HAL open science

Dosage en microplaque du statut total en substances antioxydantes par la méthode du TEAC

P. Noury

To cite this version:

P. Noury. Dosage en microplaque du statut total en substances antioxydantes par la méthode du TEAC. 2016, pp.12. hal-02602438v1

HAL Id: hal-02602438

https://hal.inrae.fr/hal-02602438v1

Submitted on 16 May 2020 (v1), last revised 26 Jan 2024 (v3)

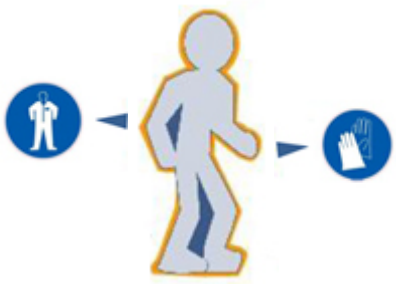
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MODE OPERATOIRE/PROTOCOLE

Dosage en microplaque du statut total en substances antioxydantes par la méthode du TEAC

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le présent mode opératoire nécessite l'utilisation de produits irritant il convient donc de respecter les règles de sécurité indispensables à l'utilisation de tels produits.

Le schéma ci-contre rappel les Equipements de Protection Individuels indispensables

Les produits et manipulations à risques ainsi que les moyens de protections spécifiques sont détaillés dans le contenu de ce document.

N° de version	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
1	Nom : NOURY Fonction : IE Date/visa : 02/02/2016	Nom : TUNTUNDJIAN Fonction : IR Date/visa : 02/02/2016	Nom : GEFFARD Fonction : Responsable du laboratoire d'Ecotoxicologie Date/visa : 02/02/2016

Mises à jour			
N° de version	Date	Auteur	Modifications apportées par rapport à la précédente version

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION 2
1.1 Objet et domaine d'application 2
1.2 Références 2
1.3 Conditions d'application 2
1.4 Définitions et abréviations 3
2 VOLET SECURITE 3
3 PROTOCOLE 3
3.1 Principe 3
3.2 Matériel et réactifs 4
3.2.1 Produits utilisés 4
3.2.2 Solutions préparées 4
3.2.3 Matériel 5
3.3 Mode opératoire 6
3.3.1 Préparation de la fraction S9 6
3.3.2 Réglage du spectrophotomètre 7
3.3.3 Réalisation de la plaque 7
3.4 Expression des résultats 7
3.4.1 Calcul de la concentration en Trolox équivalent 7
3.4.2 Traitement statistique des résultats 8
4 SYNTHESE DU DOCUMENT 8
ANNEXE 9
Annexe 1 : Exemple de gamme étalon de Trolox 9
Annexe 2 : % d'inhibition *vs* % de la prédilution du S9 10
Annexe 3 : A propos du TEAC sur S9 déprotéiné 11

1 INTRODUCTION

1.1 Objet et domaine d'application

Cette procédure décrit la mesure du statut total en antioxydant (TAS) par la méthode du TEAC qui détermine la capacité antioxydante globale d'un échantillon comparativement à une gamme de Trolox. La mesure est réalisée sur fraction post-mitochondriale (S9) d'homogénat de tissus (organe ou organisme entier).

Cette mesure peut être réalisée à partir d'homogénats de foies ou de branchies de poisson ainsi que sur des organismes entiers de gammare, daphnie, larve de chironome, potamopyrgus, ou poisson au stade larvaire ou juvénile. Elle est un des paramètres permettant l'évaluation du stress oxydant que subit un organisme au contact de xénobiotiques de type métaux lourd, HAP, pesticide, PCB.

1.2 Références

Le protocole utilisé est inspiré de la méthode Miller[1] et al.(1993) modifié par Re[2] et al. (1998) et adapté à la microplaque par Kerchev[3] et al. (2008).

1.3 Conditions d'application

La mesure du TEAC dose de manière globale la présence de substances antioxydantes non enzymatiques et pour une large part non protéiques. Lors d'une approche multi biomarqueurs il est donc préférable de réaliser en priorité les mesures d'activité enzymatique pour terminer par le dosage du TEAC a priori moins sensible aux conditions de conservations de l'échantillon. Il peut même s'avérer nécessaire de congeler les extraits (S9) pour reporter ultérieurement le dosage du TEAC. En résumé, le dosage du TEAC doit être réalisé de préférence le jour de l'extraction des échantillons mais supporte la congélation/décongélation des S9.

