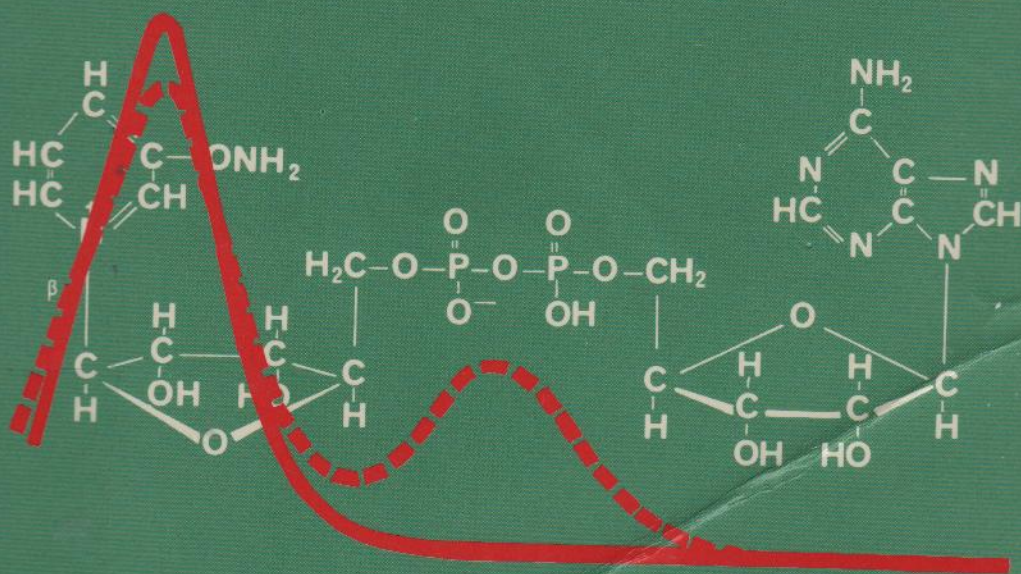


Principes de l'analyse enzymatique

Hans Ulrich Bergmeyer

avec la collaboration de K. Gawehn *et al.*

Coordonnateur de la traduction française : Monique Mathieu



TECHNIQUE & DOCUMENTATION

L'activité catalytique des enzymes rend plus facile la détermination des substances contenues dans un composé d'origine naturelle évitant ainsi de longs et difficiles procédés de séparation.

Grâce à l'apparition d'appareils de plus en plus performants, ces techniques de mesure se sont considérablement affinées, permettant la généralisation de ce procédé.

Cette méthode d'analyse a trouvé sept principaux domaines d'application : biochimie et chimie organique ; chimie alimentaire ; chimie des cosmétiques ; botanique et chimie de l'agriculture ; microbiologie ; pharmacologie ; chimie clinique.

Dans ces spécialités, l'analyse enzymatique présente de nombreux avantages et le nombre de paramètres que l'on peut définir augmente régulièrement. La détermination de substances dépourvues d'activité enzymatique, mais immunologiquement actives, grâce à l'activité catalytique d'enzymes « marqueurs », évolue tellement à l'heure actuelle qu'on ne peut estimer les limites de ce champ d'application.

Cet ouvrage, traduit de l'édition anglaise de 1978, est le premier en langue française à faire le point sur cette technique d'analyse appelée à se généraliser dans les années à venir. Nul doute qu'il rendra de grands services à tous ceux qui désirent acquérir les principes et connaître les méthodes des analyses enzymatiques. ■

Traducteurs : Y. Artur, Cl. Dorche, D. Grafmeyer, Cl. Junien, P. Lalegerie, M. Mathieu, G. Plomteux, M.O. Rolland, A. Vassault.

TABLE DES MATIÈRES

Préface.....	7
Abréviations	12
I INTRODUCTION	17
1 TERMINOLOGIE, IMPORTANCE ET LIMITES DE L'ANALYSE ENZYMATIQUE	17
2 NOMENCLATURE ET UNITÉS EN ENZYMOLOGIE	23
II PRINCIPES THÉORIQUES	29
3 CINÉTIQUES DE RÉACTION	29 X
3.1 Principes des cinétiques de réaction.....	29
3.2 Cinétiques des réactions catalysées par les enzymes	34
4 DÉTERMINATIONS DES CONSTANTES DE MICHAELIS ET DES CONSTANTES D'INHIBITION.....	46
4.1 Constantes de Michaelis.....	46
4.2 Constantes d'inhibition.....	53
5 DOSAGE DES MÉTABOLITES (MÉTHODES EN POINT-FINAL)	58
5.1 Méthodes point-final simples.....	58
5.2 Déterminations à l'aide de réactions couplées.....	65
6 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES ENZYMES	75
6.1 Facteurs influençant l'activité catalytique.....	75
6.2 Détermination des concentrations optimales en substrat.....	80
6.3 Détermination des conditions optimales pour les réactions auxiliaires et indicatrices dans les réactions enzymatiques couplées.....	88
6.4 Exemples de techniques de mesure.....	96

