

Dosage d'un analyte S par méthode enzymatique en phase aqueuse homogène au point final de la réaction.

1.Principe fondamental des méthodes enzymatiques de dosage en phase aqueuse homogène au point final de la réaction.

Soit à doser un analyte S dans un milieu (biologique) complexe contenant S et bien d'autres molécules.

On suppose qu'on dispose d'une enzyme E_z catalysant spécifiquement la réaction

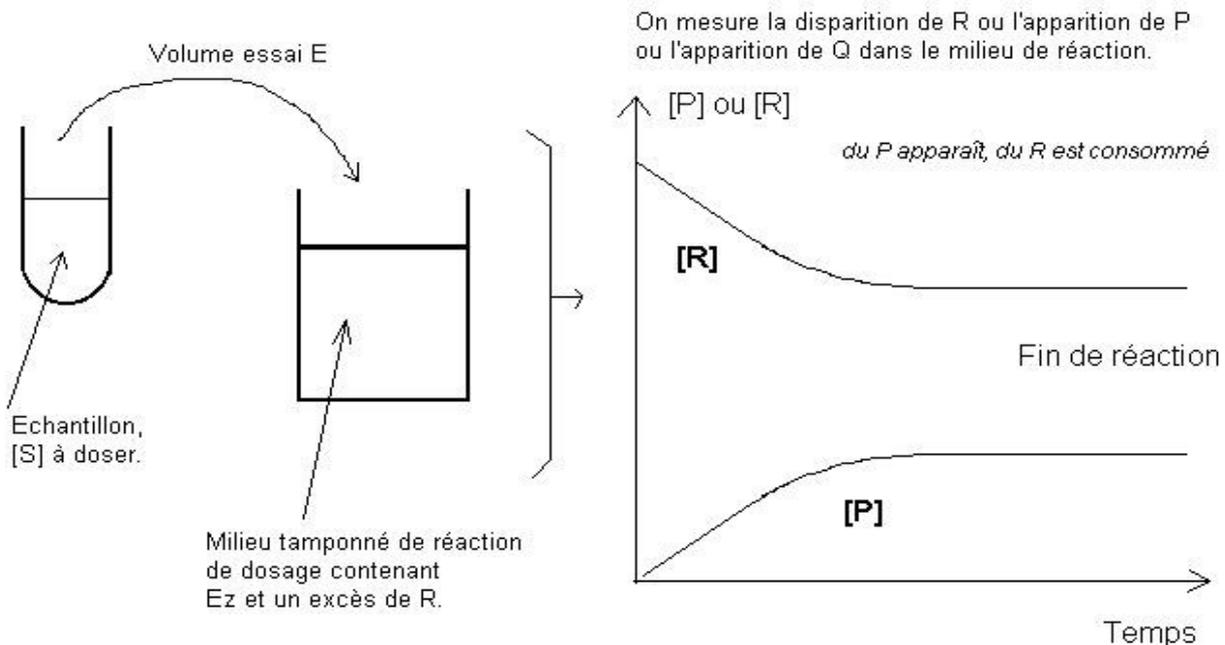


et telle que la réaction soit totale et réalisée en excès stœchiométrique de R par rapport à S. Dans l'équation de réaction présentée ci-dessus, on a choisi un cas de réaction enzymatique bi-bi, R désigne le 2° substrat de l'enzyme que l'on apporte dans le milieu réactionnel et P et Q les produits de la réaction enzymatique.

On suppose de plus qu'on dispose d'une méthode permettant de mesurer simplement la disparition de R ou l'apparition de P ou l'apparition de Q.

Si les conditions ci-dessus sont remplies, on a une méthode de dosage de S enzymatique au point final de la réaction.

Le schéma ci-dessous représente le système décrit :



On a supposé que la réaction est totale avec un excès stœchiométrique de R devant S. Ainsi si on attend suffisamment longtemps, c'est à dire si on attend la fin de la réaction (on dit aussi la complétude de la réaction, en anglais on parle de « end point »), on aura :

$N_{R \text{ disparu}} = N_{P \text{ apparu}} = N_S$ dans le volume essai E. (N_i désigne une quantité de substance i).

$$\text{et } [S]_{\text{échantillon à doser}} = \frac{N_S \text{ dans volume essai E}}{\text{Volume essai utilisé}}$$

2. Cas de la mesure d'une concentration en glucose par méthode à la glucose oxydase

On va illustrer les propos théoriques présentés ci-dessus par un exemple pratique : la mesure d'une concentration en glucose par méthode enzymatique au point final de la réaction.