---

[1] Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J.; A new method for measuring antioxidant activity; (1993) Biochemical Society Transactions, 21 (2), pp. 95S.

[2] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. ; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay; (1999) Free Radical Biology and Medicine, 26 (9-10), pp. 1231-1237.

[3] Kerchev, P.a , Ivanov, S.b ; Influence of extraction techniques and solvents on the antioxidant capacity of plant material; (2008) Biotechnology and Biotechnological Equipment, 22 (1), pp. 556-559.

1.4 Définitions et abréviations

- **FCR** : Force Centrifuge Relative
- **Fraction S9** : surnageant obtenu après centrifugation de 15 minutes à 9000g des homogénats de tissus
- **TEAC** : Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity
- **TAS** : Total Antioxidant Statut
- **ABTS** : acide 2,2'-azino-bis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- **TROLOX** : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid ou Vitamine E

2 VOLET SECURITE

ABTS

Persulfate de potassium

3 PROTOCOLE

3.1 Principe

La mesure se fonde la capacité d'un échantillon ou d'une molécule à réduire le radical cationique ABTS+ en ABTS. Le radical cationique ABTS+ qui est stable et de couleur vert-bleu est produit la veille du test par réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium.

Lors du test, les antioxydants présents dans l'échantillon diminuent la concentration en ABTS+ qui est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm. La quantité d'antioxydant est exprimée en µmol d'équivalent Trolox selon une gamme réalisée simultanément.

A noter que les substances antioxydantes présentes dans un homogénat de tissus animal sont représentées en grande partie par le glutathion.

3.2 Matériel et réactifs

3.2.1 Produits utilisés

Tableau I : Produits utilisés pour le dosage du TEAC

PRODUIT	N° CAS	RANGEMENT
Disodium Hydrogénophosphate dihydraté ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	10028-24-7	Armoire 1 (D34)
Potassium chlorure (KCl)	7447-40-7	Armoire 1 (E6)
Potassium dihydrogénophosphate, (KH_2PO_4)	7778-77-0	Armoire 1t (C7)
Sodium chlorure	7647-14-5	Armoire 1 (E8)
ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)	30931-67-0	Armoire 2 rayon Biochimie
Persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$)	7727-21-1	Armoire 1 (D36)
Trolox ($C_{14}H_{18}O_4$) (Vit. E) poudre	53188-07-1	Réfrigérateur, rayon: réactifs 2
Trolox 2,5 mM/PBS		Congélateur biochimie
Eau Ultra Pure		Salle Préparation

3.2.2 Solutions préparées

A l'avance

- **Tampon de broyage** : tampon phosphate (100mM, pH 7,8) additionné de 0,1 % de Triton X100 (exemple pour 50 µl + 50 ml). Bien agité à l'aide d'un barreau aimanté. A noter que c'est le tampon commun à la plupart les biomarqueurs (voir dosage de l'ACHE).

- **Tampon phosphate** (PBS) à 10 mM, pH 7,4 :
  1,65 g de $Na_2HPO4.2H2O$ (8,09 mM)
  0,2 g de KCl
  0,2 g de KH_2PO4 (1,47 mM)
  8 g de NaCl (0,136 M)
  Qsp 800 mL H2O pure. Ajuster le pH à 7,4. Qsp 1 litre d'H_2O pure.

- **Solution mère de trolox** (250,29 g.mol^{-1}) à 2,5 mM préparée dans du PBS 5 mM pH 7,4 (0,15641 g dans 250 ml de PBS). La dissolution est facilitée par une sonication douce. Cette solution est stable 1 semaine à 4°C ou six mois à –20°C.

La veille du dosage

- **ABTS radical cation (ABTS+)** : réaliser une solution d'ABTS en eau pure à 7mM (60mg /15,62 ml) puis ajouter du persulfate à la concentration de 2,45 mM soit 10mg dans 15,11 mL de la solution solution d'ABTS. Laisser développer la réaction (> 6h) à température ambiante et à l'obscurité jusqu'au lendemain.