7	MESURE DE LA CONCENTRATION EN MÉTABOLITES (MÉTHODES CINÉTIQUES)	99
7.1	Généralités sur les cinétiques de réaction.....	99 X
7.2	Dosages cinétiques.....	101
7.3	Dosages catalytiques.....	103
7.4	Cinétiques du "cyclage enzymatique".....	106
8	VISUALISATION DES RÉACTIONS NAD(P) - DÉPENDANTES.	108
8.1	Les sels de tétrazolium et leur réduction.....	108
8.2	Applications aux réactions enzymatiques.....	111
9	PRINCIPES DES DOSAGES IMMUNO-ENZYMATIQUES	113
9.1	Introduction.....	113
9.2	Dosages immuno-enzymatiques en phase hétérogène (EIA/ELISA).....	113
9.3	Dosages immuno-enzymatiques en phase homogène (EMIT)	115
9.4	Conclusion.....	117
III	TRAITEMENT DES RÉACTIFS BIOCHIMIQUES ET DES ÉCHANTILLONS	119
10	RÉACTIFS POUR ANALYSE ENZYMATIQUE.....	119
10.1	Nomenclature, abréviations et standardisation.....	119
10.2	Critères de qualité.....	121
10.3	Conservation, stabilité et contrôle des substances et des solutions.....	127
11	ÉCHANTILLONS.....	130
11.1	Prélèvements.....	130
11.2	Stabilité des métabolites et des enzymes dans l'échantillon.....	131
11.3	Traitement de l'échantillon pour la mesure d'activités enzymatiques.....	135
IV	TECHNIQUES ET APPAREILLAGE	141
12	VOLUMÉTRIE	141
12.1	Introduction.....	141
12.2	Pipettes.....	144
12.3	Distributeurs mécaniques.....	154
13	PHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION	156 X
13.1	Base théorique et terminologie.....	156
13.2	Porte-cuves, cuves, techniques de mesure.....	163
13.3	Sources d'erreur et méthodes de contrôle.....	167
14	AUTRES TECHNIQUES DE MESURE	173
14.1	Conductimétrie.....	173
14.2	Potentiométrie et polarimétrie.....	176

14.3	Microcalorimétrie.....	183
14.4	Techniques de mesure à l'aide d'enzymes immobilisées.....	188
15	AUTOMATION DES ANALYSES.....	195
15.1	Dispositifs automatiques pour l'analyse enzymatique.....	195
15.2	Principe de travail des analyseurs automatiques.....	202
15.3	Analyseurs rapides centrifuges.....	213
16	L'ANALYSE ENZYMATIQUE À L'AIDE DE RADIO-ÉLÉMENTS.....	222
16.1	Généralités	222
16.2	Dosage de substrats à l'aide de radio-éléments.....	225
16.3	Détermination de l'activité catalytique des enzymes à l'aide des radio-éléments.....	228
V	EVALUATION ET CONTRÔLE DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	233
17	DONNÉES EXPÉRIMENTALES.....	233
17.1	Point final non constant.....	233
17.2	Courbes de réaction non linéaire.....	234
17.3	Courbes standards et standards étalons.....	235
18	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET UNITÉS DE RÉFÉRENCE ..	237
18.1	Définition.....	237
18.2	Résultats expérimentaux rapportés au matériel biologique.....	238
19	EXPRESSION ET CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	240
19.1	Terminologie et méthodes en statistiques.....	240
19.2	Interprétation mathématique des résultats expérimentaux.....	244
19.3	Evaluation statistique des résultats.....	247
19.4	Contrôle de qualité.....	255
	Formules	258
	Références bibliographiques.....	263
	APPENDICES.....	279
	Numérotation et classification des enzymes.....	280
	Masses atomiques.....	286
	Système international d'unité.....	288
	Index	295