

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

1. Principe des méthodes enzymatiques de dosage en phase aqueuse homogène au point final de la réaction avec lecture d'absorbance

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



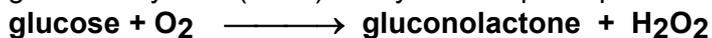
et telle que la réaction soit totale, réalisée en excès stœchiométrique de R par rapport à S. Dans l'équation de réaction présentée ci-dessus, on a choisi un cas de réaction enzymatique très classique à 2 substrats et 2 produits. R désigne le 2^o substrat de l'enzyme que l'on apporte dans le milieu réactionnel et P et Q les produits de la réaction enzymatique. Si P ou Q possèdent une absorbance spécifique forte à une longueur d'onde donnée, on va pouvoir doser S grâce à la réaction catalysée par E_z .

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

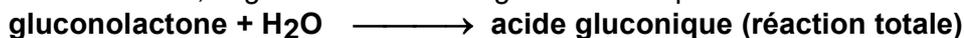
On va illustrer les propos théoriques présentés ci-dessus par un exemple pratique : la mesure d'une concentration en glucose par méthode enzymatique au point final de la réaction.

2.1 La réaction principale du dosage.

En présence de dioxygène en excès (et pour ça on a tout l' O_2 atmosphérique à disposition !), la glucose oxydase (GOD) catalyse très spécifiquement la réaction totale :



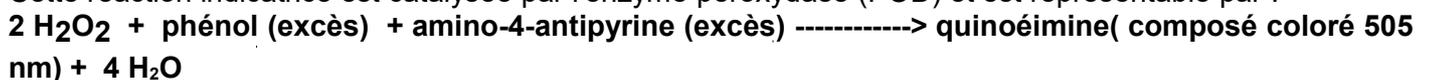
Dans la foulée, la gluconolactone réagit avec l'eau pour donner de l'acide gluconique :



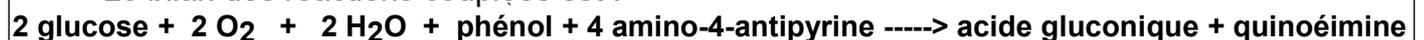
2.2 Doser H_2O_2 formé grâce à une réaction enzymatique couplée et par lecture photométrique

Ni l'acide gluconique, ni H_2O_2 ne possèdent d'absorbance caractéristique mesurable. Afin d'obtenir un produit mesurable par absorptiométrie UV-visible, on va mettre en œuvre une deuxième réaction enzymatique totale qui consommera H_2O_2 et qui conduira 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 (POD) et est représentable par :



Le bilan des réactions couplées est :



La quinoéimine, à complétude de réaction, est dosée par absorptiométrie moléculaire à 505 nm.

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 des réactifs apportés en excès et réaction totale. Et ça, on connaît bien.

2.3 Étalonage du dosage du glucose par la méthode enzymatique à la GOD, réalisation d'une gamme d'étalonnage classique

On va utiliser un kit de dosage qui fournit un réactif R contenant les 2 enzymes GOD et POD et les

substrats phénol et amino-4-antipyrine en solution dans un tampon adapté.

Compléter le tableau d'étalonnage ci-dessous (à reporter dans le compte-rendu) :

	TR (témoin réactifs)	1	2	3	4
Étalon glucose		à 0,4 g/L 20 µL	à 1 g/L 20 µL	à 2 g/L 20 µL	à 4 g/L 20 µL
eau	20 µL	-	-	-	-
Réactif R	2000 µL	2000 µL	2000 µL	2000 µL	2000 µL
Quantité de glucose par tube					
Absorbances contre le TR	Homogénéiser. Mesurer les absorbances à 505 nm contre le TR quand la réaction est terminée. Il faut 10 minutes à 37°C et 20 minutes à 20°C. Etablir l'étalonnage absorbance contre TR en fonction de la quantité de glucose par tube réactionnel. La méthode est linéaire jusqu'à 4 g/L.				

Compte-rendu : sous le tableau d'étalonnage qui aura été reporté et complété dans le compte-rendu, proposer l'allure théorique de tracé du graphe d'étalonnage.

2.4 Étalonnage du dosage du glucose par la méthode enzymatique à la GOD, étalonnage en 2 points, le témoin réactif et un unique étalon

Comme le réactif R est onéreux, on décide d'étalonner sur 2 points seulement, un témoin réactif TR et un étalon à 2,5 g/L

	TR	étalon
Étalon glucose à 2,5 g/L		20 µL
eau	20 µL	-
Réactif R	2000 µL	2000 µL
Absorbances contre le TR	Homogénéiser. Mesurer l'absorbance de l'étalon à 505 nm contre le TR quand la réaction est terminée. Il faut 10 minutes à 37°C et 20 minutes à 20°C. La méthode est linéaire jusqu'à 4 g/L.	

Compte-rendu : proposer un graphe représentant cet étalonnage 2 points.

2.5 Problèmes d'interférents

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 : $H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2 H_2O + O_2$

Des molécules à fonction thiol (R-SH) et l'acide ascorbique (vitamine C) sont capables de réduire H_2O_2 en H_2O . (Voir par exemple <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00435559/document>)

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.

3. Travail pratique

4 échantillons sont à doser.

- Un échantillon Ech.1 dosable de façon simple car de concentration attendue inférieure à 4 g/L.
- 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. Ech. 2 sera 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 µL d'invertase à 1000 U/mL sont ajoutés, l'hydrolyse est conduite 30 minutes à 35°C. On obtient ainsi Ech.2 1/100 inverti.
- Echantillon I1, c'est une solution test de composition exacte connue, glucose 1g/L + vit c 0,2 g/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
- 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.

	TR	Etalon	Ech. 1	Ech. 2 1/100 inverti	I1	I2	I3
Étalon glucose à 2,5 g/L	-	20 µL	-	-	-	-	-
eau	20 µL	-	-	-	-	-	-
Ech1	-	-	20 µL	-	-	-	-
Ech2 au 1/100 et hydrolysé	-	-	-	20 µL	-	-	-
I1	-	-	-	-	20 µL		
I2	-	-	-	-	-	20 µL	
I3	-	-	-	-	-	-	20 µL
Réactif R	2000 µL	2000 µL	2000 µL	2000 µL	2000 µL	2000 µL	2000 µL
	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 Ech1, I1 et I2. Commenter les résultats de I1 et I2 et I3. 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.