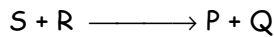


Dosage d'un analyte par méthode enzymatique en cinétique en phase homogène

1. Principe des dosages d'analytes par méthodes enzymatiques en cinétique en phase homogène

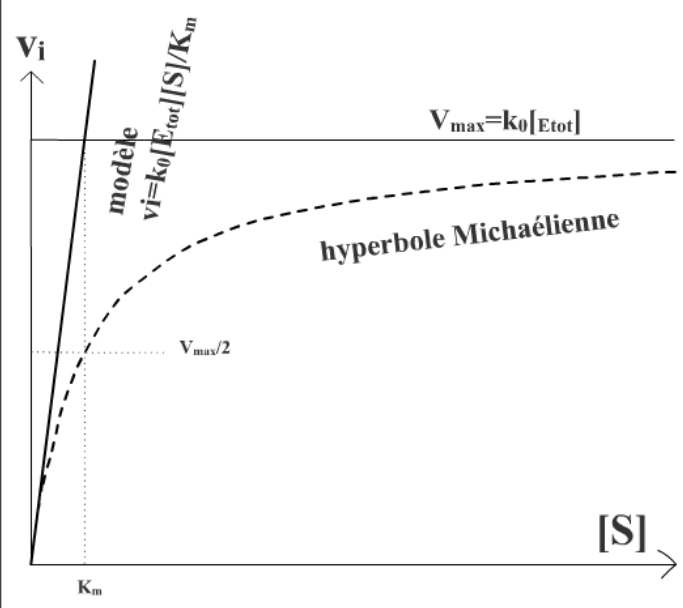
Soit à doser un analyte S dans un milieu (biologique) complexe contenant S et bien d'autres molécules.

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.

<p>La relation de Michaelis donne :</p> $v_i = k_0 [E]_{totale} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{équation (a)}$ <p>Pour $[S] \ll K_M$, on peut quasiment écrire :</p> $v_i \approx k_0 [E]_{totale} \frac{[S]}{K_M} \quad \text{équation (b)}$ <p>k_0 : coefficient catalytique $[E]_{totale}$: concentration en enzyme K_M : coefficient de Michaelis pour S V_{max} : vitesse initiale maximale = $k_0 * [E]_{totale}$</p>	 <p style="text-align: center;">Figure 1. Quand $[S]$ tend vers zéro, l'hyperbole de Michaelis tend vers une fonction linéaire.</p>
---	---

- ➔ Si $[E]_{totale}$ 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 :

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

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 $[E]_{totale}$ 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 $v_i=0,91V_{max}$).

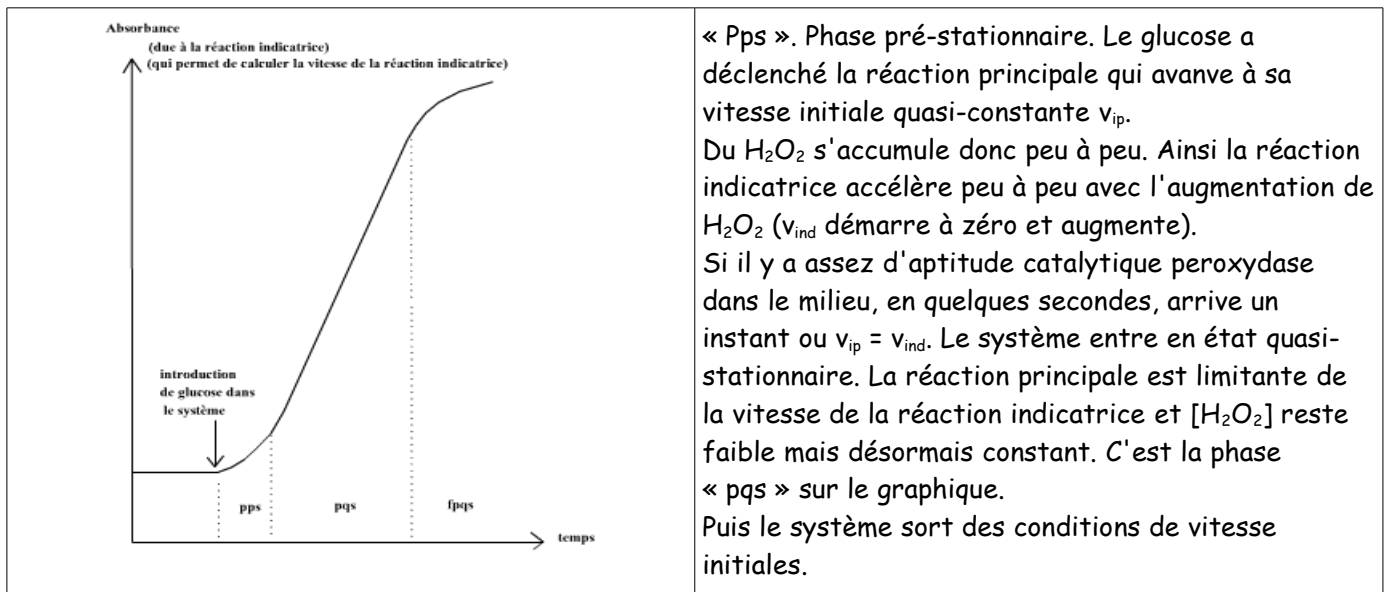
Calculer alors pour chacun de ces 3 cas l'écart en % entre la v_i et l'approximation donnée par l'équation (b) ci-dessus.

