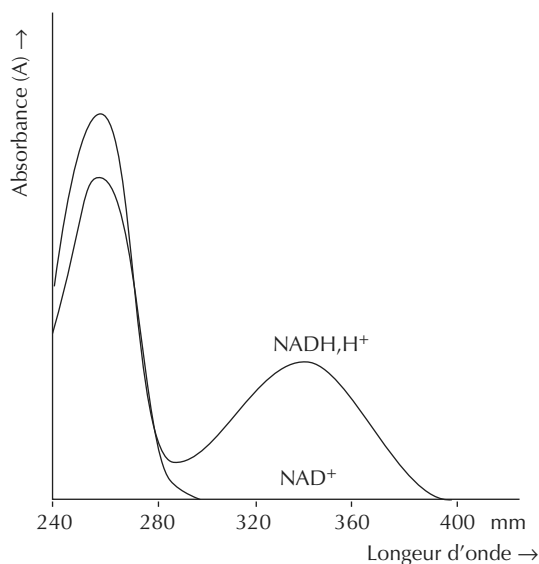


Figure 4. Absorbance du NAD^+ et du NADH, H^+ en fonction de la longueur d'onde. NADP^+ et NADPH, H^+ présentent les mêmes courbes d'absorption

On a :

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon \cdot l} = \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

Si l'enzyme est diluée dans le milieu réactionnel, V_t le volume total du milieu réactionnel après addition de l'enzyme et V_e le volume de solution contenant l'enzyme (sérum), on obtient :

$$\text{U/L} = \frac{V_t}{V_e} \times \frac{10^6}{\epsilon \cdot l} \times \frac{\Delta A}{\Delta t(\text{minutes})}$$

$$\text{kat/L} = \frac{V_t}{V_e} \times \frac{1}{\epsilon \cdot l} \times \frac{\Delta A}{\Delta t(\text{sec})}$$

Si les conditions opératoires (dilution et temps) sont identiques, un coefficient (encadré) permet de calculer aisément les activités à partir des variations d'absorbance.

2. Spectrofluorimétrie

Dans la mesure où, après excitation, le substrat ou le produit d'une réaction émet une fluorescence, la spectrofluorimétrie est utilisable pour la mesure de l'activité enzymatique. L'avantage principal de cette méthode réside dans la grande sensibilité de la mesure (jusqu'à 100 fois plus sensible que la spectrophotométrie). Les composés les plus utilisés sont le NADH, H^+ qui absorbe à 340 nm et émet à 460 nm, les substrats synthétiques des estérases, des phosphatases et des glycosidases qui libèrent la 4-méthyl-ombellifénone. Quoiqu'il en soit, l'intensité de l'émission soit proportionnelle à l'intensité de l'excitation, il n'est pas possible de compenser

indéfiniment, par une augmentation de cette dernière, les trop faibles concentrations de produits obtenus.

3. Turbidimétrie

Les problèmes qui limitent l'emploi de cette méthode en enzymologie sont les problèmes généraux de la turbidimétrie (appareillage mal adapté aux grandes séries, difficulté de la mesure, etc.) et la difficulté en enzymologie d'obtenir de façon reproductible des suspensions de substrats stables.

Un exemple de dosage en turbidimétrie nous est fourni par la lipase. L'abaissement de la turbidité d'une suspension de triglycérides par l'action de la lipase permet de suivre facilement la vitesse de la réaction catalysée par cette enzyme.

4. Conductimétrie

Les réactions enzymatiques dont les produits sont ionisés, alors que le substrat ne l'est pas, peuvent être mesurées grâce à l'augmentation de la conductivité du milieu réactionnel.

5. Potentiométrie

La mesure du pH par une électrode spécifique est théoriquement utilisable quand la réaction enzymatique libère des protons. L'action de la lipase sur un triglycéride libère des acides gras titrables par la soude. En fait, l'acidité libérée est titrée automatiquement au fur et à mesure de son apparition dans le milieu réactionnel par une solution de soude qui maintient le pH constant. La pente de la courbe obtenue (quantité de soude ajoutée en fonction du temps) permet de mesurer l'activité de la lipase.