Le jour du dosage

- **ABTS radical cation (ABTS+)** solution de travail : diluer la préparation dans du PBS pour obtenir une absorbance de 0,7 ± 0,02 à 734 nm soit une dilution d'environs 1/90ème . La solution de travail est ensuite maintenue en bain marie à 30°C jusqu'au dosage.
- **Gamme étalon de Trolox**: décongeler un aliquote de Trolox 2,5 mM en bain glacé, diluer préalablement cette solution en Eppendorf au 1/5 (300 µL + 1200 µL) puis réaliser la gamme étalon de raison 2/3 (Tableau I) :

Tableau II : Gamme étalon de Trolox

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Conc. Trolox (µmol/l)	0	9	13	20	29	44	66	99	148	222	333	500
Tampon PBS (µl)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	
Trolox 0,5 mMOL (µl)		800 de 3	800 de 4	800 de 5	800 de 6	800 de 7	800 de 8	800 de 9	800 de 10	800 de 11	800 de 12	1500

3.2.3 Matériel

- Microtubes Eppendorf de 0,5 mL et 1,5mL et microtubes 1,5 mL à bouchon vissant
- Bonbonne d'Azote liquide (Linde Gaz-Cryovit (Saint Priest) - code client 07248745)
- Congélateur -80°C
- Broyeur à bille + billes de verre 2mm et acier 4mm
- Spectrophotomètre à microplaques
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Verrerie et pipettes automatiques
- Microplaque 96 puits (Greiner)
- Bains marie thermostaté à 30°C
- Microplaque 96 puits transparentes (Greiner)

- Verrerie courante de laboratoire
- Pipettes automatiques monocanal et multicanaux
- Embouts pour pipettes

3.3 Mode opératoire

3.3.1 Préparation de la fraction S9

- Allumer et régler la centrifugeuse (4°C, FCR= 9000, 15 min)
- Sortir les échantillons du congélateur par petit nombre (4 à 6) en les maintenant en bain de glace et au fur et à mesure transférer dans chaque tube une bille d'acier + 3 billes de verre ainsi qu'un volume de tampon (0,1% triton) à la proportion de 1/10 (m/V)
- Placer ensuite les tubes dans le broyeur à bille et lancer le premier broyage (vitesse 6 – 20 secondes)
- Sortir les tubes du broyeur et les placer 5 minutes dans la glace avant de lancer le deuxième broyage (même réglage)
- Placer ensuite les tubes en centrifugeuse réfrigérée à 4°C
- Centrifuger 15 minutes à 9000 g
- Transférer environs 400 µl de surnageant (S9) en microtube
- Le dosage peut être réalisé le jour même ou bien après stockage à -80°C (voire -20°C) puis décongélation d'un aliquote.

La matrice d'extraction : les animaux entiers chitineux (gammare, chironome) ou à coquille (potamo) sont broyés avec une matrice composée d'une bille d'acier de 4 mm additionné ou non de 3-4 billes de verre (2mm). A noter qu'avec le potamo, il est préférable de craquer les animaux dans le tube avant broyage. Concernant les tissus mous comme le foie ils peuvent être broyés avec une matrice composée d'un assortiment de billes de verre de 2 et 1 mm.

Le tampon d'extraction : il s'agit du tampon phosphate pH 7,8 additionné éventuellement d'un tensio-actif tel que le Triton X100 à la concentration de 0,1 % (50 µL dans 50 mL, bien agiter). Le rapport d'extraction **masse/volume** sera de **1/10** pour le gammare et de **1/50** pour le chironome et le potamo. Pour un échantillon de foie, de branchie ou le danio juvénile le rapport peut être compris **entre 1/20 et 1/50**

La prédilution : chaque S9 doit être préalablement prédilué dans du tampon phosphate pour qu'avec une prise d'essai de 20 µL par puits on obtienne une inhibition de comprise entre 10 % et 70-80% de l'inhibition totale. La prédilution conseillée est de :

