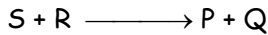


## Dosage d'un analyte par méthode enzymatique en cinétique en phase homogène

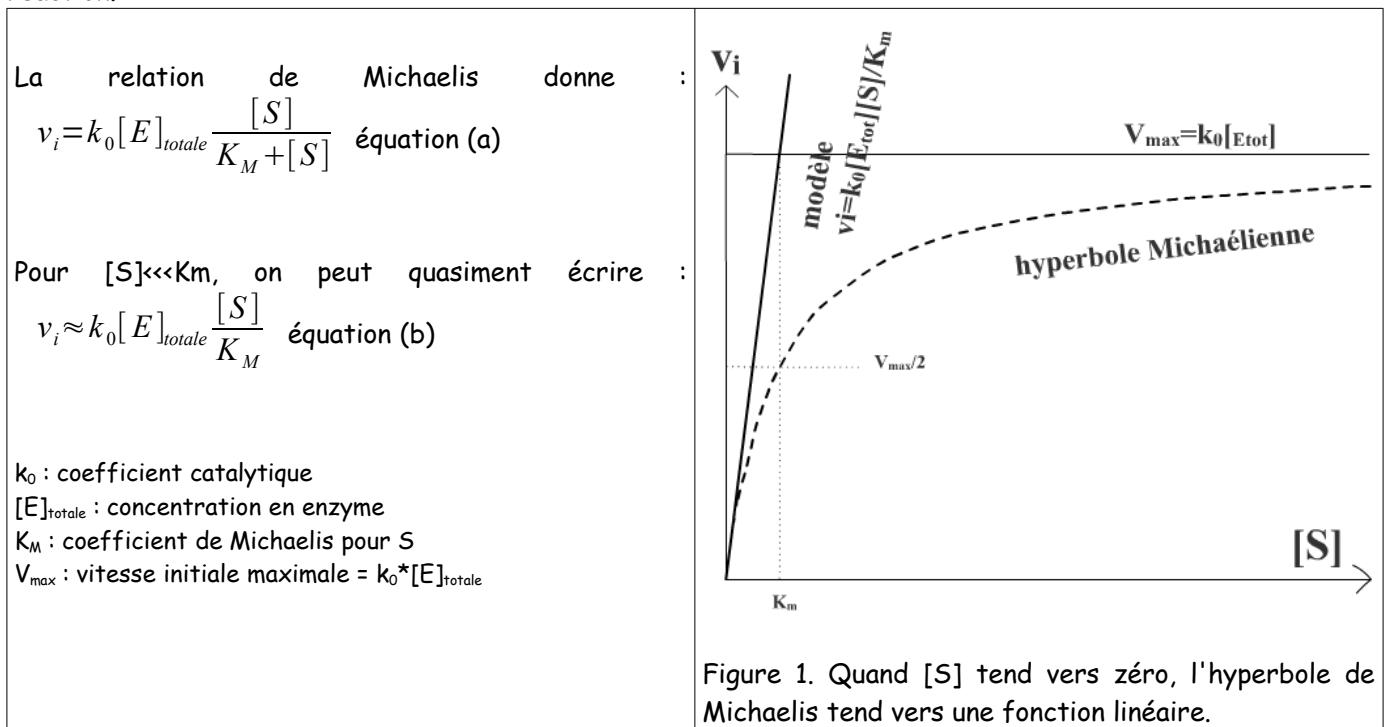
### 1. Première approche des dosages d'analytes par méthodes enzymatiques en cinétique en phase homogène

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



On fait en sorte que les substrats autres que S soient en concentration déterminée, toujours à l'identique, dans le milieu réactionnel.

On suppose de plus qu'on dispose d'une méthode permettant de mesurer la vitesse initiale de la réaction.