6. Polarographie

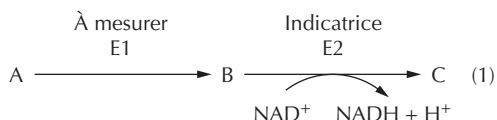
Une électrode sensible aux variations d'oxygène, qui est le substrat de nombreuses oxydases, permet la mesure de l'oxygène consommé en fonction du temps. Le peu d'intérêt présenté jusqu'à présent par ces enzymes en biologie clinique réduit considérablement l'utilisation de cette méthode qui est réservée plutôt au dosage des substrats de ces mêmes oxydases (glucose, cholestérol).

C. Méthodes cinétiques indirectes utilisant des réactions consécutives

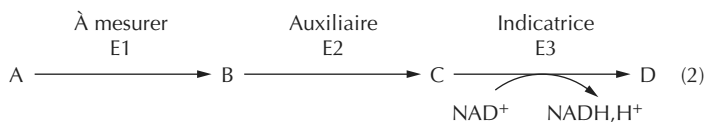
Quand le substrat ou la coenzyme éventuel ne présente pas de propriétés spectrales utilisables, la réaction enzymatique ne peut pas être étudiée en continu. Par contre, si par chance l'un des produits de la réaction étudiée est le substrat d'une déshydrogénase ayant pour coenzyme le NAD ou le NADP, il devient possible de coupler les deux réactions enzymatiques dans la même cuve de mesure : la deuxième réaction devient indicatrice de la première.

Les avantages sont évidents puisque, d'une part, la sensibilité de la mesure spectrophotométrique du NAD est conservée, et, d'autre part, la spécificité des réactions enzymatiques permet le dosage du produit de la première réaction dans un milieu complexe. Habituellement, en biochimie clinique, on utilise deux ou trois réactions consécutives :

- *deux réactions consécutives* (ex. : transaminases) :



- il va de soi que selon la nature de B et E2, la réaction indicatrice peut aboutir soit à la formation de NAD^+ , soit à la formation de NADH, H^+ ;
- *trois réactions consécutives* (ex. : créatine-kinase) :



Dans les deux cas et, d'une façon générale, la réaction que l'on désire mesurer est la réaction catalysée par l'enzyme E1. *Il faut que la vitesse d'apparition ou de disparition du NADH, H^+ dans le milieu soit proportionnelle à la quantité d'enzyme E1 c'est-à-dire à la vitesse de disparition de A.* Pour ce faire, il suffit que les vitesses des réactions indicatrices et auxiliaires soient très supérieures ($\times 100$) à la vitesse de la réaction à mesurer (E1) qui devient ainsi limitante. Ces conditions sont facilement réalisées si les concentrations des enzymes auxiliaires et indicatrices sont très élevées par rapport à l'enzyme à mesurer et si la concentration de A dans le milieu reste saturante pour l'enzyme E1 pendant le temps de la mesure. Le milieu d'incubation contiendra, dans le cas de deux réactions consécutives, l'enzyme E1 (sérum), l'enzyme E2 et le NAD^+ . Le démarrage de la réaction s'effectuera par l'addition de A.

Remarque

Ce principe peut être utilisé à d'autres fins. Dans certains cas et en changeant les conditions opératoires, la mesure de l'activité catalytique de E2 (par ex.) peut être réalisée ainsi.

Concrètement, la mesure de l'aspartate-aminotransférase (ASAT) sérique est classiquement effectuée selon le schéma réactionnel (3), mais cette technique peut également servir à la mesure de l'activité catalytique de la malate-déshydrogénase (MDH) en modifiant les conditions opératoires. En effet, l'oxaloacétate qui est le substrat de la MDH est instable (décarboxylation spontanée) ; si l'on forme ce substrat *in situ*, la mesure de la MDH devient réalisable.



Dans cet exemple, une forte quantité d'ASAT et des substrats de cette enzyme produisent l'oxaloacétate nécessaire au dosage de la MDH. La réaction indicatrice est ici la réaction limitante contrairement au cas général.