2.1 La réaction principale du dosage.

La glucose oxydase (GOD) catalyse la réaction : β glucose + O₂ \longrightarrow gluconolactone + H₂O₂

C'est une enzyme très spécifique du β glucose.

Ensuite, la gluconolactone réagit spontanément, rapidement et irréversiblement avec l'eau pour donner :
gluconolactone + H₂O \longrightarrow acide gluconique.

De plus on a l'équilibre α glucose \longleftrightarrow forme ouverte \longleftrightarrow β glucose

On peut donc considérer qu'on dispose - en excès d'O₂ (et pour ça on a tout l'O₂ atmosphérique à disposition !) - d'un ensemble global irréversible qui consommera spécifiquement tout le glucose :
glucose + O₂ + H₂O \longrightarrow acide gluconique + H₂O₂ (grâce à l'enzyme GOD)

2.2 Doser H₂O₂ formé grâce à une réaction enzymatique couplée et par lecture photométrique

L'idée est de mesurer le produit de réaction H₂O₂. En effet, pour chaque molécule de glucose présente dans le volume essai, on obtiendra finalement une molécule d'H₂O₂.

Pour ce faire on va mettre en œuvre une deuxième réaction enzymatique qui consomme H₂O₂ et qui est concomitante à la première et qui conduit à un composé mesurable par photométrie d'absorption moléculaire à 505 nm. On dit en biochimie qu'il y a une réaction couplée utilisée comme réaction indicatrice.

Cette réaction indicatrice est catalysée par l'enzyme peroxydase et est représentable par :

2 H₂O₂ + phénol (excès) + amino-4-antipyrine (excès) \longrightarrow composé coloré 505 nm (quinoéimine) + 4 H₂O

Ainsi, finalement, chaque molécule de composé coloré formé (dosable par photométrie à 505 nm selon la loi de Beer-Lambert) aura pour origine, à la fin de la réaction, 2 molécules de glucose initialement apportées par l'essai à doser. (En effet, 1 glucose donne 1 H₂O₂ qui donne 1/2 composé coloré).

A la fin des deux réactions couplées, on se trouve ramené à un classique dosage de substance à l'aide d'une révélation colorée par un réactif spécifique apporté en excès et réaction totale. Et ça, on connaît bien.

2.3 Existence de kits commerciaux. Instructions opératoires pratiques proposées par un kit

On utilisera un kit commercial. Le kit fourni propose une solution de travail qui contient :

- tampon phosphate (150 mmol/L dans le milieu réactionnel final) ;
- phénol (10 mmol/L dans le milieu réactionnel final) ;
- aminoantipyrine (0,40 mmol/L dans le milieu réactionnel final) ;
- les enzymes GOD (la réaction principale, > 3000 UI/L) et POD (la réaction indicatrice, > 15 000 UI/L).

Remarques :

Ce kit de dosage est essentiellement dédié aux mesures de glycémies dans le cadre d'analyses médicales. Les valeurs usuelles dans le sérum sont de 4,1 à 6,1 mmol/L (0,74 à 1,1 g/L). Le dosage ne nécessite pas de témoin de compensation essai car les 25 μ L de sérum ou plasma à doser apportés n'occasionnent aucune absorbance parasite à 505 nm dans les conditions expérimentales.

Si on désire adapter le protocole à un dosage de glucose dans un autre milieu biologique, il convient de réaliser un témoin de compensation essai et de se préoccuper de la question des interférents (voir paragraphe 2.5).