- Si  $[E]_{\text{totale}}$  est stable (il faut alors que la dénaturation de l'enzyme soit négligeable sur une série de manipulations, soit une conservation parfaite de l'enzyme).
- Et si  $k_0$  est stable (il suffit de standardiser le milieu réactionnel et de travailler en milieu thermostaté (la contrainte de qualité de thermostatisation dépendra de l'énergie d'activation de l'enzyme)).
- Et si  $K_M$  est stable (il suffit de travailler en milieu réactionnel standardisé).

Alors l'équation (b) devient :

$$v_i \approx \text{coef.} [S] \quad \text{équation (c)}$$

où coef. désigne un coefficient de proportionnalité stable dans les conditions évoquées ci-dessus.

On dispose ainsi d'une méthode de dosage de S qui sera étalonnable de façon très simple à l'aide d'une solution de S : la fonction d'étalonnage est linéaire.

Remarques :

- La méthode n'est valable que si les analytes autres que S dans l'échantillon ne modifient ni  $k_0$ , ni  $K_M$ .
- L'équation (b) montre que la sensibilité de la méthode sera d'autant plus élevée que  $[E]_{\text{totale}}$  sera élevée.
- La contrainte  $S \ll K_M$  est évidemment remarquable. Ainsi si l'équation (b) montre que plus  $K_M$  est élevé plus la sensibilité est faible ; plus  $K_M$  est élevé plus on pourra mesurer des concentrations en S élevées ! (Il existe des dosages d'analytes par méthode enzymatique en cinétique en phase homogène dans lesquels sont introduits des inhibiteurs compétitifs dans le milieu réactionnel pour élever le  $K_M$ ).

Exercice :

Soit des mesures de  $v_i$  pour  $[S] = K_M/1000 ; K_M/100 ; K_M/10$ .

Calculer  $v_i$  relativement à la vitesse initiale maximale (par exemple pour  $[S] = K_M/10$  on montrera que  $v_i = 0,091V_{max}$ ).

Calculer alors pour chacun de ces 3 cas l'écart en % entre la  $v_i$  et l'approximation donnée par l'équation (b) ci-dessus.

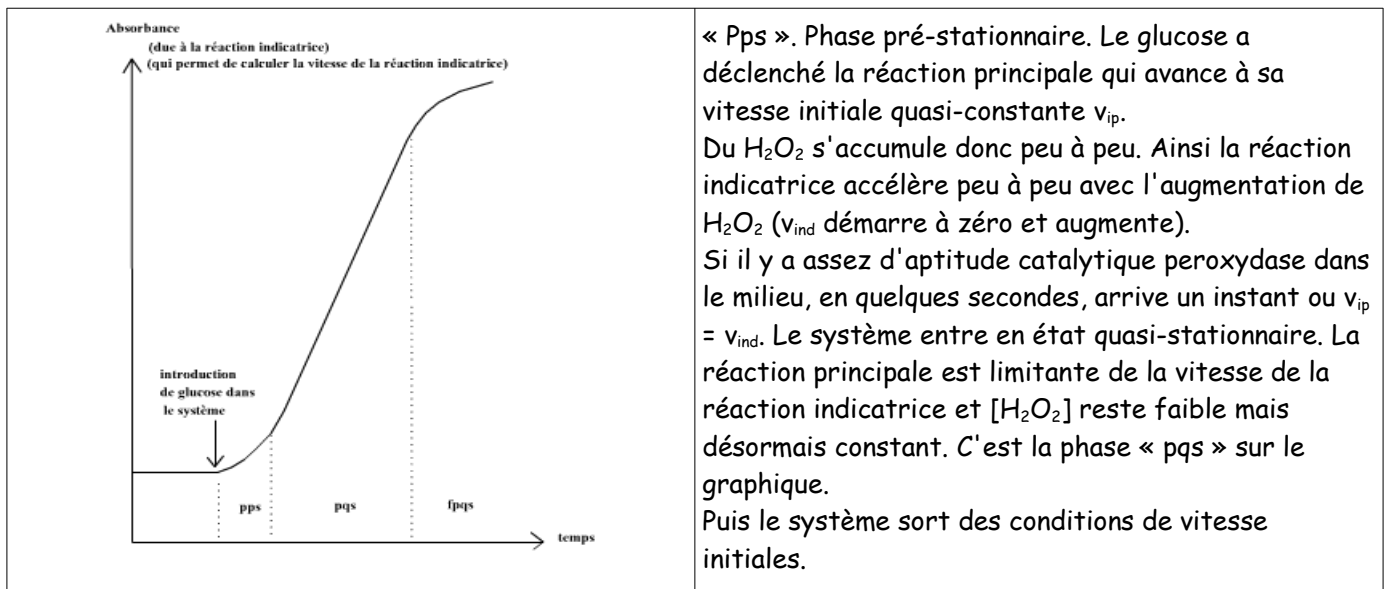
Conclure quand aux domaines de praticabilité des dosages d'analytes par méthode enzymatique en cinétique en phase homogène.