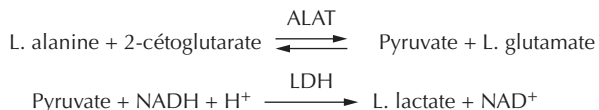
1. Contraintes apportées par l'utilisation des réactions consécutives en biochimie clinique

Dans ce type de réaction, l'addition dans le milieu réactionnel d'enzyme et de coenzyme en présence de sérum pose un certain nombre de problèmes plus ou moins contournables :

- le NAD^+ est le coenzyme d'une cinquantaine de déshydrogénases présentes dans le sérum ;
- les produits intermédiaires sont très souvent des substrats d'enzymes diverses présentes dans le sérum. Il y a forcément des interférences qu'il faut éliminer ou minimiser. Deux exemples nous aideront à saisir toute l'importance de ce problème :

a) Élimination d'un métabolite présent dans le sérum et qui interfère avec la réaction indicatrice

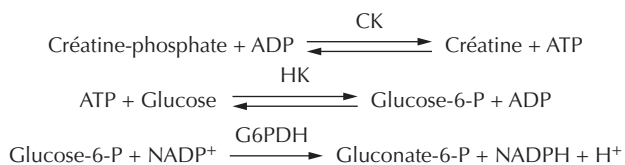
La mesure de l'activité catalytique de l'alanine-aminotransférase (ALAT) utilise deux réactions consécutives :



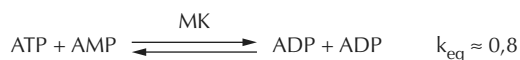
Une consommation de NADH parasite se produira inévitablement au tout début de la réaction. Cette réaction est le résultat de la présence de pyruvate et de lactate-déshydrogénase (LDH) dans le sérum (pyruvate endogène). La forte concentration de LDH ajoutée va rapidement éliminer ce pyruvate et la mesure spécifique du pyruvate formé par la réaction pourra s'effectuer. La façon d'éliminer cette interférence consiste à préincuber le sérum en présence de tous les réactifs excepté le substrat (2-céto-glutarate). Ce temps de préincubation, dans le cas présent, sert aussi à la réactivation de l'ALAT par sa coenzyme (phosphate de pyridoxal).

b) Inhibition d'une enzyme qui interfère avec la réaction principale

La mesure de l'activité de la créatine-kinase (CK) de localisation musculaire est effectuée grâce à trois réactions consécutives :



La myokinase (MK) présente dans le muscle et dans le sérum catalyse également la réaction hautement réversible :



Elle est donc susceptible de perturber la mesure de l'ATP formé. L'addition d'un inhibiteur spécifique de la MK au milieu réactionnel permet d'éliminer cette réaction parasite.

2. Traitement du signal dans les méthodes cinétiques

Le signal mesuré en photométrie est une transmission qui est linéarisée par une transformation logarithmique en absorbance qui seule est directement proportionnelle aux concentrations. Ce premier traitement du signal est intégré au photomultiplicateur.

a) Méthode manuelle

La méthode manuelle pour mesurer la pente de la droite (variation d'absorbance en fonction du temps) se résume à déterminer l'absorbance toutes les minutes pendant deux à trois minutes. On calcule ensuite la moyenne des variations d'absorbance par minute (à condition que ces valeurs fluctuent autour d'une valeur moyenne).

b) Méthode des « deltas »

Elle est représentée sur la figure 5.

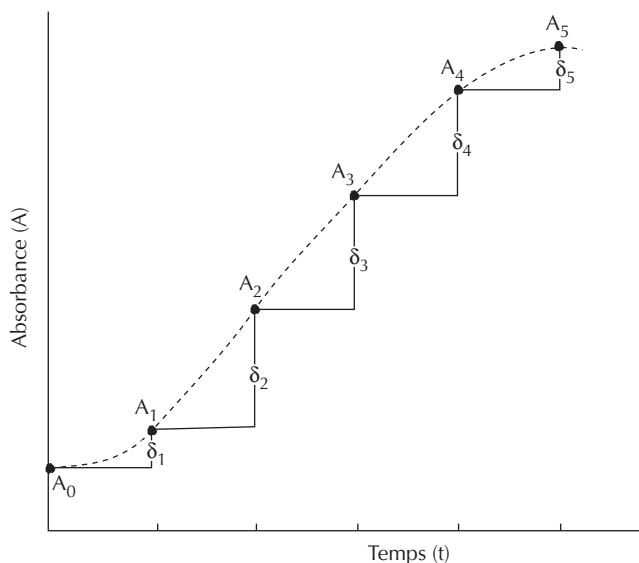


Figure 5. Représentation de la méthode de calcul des « deltas »

Les appareillages modernes permettent d'augmenter le nombre de mesures et de raccourcir les temps de lecture, mais le principe du mode de calcul est conservé. C'est la méthode dite des « deltas » qui n'est donc qu'une automatisation de la méthode manuelle. Dans la figure 5, les valeurs δ_2 , δ_3 , δ_4 sont très voisines et sont retenues pour le calcul, alors que les valeurs δ_1 et δ_5 sont rejetées.

c) Méthode par régression linéaire

Elle est représentée sur la *figure 6*.