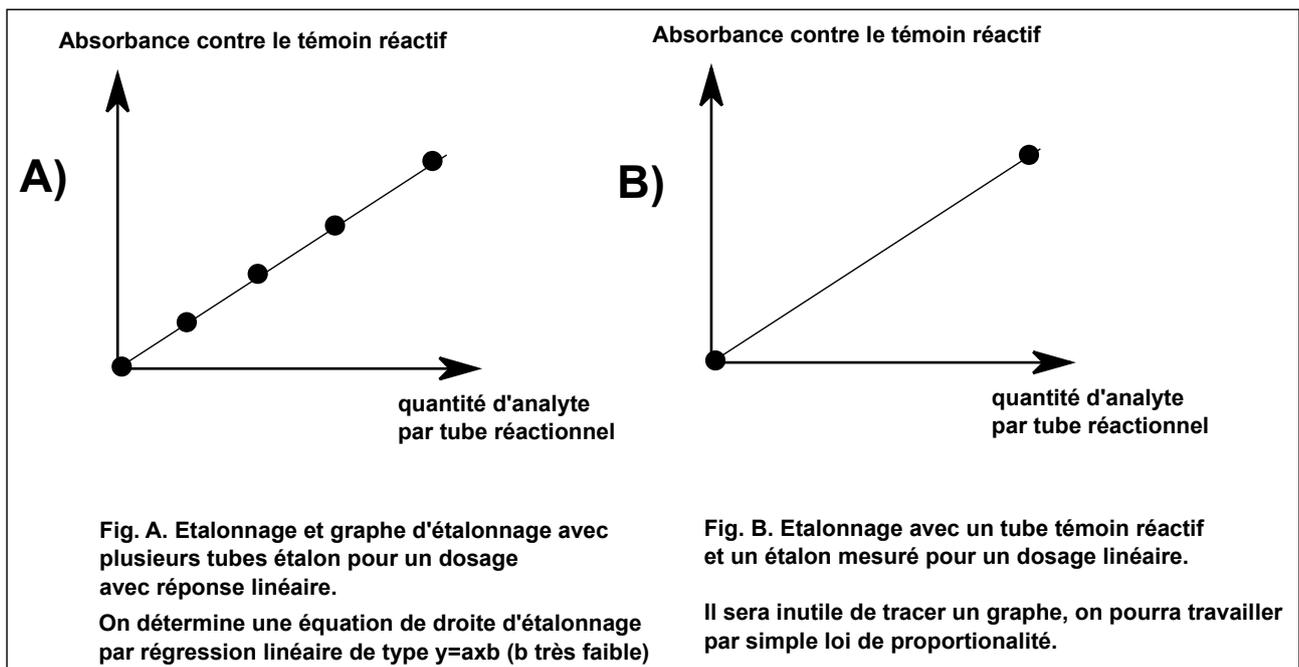
Le mode opératoire pour un dosage est présenté dans le tableau qui suit.

	Témoin réactifs	Etalon	Essai
Eau	E = 20 µL		
solution étalon		E = 20 µL	
Échantillon à mesurer			E = 20 µL
solution de travail	2,00 mL	2,00 mL	2,00 mL
	Homogénéiser puis lire l'absorbance de l'étalon ($A_{\text{étalon}}$) et de l'essai (A_{essai}) contre le témoin réactif à 505 nm quand la réaction est terminée. Il faut 10 minutes à 37°C et 20 minutes à 20°C.		

Le dosage est linéaire jusqu'à 22,2 mol/l (4g/L) en glucose dans l'échantillon.

2.4 Calcul d'une concentration en glucose à partir des résultats d'absorbance lues contre le témoin réactif

Un dosage par méthode enzymatique à complétude de la réaction ne diffère pas fondamentalement de dosages chimiques « colorimétriques » classiques. Il y a juste 2 points remarquables : la spécificité du dosage a une origine enzymatique et les durées pour atteindre la fin de réaction demandent généralement plusieurs minutes (classiquement 10 à 30 minutes ...). Cependant, dans les dosages enzymatiques de substances par méthode enzymatique en phase homogène au point final de la réaction, il est rare de construire une « gamme d'étalonnage » classique ((absorbance étalon – absorbance témoin réactif) = f(quantité par tube réactionnel)), même si c'est évidemment réalisable. Et ceci pour une vulgaire raison de coût élevé. On utilise le fait que l'étalonnage ((absorbance étalon – absorbance témoin réactif) = f(quantité par tube réactionnel)) est linéaire (droite qui passe par O(0,0), loi de proportionnalité) et on se contente de ne réaliser qu'un unique étalon et un point origine (0,0). Deux points suffisent en effet pour définir le coefficient directeur de la proportionnalité. Le défaut de cette méthode c'est qu'une erreur grossière sur l'unique étalon ne se verra pas forcément et faussera les résultats.