- 2,5% (1/40) pour des gammares extraits à 1/10 (m/V)
- 10 % (1/10) pour des chironomes extraits au 1/50 (m/V)
- 20% (1/5) pour des potamos extraits au 1/50 ; 12.8 % (1/8) avec des potamos au 1/30

3.3.2 Réglage du spectrophotomètre

La procédure ci-dessous se réfère au matériel Tecan Safire du laboratoire d'Ecoxicologie d'Irstea Villeurbannes :

- Allumer le spectrofluorimètre (bouton derrière en bas à gauche) et l'ordinateur.
- Ouvrir le programme Xfluor4 : Demarrer/Programme/Tecan/Xfluor4 (menu Windows)
- Activer la connexion avec le Safire : Xfluor/Connect/Safire (menu Excel)
- Ouvrir le menu d'onglets dans Xfluor/Edit measurement (menu Excel)
- Régler les paramètres de mesure comme ci-après :

Measurement mode:	Absorbance
Measurement wavelength:	734 nm
Number of flashes:	1
Plate definition file:	GRE96ft.pdf
Number of kinetic cycles:	5
Kinetic interval:	300 s
Target Temperature:	30 °C
Current Temperature:	30 °C

3.3.3 Réalisation de la plaque

La solution de travail d'ABTS+ peut être préalablement chauffée à plus de 30°C (33) pour compenser la déperdition de température lors du transfert en réservoir à réactifs puis en microplaque :

- Déposer dans la microplaque 20 µL en duplicat de chaque tube de la gamme de Trolox et 20 µL en triplicat de chaque prédilution d'échantillon
- Ajouter 200 µL de la solution de travail d'ABTS+.
- Lire la plaque à 734 nm et 30°C pendant 20 minutes tous les 5 minutes.
- En fin de lecture vérifier que la cinétique de réaction est quasi complète après 15 minutes.

3.4 Expression des résultats

3.4.1 Calcul de la concentration en Trolox équivalent

- Les calculs s'effectuent sur la lecture d'absorbance à 15 minutes.
- On calcule la moyenne des réplicats de chaque étalon et échantillon en vérifiant que le pourcentage de variation entre réplicats ne dépasse pas 10%
- Les pourcentages d'inhibition de l'ABTS+ sont alors calculés comme suit :
  (Abs-Blanc – Abs / Abs-Blanc)*100
- Déterminer le facteur de conversion entre pourcentage d'inhibition et équivalent Trolox au moyen de la gamme étalon selon une relation de type y = a*x tel que :
  Trolox (µmol/l) = f (% inhibition)