Cette méthode compare un grand nombre d'absorbances rapprochées dans le temps. Un calcul est ensuite effectué pour obtenir des pentes (b) à partir d'un certain nombre de points (4, 5, ou plus selon les automates).

Les valeurs de b ainsi obtenues sont comparées entre elles : dans le cas représenté sur la *figure 6*, seules les valeurs de b_1 à b_3 sont retenues. Enfin, une pente moyenne (b_n) est déterminée pour le calcul de la vitesse.

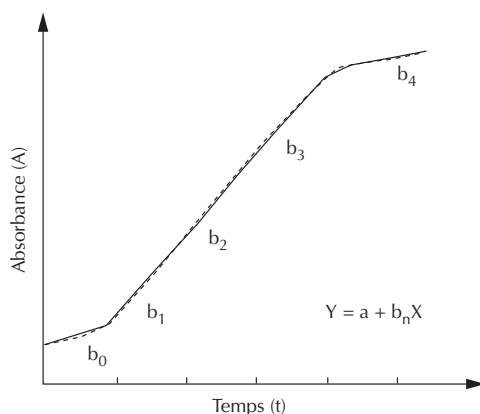


Figure 6. Représentation graphique de la méthode de calcul par régression linéaire

d) Méthode par intégration

Elle est représentée sur la *figure 7*.

Dans cette méthode, on compare les aires obtenues sous la courbe expérimentale par unité de temps. Seules les surfaces très proches sont retenues.

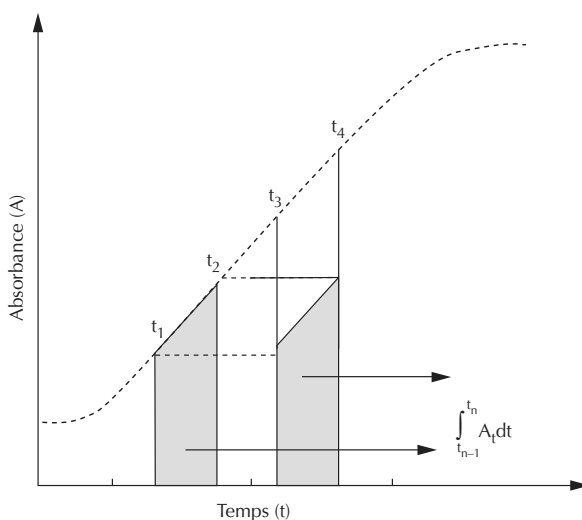


Figure 7. Représentation graphique de la méthode de calcul par intégration des surfaces sous la courbe obtenue

Les avantages et les inconvénients de ces différentes méthodes ne peuvent être exposés ici. Mais il faut remarquer que la mesure de très petites variations d'absorbance est en fait limitée par le « bruit » optique du milieu réactionnel.

IV. Mesures des activités des formes isozymiques (isoenzymes)

Comme la plupart des protéines, les enzymes présentent des variations d'origine génétique dans leur structure primaire qui modifient leur effet catalytique et leurs propriétés physicochimiques. La mesure sélective d'une ou plusieurs formes isozymiques permet dans quelques cas d'améliorer le diagnostic d'une maladie dans la mesure où une répartition particulière des isoenzymes est observée dans l'organe intéressé par cette pathologie. Plusieurs méthodes sont actuellement disponibles.

A. Séparation des isoenzymes par électrophorèse et détection des activités *in situ*

Cette méthode est employée lorsqu'il existe un substrat chromogène dont le produit de la réaction enzymatique, très peu soluble (à faible pouvoir de diffusion), précipite dans le support de l'électrophorèse au niveau de la zone contenant l'isoenzyme correspondante.