$$\frac{\text{quantité}_{\text{dans l'échantillon}}}{\text{quantité}_{\text{dans l'étalon}}} = \frac{A_{\text{essai-lu-contre-TR}}}{A_{\text{étalon-lu-contre-TR}}} \quad (\text{loi de proportionnalité})$$

Si l'étalon et l'échantillon à doser ont été traités en utilisant le même volume dans le milieu réactionnel final, l'équation ci-dessus devient alors :

$$\frac{\text{concentration}_{\text{échantillon}}}{\text{concentration}_{\text{étalon}}} = \frac{A_{\text{essai-lu-contre-TR}}}{A_{\text{étalon-lu-contre-TR}}}$$

$$\text{concentration}_{\text{essai}} = \frac{A_{\text{essai-lu-contre-TR}}}{A_{\text{étalon-lu-contre-TR}}} * \text{concentration}_{\text{étalon}} \quad \text{CQFD}$$

Note : Le document annexe en fin de polycopié donne une autre forme de démonstration pour les calculs des dosages.

2.5 Problèmes de spécificité :

La GOD est spécifique du glucose. Malheureusement, la réaction indicatrice catalysée par la POD est une source éventuelle de problèmes :

La présence de catalase dans un échantillon conduirait à la réaction : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Des molécules comme le glutathion (en fait les thiols R-SH) et l'acide ascorbique (vitamine C) sont capables de réduire H_2O_2 en H_2O .

Cet ensemble de réactions conduit potentiellement à une erreur de mesure par défaut puisqu'une partie de H_2O_2 formé par l'action de la GOD sur le glucose ne serait alors pas transformée en composé coloré dosé.

On montre expérimentalement que ces réactions sont négligeables pour les mesures du glucose dans un échantillon plasma ou sérum. Pour d'autres milieux à doser, il faut étudier la question ...

De plus, pour que le dosage soit valide il ne faut pas que le phénol et l'amino-4-antipyrine réagissent avec un autre oxydant que H_2O_2 pour donner le composé coloré. Sinon, on aurait un biais par excès au dosage du glucose. On peut considérer que ce biais n'existe pas pour les mesures de glycémie. Pour d'autres milieux ... faut voir ...

3 Travail pratique et compte rendu à réaliser lors de la séance de travaux pratique

3.1 Mesurage simple à température ambiante

Utiliser 4 cuves pour photométrie et mettre en route un dosage de glucose avec un témoin réactif, un étalon et un essai doublé comme indiqué au paragraphe 2.3. L'étalon disponible est à **2,5 g/L** exactement. L'échantillon à doser est un milieu de culture à vérifier dilué au 1/10 et contenant ainsi a priori 2 g/L de glucose. Incuber 25 minutes à température ambiante. Noter la température ambiante.

Réaliser un témoin de compensation échantillon, lire contre l'eau (solvant) et montrer que sa valeur est nulle. Calculer les 2 valeurs de concentration en glucose mesurées (cf. § 2.4).

3.2 Mesurage simple à 37°C

Préparer un bloc chauffant réglé à 37°C avec un portoir pouvant recevoir des tubes à hémolyse.

Préchauffer du milieu réactionnel (3 tubes à hémolyse avec 2,00 mL exactement) à 37°C pendant 10 à 15 minutes. Mettre en route un dosage avec un témoin réactif, l'étalon et l'essai en utilisant les 3 tubes à hémolyse équilibrés en température et selon le protocole du paragraphe 2.3. Incuber les 3 tubes à hémolyse pendant 10 minutes (ou plus) à 37 °C. Lire contre de l'eau et calculer l'absorbance de l'étalon et de l'essai contre le témoin réactif.

Calculer la concentration en glucose de l'échantillon (cf. § 2.4). Comparer avec le résultat obtenu au paragraphe 2.6.1. Conclure.

3.3 Mesurage simple à température ambiante : vérification de durée pour obtenir la complétude de réaction

Travail en binômes.

Il s'agit de vérifier que la réaction du dosage est bien terminée au bout de 20 minutes à température de 20°C (ce qu'annonce le fabricant du kit).