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

2. Application 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 oeuvre la glucose oxydase. La méthode consistera à adapter en cinétique la méthode en point final de réaction présentée dans le document annexe.

La méthode propose une réaction indicatrice (la réaction catalysée par la peroxydase) couplée à la réaction principale (celle à la glucose oxydase). C'est la vitesse initiale de de la réaction principale (v_{ip}) qui doit être mesurée et 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 mode opératoire des mesures sera le suivant :

- Introduire 2 mL de solution de travail dans une cuve pour photométrie.
- Placer la cuve dans le porte cuve réglé en température du spectrophotomètre (35°C) et laisser s'équilibrer quelques minutes.
- Déclencher le suivi cinétique de l'absorbance à 505 nm (200s, 1 mesure chaque 2s)
- Au temps 20s environ introduire, le plus rapidement possible, 20 µL d'échantillon à mesurer à la microspatule d'agitation et homogénéiser.
- Poursuivre l'enregistrement cinétique.

Travail à réaliser :

- Montrer que le système fonctionne comme décrit dans le paragraphe 2.
- Mesurer la vitesse d'un blanc réactif (20 µL 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 5 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 ...).

→ Compte-rendu : détail des expériences réalisées ; résultats obtenus ; conclusions.

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 ainsi que <http://www.brenda-enzymes.org/>

Document Annexe : glucose GOD-Peroxydase-PAP en point final

La réaction principale du dosage.

La glucose oxydase (GOD) catalyse la réaction : β glucose + O_2 -----> gluconolactone + H_2O_2

C'est une enzyme très spécifique du β glucose.

Ensuite, la gluconolactone réagit spontanément, rapidement et irréversiblement avec l'eau pour donner :

gluconolactone + H_2O ----> acide gluconique.

De plus on a l'équilibre β -glucose <----->forme ouverte<----> α -glucose

On peut donc considérer qu'on dispose - en excès d' O_2 (et pour ça on a tout l' O_2 atmosphérique à disposition !) - d'un ensemble global irréversible qui consommera spécifiquement tout le glucose :

glucose + O_2 + H_2O -----> acide gluconique + H_2O_2 (grâce à l'enzyme GOD)

Doser H_2O_2 formé grâce à une réaction enzymatique couplée et par lecture photométrique

L'idée est de mesurer le produit de réaction H_2O_2 . En effet, pour chaque molécule de glucose présente dans le volume essai, on obtiendra finalement une molécule d' H_2O_2 .

Pour ce faire on va mettre en oeuvre une deuxième réaction enzymatique qui consomme H_2O_2 et qui est concomitante à la première et qui conduit à un composé mesurable par photométrie d'absorption moléculaire (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 :

$2 H_2O_2$ + phénol (excès) + amino-4-antipyrine (excès) -----> composé coloré (quinoéimine) + $4 H_2O$

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 H_2O_2 qui donne $\frac{1}{2}$ composé coloré).

Mode opératoire pratique

Soit le système bioMérieux SA® référence 61.272. Le kit fourni propose un flacon dit « réactif1 » et un flacon dit « réactif2 ».

Reprendre le contenu du flacon de réactif2 par le contenu du flacon de réactif1 à l'aide de l'adaptateur fourni. Homogénéiser. La solution se conserve 6 semaines à 20-25°C et 4 mois à 2-8°C à l'obscurité. On obtient ainsi la solution de travail, elle 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.

	Témoin réactifs	Etalon	Essai
Eau	E = 25 μ L		
solution étalon		E = 25 μ L	
Échantillon à mesurer			E = 25 μ L
solution de travail	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
<p><u>Homogénéiser</u> 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.</p>			

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