Exemple : les sels de tétrazolium (insolubles et colorés sous forme réduite) permettent la détection des formes isozymiques des déshydrogénases ayant comme coenzyme le système $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$.

B. Mesure différentielle de l'activité après dénaturation thermique

Si l'une des formes isozymiques est plus sensible qu'une autre à l'action dénaturante de la chaleur, cette propriété est utilisée.

Exemples : l'isoenzyme M_4 de la LDH (LDH_2) est complètement dénaturée à 57°C au bout de 30 minutes tandis que l'isoenzyme H_4 (LDH_1) résiste à ce même traitement. C'est le cas aussi de la PAL osseuse, plus vite dénaturée que l'isoenzyme hépatique ; les PAL placentaires sont thermorésistantes.

C. Mesure directe sélective d'une isoenzyme à l'aide d'un analogue du substrat

En effet, si l'enzyme tolère plusieurs substrats, il est rare que chaque isoenzyme présente des constantes catalytiques identiques pour un même substrat.

Exemple : les isoenzymes H_4 et M_4 de la LDH présentent des constantes catalytiques (kcat) différentes avec le 2-oxobutyrate et le pyruvate :

	H_4	M_4
2-oxobutyrate	850 s^{-1}	170 s^{-1}
Pyruvate	800 s^{-1}	670 s^{-1}

La vitesse maximale (V_m) mesurée expérimentalement pour un mélange à parties égales de H_4 et M_4 est le résultat pour $4/5$ de H_4 et pour $1/5$ de M_4 si on utilise le 2-oxobutyrate comme substrat. Si la concentration en M_4 est faible, la sélectivité de la mesure est évidemment augmentée (c'est le principe de dosage de l'alpha HBDH ou H_4).

D. Inhibition sélective d'une forme isozymique par un inhibiteur ou par un anticorps constitue une méthode complémentaire différentielle

Exemples :

- l'isoenzyme d'origine placentaire de la PAL est inhibée assez sélectivement par la L-phénylalanine alors que les isoenzymes non spécifiques de tissu (foie, os, reins...) sont inhibées par le lévamisole ;
- l'activité de l'isoenzyme MB de la CK peut être estimée par la mesure de l'activité différentielle de la CK en l'absence et en présence d'un anticorps dirigé contre la fraction M de la protéine enzymatique.

E. Méthodes immunologiques

Si aucune des méthodes précédentes n'est applicable, un dernier procédé consiste à préparer un anticorps spécifique de l'isoenzyme désirée et à mesurer directement le complexe antigène-anticorps sans faire appel aux propriétés catalytiques de l'enzyme.

V. Précautions à prendre pour la mesure d'une activité enzymatique

Le développement considérable de l'enzymologie clinique est évident, il s'est accompagné d'une amélioration de la praticabilité des méthodes employées mais les réactifs, par contre, sont devenus de plus en plus complexes. Le biologiste devient actuellement incapable de fabriquer son propre milieu réactionnel mais son souci primordial est d'obtenir des résultats fiables et reproductibles. C'est pourquoi nous nous limiterons aux précautions à prendre pour utiliser un réactif commercialisé prêt à l'emploi. Cela nous rapproche plus des réalités pratiques tout en nous permettant d'appliquer certaines des données théoriques précédentes.

A. Choix de la méthode : standardisation, optimisation

Le problème s'est sérieusement simplifié depuis l'apparition des méthodes standardisées. En effet, de nombreuses méthodes ont été éliminées en partie parce qu'elles n'étaient pas automatisables mais aussi parce que leur reproductibilité ou leur sensibilité étaient défectueuses. Une autre contrainte, cette fois propre à la biologie clinique, a favorisé la standardisation des méthodes : les résultats d'enzymologie (exprimés en UI/L) ne peuvent être comparés que si les conditions opératoires sont strictement identiques. Des efforts considérables ont donc été fournis à l'échelon national (Société française de biologie clinique) et international (International federation of clinical chemistry) pour choisir les méthodes les plus appropriées.

La *standardisation* consiste, dans un premier temps, à choisir le principe de la méthode ; exemple : mesure de l'activité de l'ASAT par deux réactions consécutives avec mesure spectrophotométrique du NADH^+ consommé.

Puis, dans un second temps, la standardisation s'est étendue au choix de tous les paramètres : température, pH, nature du tampon, des substrats et des cofacteurs nécessaires, élimination des réactions parasites.