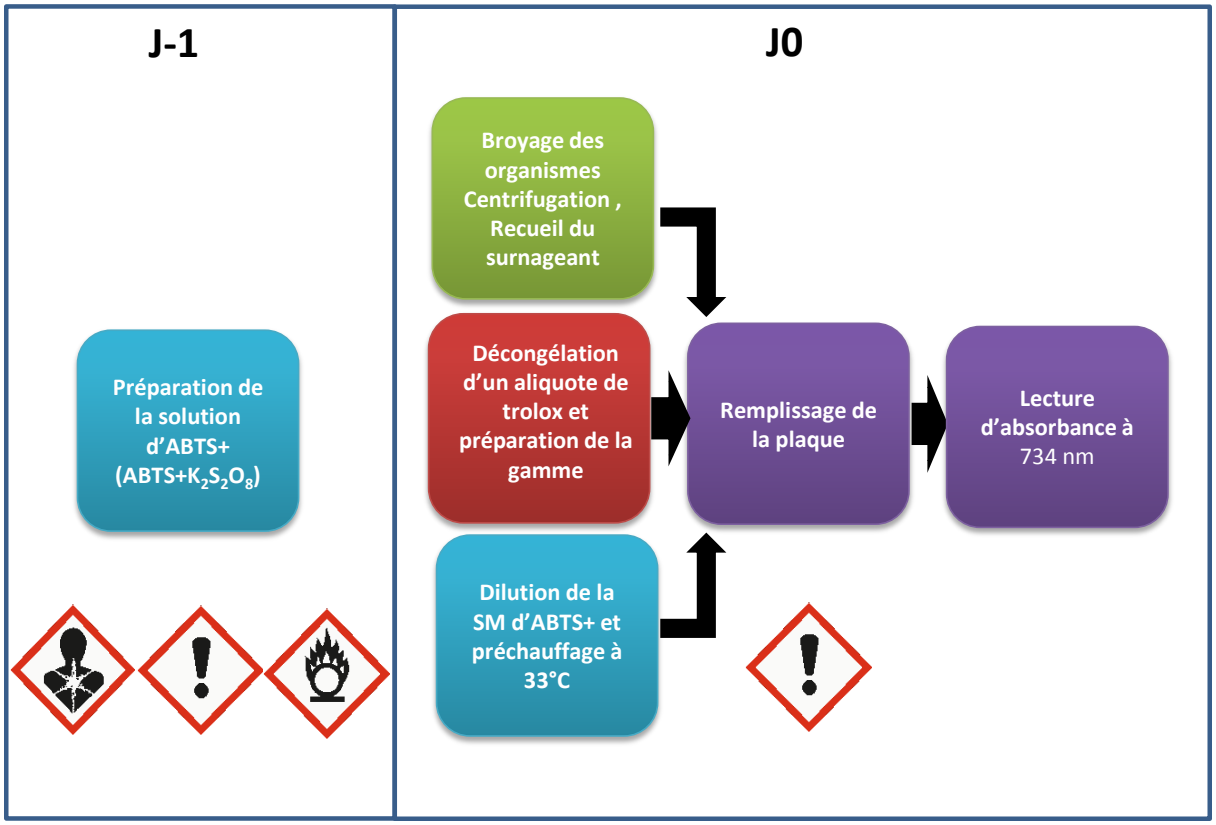
- Exprimer le résultat en µmol équivalent par gramme de matière fraiche (µmol-eq/g). Calculer la concentration en Trolox équivalent pour chaque échantillon compte tenu de la prédilution et du rapport d'extraction m/V pour Pour un homogénat de tissus dont le rapport d'extraction m/V n'est pas connu avec précision rapporter le résultat à une teneur en protéines de l'homogénat.

3.4.2 Traitement statistique des résultats

Chez les invertébrés la mesure du TEAC est souvent réalisée sur un pools d'individus, la variation individuelle étant ainsi pondérée a priori. Le nombre de pools d'individus par condition expérimental étant généralement inférieur à 10, il est conseillé d'utiliser un test non paramétrique (Test U de Mann Whitney) pour la comparaison des groupes entre eux.

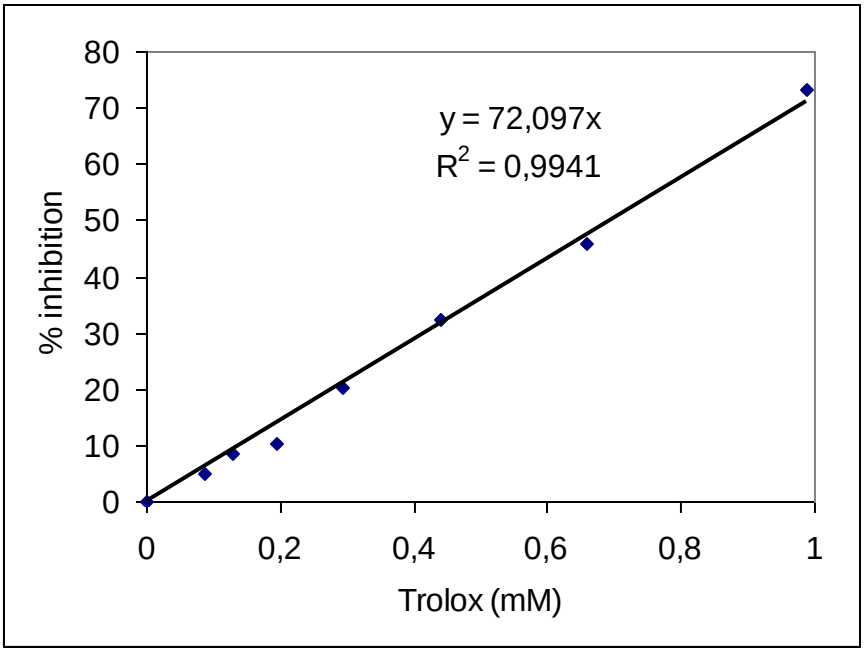
Néanmoins, la moyenne arithmétique suivie de l'écart type ou d'un intervalle de confiance à 95% est un bon descripteur d'un groupe de mesure.