## 2. Application simple au dosage du glucose à la méthode GOD-peroxydase-PAP en cinétique

On va illustrer les propos théoriques présentés ci-dessus par un exemple pratique : la mesure d'une concentration en glucose par une méthode en cinétique mettant en œuvre la glucose oxydase. La méthode consistera à regarder si on peut adapter en cinétique un kit de dosage du glucose méthode GOD-peroxydase-PAP prévu normalement pour être réalisé à complétude de réaction.

Réaction principale	Glucose oxydase GOD $\beta$ -glucose + O <sub>2</sub> -----> gluconolactone + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Réactions spontanées annexes	$\beta$ -glucose <-----> forme ouverte <-----> $\alpha$ -glucose (équilibre lent) gluconolactone + H <sub>2</sub> O -----> acide gluconique (réaction rapide totale)
Réaction indicatrice couplée à la principale	peroxydase $2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{phénol} + \text{amino-4-antipyrine} \text{ -----> quinoéimine} + 4 \text{H}_2\text{O}$ absorbe à 505 nm

D'après ce qui a été décrit au paragraphe 1, si on travaille avec du glucose à concentration très basse devant le  $K_M$  de la GOD, la vitesse initiale de de la réaction principale ( $v_{ip}$ ) devrait être quasi proportionnelle à la concentration en glucose. Mais c'est en fait la vitesse de la réaction indicatrice ( $v_{ind}$ ) qui est accessible expérimentalement. Ainsi, les mesures auront un sens si et seulement si  $v_{ip} = v_{ind}$ . Cette égalité se réalisera si le système des 2 réactions peut se mettre en état quasi-stationnaire alors que la réaction principale est demeurée en conditions de vitesse initiale. Pour cela, il faut que la vitesse de la réaction principale soit limitante, état que l'on peut obtenir si le potentiel catalytique en peroxydase apparaît rapidement beaucoup plus élevé que celui en glucose oxydase.



Le document annexe 1 fournit la composition et des données sur le kit de dosage utilisé.

**Le mode opératoire des mesures sera le suivant :**

- Introduire de solution de travail parfaitement conservée à 0-4°C dans un récipient adapté à fermeture étanche et équilibrer en température à 35°C en bloc chauffant (6 à 7 minutes). Ne pas dépasser 30 minutes à 35°C par lot de préchauffage. Transférer 2 mL exactement dans une cuve pour photométrie préchauffée à 35°C.
- Placer la cuve dans le porte cuve régulé en température du spectrophotomètre (35°C) et laisser s'équilibrer en température.
- Introduire, 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon à mesurer à la microspatule d'agitation et homogénéiser le plus rapidement possible.
- Déclencher le plus rapidement possible le suivi cinétique de l'absorbance à 505 nm (140s, 1 mesure chaque 2s)
- Poursuivre l'enregistrement cinétique.