Enfin, dans un troisième temps, l'*optimisation* a consisté à déterminer pour chaque paramètre la concentration qui optimise, c'est-à-dire qui rend maximale la vitesse de réaction pour une concentration donnée en enzyme. Les méthodes d'évaluation des principales activités enzymatiques du sérum sont actuellement standardisées et optimisées. Ce sont de toute évidence les méthodes recommandées par les différentes sociétés savantes. Seule la standardisation de la température (25, 30, 37 °C) pose encore quelques problèmes au niveau international : rappelons qu'une activité enzymatique mesurée à 30 °C ne doit pas être extrapolée à 37 °C (et vice versa).

Quelle méthode choisir s'il n'existe pas de méthode recommandée pour la mesure de l'activité désirée ?

La solution à ce problème est difficile car elle est particulière à chaque enzyme. Le tout est de trouver une *méthode acceptable pour les besoins de la clinique*. Ex. : pour le dosage de l'activité alpha-amylasique du sérum, il est de beaucoup préférable d'utiliser comme substrat un polysaccharide de faible masse moléculaire parfaitement défini, plutôt que l'amidon préhydrolysé ou des mélanges de dextrans dont les compositions sont obligatoirement variables d'un lot à l'autre. En effet, en l'absence d'étalonnage, le manque de reproductibilité de ce type de substrats conditionne la mauvaise reproductibilité de la méthode.

B. Utilisation d'un réactif prêt à l'emploi

Il est impératif de respecter scrupuleusement les conditions opératoires précisées dans la méthode. Celles-ci peuvent se décomposer ainsi :

1. Température

C'est le facteur qui influence le plus la vitesse de la réaction. Un gain de 10 °C double approximativement la vitesse. Une thermorégulation efficace de la réaction est donc nécessaire à $\pm 0,05$ °C près. La température doit être celle pour laquelle la méthode a été standardisée.

2. Ordre d'introduction des réactifs et préincubation

Mis à part les précautions à prendre pour reconstituer les réactifs, l'ordre d'introduction de ces derniers et la préincubation doivent être rigoureusement respectés car ils permettent de mettre en température le milieu réactionnel, de réactiver l'enzyme éventuellement, d'éliminer les interférences des réactions parasites lorsqu'il y a lieu.

En pratique, le sérum est incubé en présence de l'ensemble des réactifs (tampons, coenzymes, et enzymes éventuelles des réactions consécutives) sauf le substrat spécifique de l'enzyme à mesurer. Celui-ci est utilisé à la fin de cette phase pour démarrer la réaction (fig. 8).

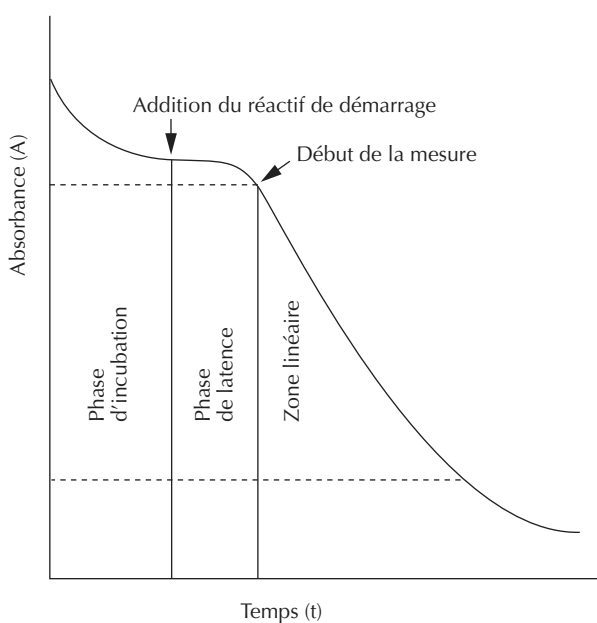


Figure 8. Schéma d'une réaction en enzymologie

3. Mesure de la vitesse et calcul des résultats

Une phase de latence est observée fréquemment lors des réactions simples (LDH, PAL). Pendant ce laps de temps, une vitesse variable est constatée et ne doit pas être mesurée.