Installer le poste de manipulation près du spectrophotomètre : P5000, P50, 1 cône P5000, 2 cônes jaunes, 3 cuves pour photométrie, parafilm, papier optique, petit Bécher avec de l'eau distillée, >4 mL de solution de travail, 200 µL d'étalon glucose à 2,5 g/L, chronomètre, cahier de paillasse, stylo. Régler le zéro du spectrophotomètre à 505 nm avec une cuve remplie d'eau.

Puis utiliser 2 cuves pour photométrie et **travailler ligne par ligne** selon le tableau suivant :

	Cuve TR	Cuve glucose
solution de travail	2,00 mL	2,00 mL
Eau	20 µL	
solution étalon à 2,5 g/L		20 µL
	Le plus rapidement possible, couvrir de parafilm, homogénéiser. Déclencher immédiatement le chronomètre = temps zéro	
	Mesurer (contre de l'eau distillée) aux temps 6 min, 10 min, 19 min, 39 min. Soient Atr les absorbances obtenues.	Mesurer (contre de l'eau distillée) aux temps 2 min, 4 min, 8 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min 40 min. Soient Ay les absorbances obtenues

Tracer sur une même feuille le graphe $A_{tr} = f(\text{temps})$ et $A_y = f(\text{temps})$. Peut-on en déduire que le point final de la réaction du dosage est bien atteint en 20-25 minutes à température ambiante ?

Calculer $A_y - A_{tr}$ au temps 20 et au temps 40 minutes. Comparer avec la valeur $\Delta A_{\text{étalon}}$ (l'étalon lu contre le

témoin réactif) obtenue au paragraphe 2.6.1. Conclure.

3.4 Etude d'interférences

Travail par groupe de 5. 5 échantillons sont à doser.

- Un échantillon Ech. 2 qui est une solution contenant le seul sucre saccharose et de concentration annoncée entre 100 et 300 g/L (0,292 à 0,877 M). Pour la doser, on décide de la diluer au 1/100 exactement et d'hydrolyser le saccharose en glucose et fructose par ajout d'invertase (β -fructosidase). Ech. 2 est dilué au 1/100 en en tampon d'hydrolyse pH 4,5, en fiole jaugée de 100 mL et avec une pipette jaugée de 1mL deux traits de classe A. Lors de la dilution 600 μ L d'invertase à 1000 U/mL sont ajoutés, l'hydrolyse est conduite 30 minutes à 35°C. On obtient ainsi **Ech.2 1/100 inversé**. On réalise aussi un témoin **Ech.2 1/100 mais sans traitement à l'invertase**.
- **Echantillon I1.** C'est une solution test de composition exactement connue, glucose 1g/L + vitamine C 0,2 g/L (préparation extemporanée de 20 mL à partir de glucose à 20 g/L et de vit. C extemporanée 5g/L) .
- **Echantillon I2.** C'est une solution test de composition exacte connue, glucose 1g/L + cystéine 0,2 g/L en tampon acide acétique/acétate de Na⁺ 0,05 mol/L pH 4,75 (préparation extemporanée de 20 mL à partir de glucose 20 g/L et de cystéine extemporanée 5 g/L)
- **Echantillon I3.** C'est une solution test de composition exacte connue, glucose 1g/L + cystéine 0,2 g/L en tampon glycine/NaOH 0,05 mol/L pH 8,6 (préparation extemporanée de 20 mL à partir de glucose 20 g/L et de cystéine extemporanée 5 g/L).

	TR	Etalon	Ech.2 1/100 non hydrolysé	Ech. 2 1/100 inversé (= hydrolysé)	I1	I2	I3
Étalon glucose à 2,5 g/L	-	20 μ L	-	-	-	-	-
eau	20 μ L	-	-	-	-	-	-
Ech. 2 1/100 non hydrolysé	-	-	20 μ L	-	-	-	-
Ech2 au 1/100 et inversé (hydrolysé)	-	-	-	20 μ L	-	-	-
I1	-	-	-	-	20 μ L		
I2	-	-	-	-	-	20 μ L	
I3	-	-	-	-	-	-	20 μ L
Réactif R	2000 μ L	2000 μ L	2000 μ L	2000 μ L	2000 μ L	2000 μ L	2000 μ L
	Traiter tous les tubes en même temps. Homogénéiser. Mesurer les absorbances à 505 nm contre de l'eau quand la réaction est terminée. Il faut 10 minutes à 37°C et 20 minutes à 20°C.						
Absorbances contre l'eau							
Absorbances contre le TR							