4 SYNTHESE DU DOCUMENT

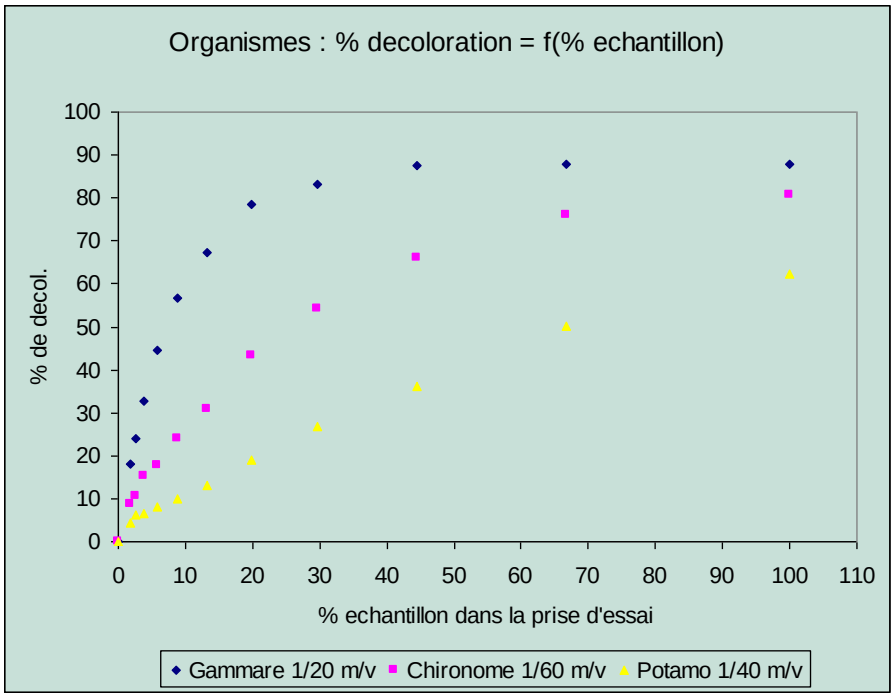


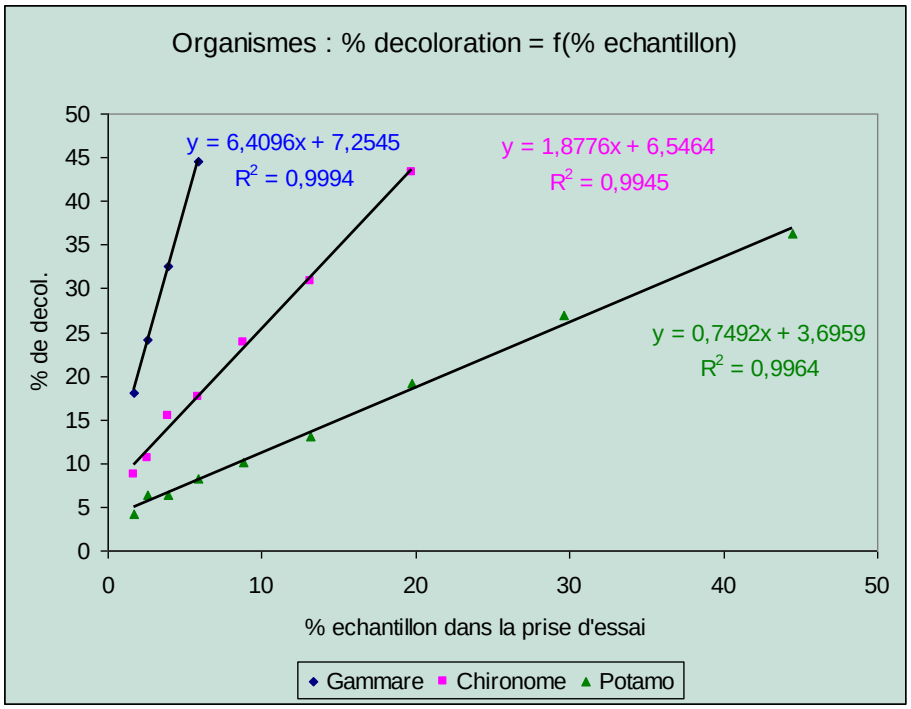
ANNEXE

Annexe 1 : Exemple de gamme étalon de Trolox



Annexe 2 : % d'inhibition *vs* % de la prédilution du S9





Annexe 3 : A propos du TEAC sur S9 déprotéiné

Le TEAC est principalement révélateur d'antioxydants non protéiques tels que le Glutathion, l'acide ascorbique, l'α-tocophérol, le β-carotène, la vitamine D et l'acide urique mais des artefacts de mesure peuvent provenir des protéines issues de l'extraction et qui pour certaines ne jouent pas de rôle antioxydant *in vivo*. De fait, des auteurs préconisent la mesure sur échantillons déprotéinés comme seule valide (Palluel *et al.*) ou comme la composante d'un TEAC composite réunissant divers fractions solubles et insolubles (Kerchev et al. 2008). On précipite préalablement les protéines par acidification au TCA (acide trichloracétique) et le surnageant après centrifugation est testé tel quel. Cependant si celui-ci n'est pas fortement dilué ou tamponné avant la mesure du TEAC, l'acidité provoque la neutralisation de la fraction acido-labile des antioxydants.

Un essai réalisé dans notre laboratoire montre que la précipitation des protéines dans un S9 de gammare est maximum (80%) à partir de 2,5 -5% de TCA dans l'échantillon. Un autre essai montre que le S9 déprotéiné doit ensuite être prédilué au moins 20 fois avant dosage du TEAC (5 à 10 fois pour le chironome) pour éviter une inactivation de la fraction acido-labile des antioxydants durant le test

D'après nos essais le TEAC déprotéiné d'une série de gammare est environ 1,3 fois inférieur au TEAC (R^2 = 0,85)

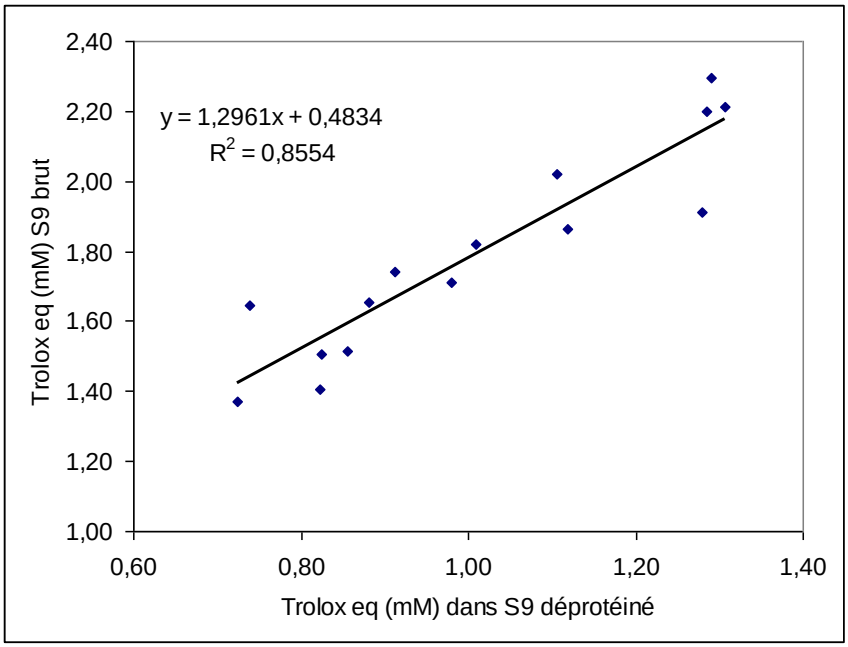


Figure 1 : Corrélation entre TEAC brut et TEAC déprotéiné sur une série de S9 prédilué