**Travail à réaliser :**

- Mesurer la vitesse d'un blanc réactif (20  $\mu\text{L}$  d'eau comme échantillon).
- Mesurer différentes concentrations étalons en glucose pour montrer l'adaptation possible au dosage du glucose en cinétique (on essaiera d'obtenir plusieurs mesures pertinentes). D'après la base de données Brenda-enzymes, on peut attendre un  $K_M$  vers 27 mmol/L (si l'origine de la GOD utilisée est *Aspergillus niger* et selon les conditions de milieu ...). Voir en document annexe 2 une proposition de tableau de manipulations et de résultats.
- Mesurer l'échantillon « milieu de culture » proposé attendu vers 5 g/L.
- Compte-rendu : détail des expériences réalisées ; résultats obtenus ; conclusions...

### 3. Pour aller un peu plus loin

Dans leur article « Kinetic enzymatic method for automated determination of glucose in blood and serum » (Ziegenhorn ; J Clin Chem Clin Biochem. 1977 Jan;15(1):13-19), les auteurs résolvent le système d'équations différentielles (et ce n'est pas accessible au niveau BTS) qui décrit le comportement de la réaction principale d'oxydation du  $\beta$ -glucose associé à l'équilibre de mutarotation. Ils montrent ainsi qu'on peut corrélérer (tant que la réaction indicatrice n'est pas limitante) de façon linéaire la concentration en glucose d'un échantillon à la variation globale d'absorbance entre 2 temps donnés, par exemple entre les temps 50 s et 140 s.

Montrer, en reprenant les résultats bruts obtenus au paragraphe 2 que cette technique dite « cinétique en temps fixé » est opérationnelle et très simple de mise en œuvre.

#### Bibliographie

- Sonowane et col. Kinetic measurement of glucose with a centrifugal analyser; hexokinase and glucose oxydase procedures compared. Clin. Chem. 22:7(1976):1100-1101
- Ziegenhorn J, Neumann U, Hagen A, Bablok W, Strinshoff K. Kinetic enzymatic method for automated determination of glucose in blood and serum. J Clin Chem Clin Biochem. 1977 Jan;15(1):13-19
- <http://www.brenda-enzymes.org/>

### **Document Annexe : kit dosage du glucose, méthode GOD-Peroxydase-PAP au point final de réaction**

#### 3. Mode opératoire pratique pour la méthode au point final de réaction

On utilise un kit commercial classique de dosage du glucose par méthode dite GOD-PAP. La solution de travail est de composition :

- tampon phosphate (150 mmol/L dans le milieu réactionnel final) ;
- chloro-4-phénol (2 mmol/L dans le milieu réactionnel final) ;
- aminoantipyrine (0,79 mmol/L dans le milieu réactionnel final) ;
- les enzymes GOD (vers 20000 UI/L) et POD (vers 1000 UI/L).

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).

Protocole à complétude de réaction	Témoin réactifs	Etalon	Essai
Eau	E = 20 $\mu$ L		
solution étalon		E = 20 $\mu$ L	
Échantillon à mesurer			E = 20 $\mu$ L
solution de travail	2 mL	2 mL	2 mL
<p><u>Homogénéiser</u> puis lire l'absorbance de l'étalon (<math>A_{\text{étalon}}</math>) et de l'essai (<math>A_{\text{essai}}</math>) 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.</p>			

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

### Document annexe 2. Proposition de tableau de manipulations et de résultats

M glucose : 180,156 g/L

glucose dans l'étalon en g/L	glucose dans le milieu réactionnel en g/L (20 $\mu$ L + 2000 $\mu$ L : fd= )	glucose dans le milieu réactionnel en M	En supposant Km = 27E-03 M		Commentaire durée de vi, une vi est-elle analysable ?	vi en $\Delta A/\Delta t$ en min <sup>-1</sup>
			[glucose]mr/Km	linéarité attendue		
50						
20						
10						
5						
5						
2						
2						
1						
1						
0,5						
0,5						
0,2						
0,2						
0,1						
0,1						

(oui ou non)