Le calcul des activités (UI/L) s'effectue à partir de la pente de la zone linéaire en utilisant le coefficient défini précédemment en vérifiant que le trajet optique du spectrophotomètre utilisé correspond bien à celui qui a servi à l'établir.

4. Blanc réactif et blanc sérum

Deux types de blancs peuvent être pratiqués : le blanc réactif contrôle la stabilité du réactif et la présence éventuelle d'enzymes contaminant les enzymes indicatri-

ces (ex. : traces de transaminases dans la MDH). Ce blanc est pratiqué une fois par lot de réactifs. Dans certains cas un blanc sérum permettra d'évaluer l'efficacité de l'élimination des réactions parasites par la préincubation. Il est inutile pour les méthodes recommandées.

5. Linéarité

Un réactif prêt à l'emploi impose à l'utilisateur une concentration de substrat calculée pour rester à saturation pour les activités habituellement rencontrées dans le sérum. Pour les activités enzymatiques trop élevées, le substrat ne restant pas à saturation pendant toute la durée de la mesure, la vitesse n'est plus constante, ce qui est contraire au principe même de la méthode. La seule solution est de diluer l'enzyme afin de retrouver des activités convenables.

Chaque méthode comporte donc une limite de linéarité exprimée soit en activité soit en variation d'absorbance. Seules les valeurs inférieures ou égales à cette limite sont utilisables.

Remarques : la limite de linéarité dépend, comme nous venons de le voir, des concentrations respectives en substrat et en enzyme. Elle est fonction aussi de la durée de la mesure (elle augmente quand le temps de mesure se raccourcit) et de la température (quand la température augmente, la consommation de substrat augmente et la limite de linéarité diminue).

6. Adaptation d'une méthode à un autoanalyseur

Les méthodes recommandées sont toujours manuelles. C'est généralement le fabricant du réactif qui étudie cette adaptation. La plupart des appareils peuvent respecter les contraintes des protocoles opératoires (température, préincubation, démarrage, temps de mesure, taux de dilution du sérum dans le milieu réactionnel, etc.). Toute modification du protocole due à l'adaptation à l'appareillage doit être rigoureusement contrôlée afin de vérifier son influence sur le résultat. En effet, cela est une cause fréquente de variabilité des résultats interlaboratoires.

7. Contrôle de qualité des mesures

Comme nous l'avons vu, l'étalonnage des mesures des activités enzymatiques dans le sérum est utopique. En revanche, l'utilisation de sérums dosés en contrôle de qualité devient une nécessité absolue pour éviter les biais dans les résultats (coefficient d'extinction molaire erroné, trajet optique mal évalué, obstruction des systèmes de prélèvements, thermorégulation défectueuse, mauvaise adaptation de la méthode, etc.).

Les difficultés rencontrées avec les sérums de contrôle lyophilisés sont d'ordre divers :

- stabilité après la régénération (CK) ;
- réactivation éventuelle de certaines enzymes (PAL : 24 heures) ;
- origine animale de ces sérums dont certaines enzymes peuvent réagir différemment des enzymes humaines.

L'essentiel de la question

On mesure la quantité d'enzyme dans un milieu biologique en déterminant son activité catalytique qui lui est proportionnelle.

L'activité enzymatique se mesure par la vitesse de transformation du substrat de l'enzyme en produit. En l'absence d'étalonnage, on doit mesurer une vitesse maximale obtenue par saturation de l'enzyme en substrat.

La vitesse maximale (V_m) dépend de la concentration d'enzyme, de la nature du substrat, des différents effecteurs (pH, tampons, température).

Les méthodes utilisées mesurent une vitesse de réaction soit en temps préfixé avec arrêt de la réaction et mesure des produits, soit par une mesure directe en continu s'il existe une différence suffisante entre les coefficients d'extinction molaire du substrat et du produit.

Les propriétés intéressantes de la coenzyme NAD sont exploitées quand le substrat ou le produit de l'enzyme à mesurer ne présentent pas de propriétés spectrales utilisables. On utilise deux ou trois réactions consécutives catalysées par des enzymes ajoutées. La réaction indicatrice catalyse une déshydrogénase ayant comme coenzyme le NAD ou le NADP.

L'addition d'enzymes apporte un certain nombre de contraintes (préincubation). La réaction à mesurer doit être limitante pour les réactions suivantes.

Les méthodes utilisées doivent être standardisées et optimisées.