A partir des résultats expérimentaux, sachant qu'aucun témoin de compensation échantillon n'est nécessaire car les échantillons ne possèdent aucune absorbance propre à 505 nm, calculer la concentration en glucose des échantillons. Commenter les résultats de I1 et I2 et I3. Commenter le résultat de Ech.2 1/100 non hydrolysé. Calculer la concentration en saccharose de Ech. 2.

Question annexe. Sachant qu'une unité d'invertase catalyse l'hydrolyse de 1 μmol de saccharose par minute à pH 4,5 et à 55°C et que l'activité est divisée par 4 entre 35°C et 55 °C, montrer que les opérations d'hydrolyse permettent bien d'hydrolyser en glucose et fructose la totalité du saccharose de la fiole jaugée.

Document annexe : Dosage du glucose avec un kit « GODIPAP » Etalonnage par proportionnalité

- Soit $C_{\text{étalon}}$ la concentration en glucose de l'étalon, soit C_{essai} la concentration en glucose de l'essai.
- Soit $E = 25 \mu\text{L}$ et $V_{mr} = 2525 \mu\text{L}$. Soit $\Delta\varepsilon$ le coefficient d'absorbance spécifique lié au composé coloré formé et l la longueur du trajet optique de la cuve de mesure ($l = 1 \text{ cm}$).
- Soit $\Delta A_{\text{étalon}}$ l'absorbance obtenue pour l'étalon lu contre le témoin réactif.
- Soit ΔA_{essai} l'absorbance dosant le glucose obtenue pour l'essai (c'est donc l'absorbance de l'essai lu contre le témoin réactif diminuée -s'il y a lieu- de l'absorbance du témoin de compensation essai).
- Soit C^*_{essai} et $C^*_{\text{étalon}}$ les concentrations en composé coloré obtenues en fin de réaction dans les tubes essai et étalon et N^*_{essai} et $N^*_{\text{étalon}}$ les quantités qui correspondent.

On a :	$\Delta A_{\text{étalon}} = \Delta\varepsilon \cdot l \cdot C^*_{\text{étalon}}$	$\Delta A_{\text{essai}} = \Delta\varepsilon \cdot l \cdot C^*_{\text{essai}}$
D'où :	$N^*_{\text{étalon}} = \frac{\Delta A_{\text{étalon}}}{\Delta\varepsilon \cdot l} \cdot V_{mr}$	$N^*_{\text{essai}} = \frac{\Delta A_{\text{essai}}}{\Delta\varepsilon \cdot l} \cdot V_{mr}$
Donc puisqu'il y a un facteur de stoechiométrie de 2 :	$N^{\text{gluc}}_{\text{étalon}} = 2 \frac{\Delta A_{\text{étalon}}}{\Delta\varepsilon \cdot l} \cdot V_{mr}$ (avec $N^{\text{gluc}}_{\text{étalon}}$ = quantité de glucose apporté par le volume E d'étalon)	$N^{\text{gluc}}_{\text{essai}} = 2 \frac{\Delta A_{\text{essai}}}{\Delta\varepsilon \cdot l} \cdot V_{mr}$ (avec $N^{\text{gluc}}_{\text{essai}}$ = quantité de glucose apporté par le volume E d'essai)
D'où :	$C_{\text{étalon}} = 2 \frac{\Delta A_{\text{étalon}}}{\Delta\varepsilon \cdot l} \cdot \frac{V_{mr}}{E}$ (a)	$C_{\text{essai}} = 2 \frac{\Delta A_{\text{essai}}}{\Delta\varepsilon \cdot l} \cdot \frac{V_{mr}}{E}$ (b)
Soit en divisant (b) par (a) :	$\frac{C_{\text{essai}}}{C_{\text{étalon}}} = \frac{A_{\text{essai}}}{A_{\text{étalon}}}$	
Soit finalement :	$C_{\text{essai}} = \frac{A_{\text{essai}}}{A_{\text{étalon}}} \cdot C_{\text{étalon}}$	