



HAL
open science

Dosage en microplaque de l'activité enzymatique Phénol Oxydase (PO)

P. Noury

► **To cite this version:**

P. Noury. Dosage en microplaque de l'activité enzymatique Phénol Oxydase (PO). 2016, pp.8. hal-02602441v3

HAL Id: hal-02602441

<https://hal.inrae.fr/hal-02602441v3>

Submitted on 26 Jan 2024

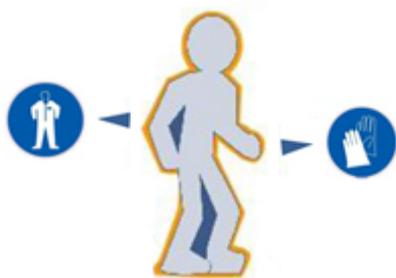
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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 de l'activité enzymatique Phénol Oxydase (PO)

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le présent mode opératoire nécessite l'utilisation de **Chymotrypsine** il convient donc de respecter les règles de sécurité indispensables à l'utilisation d'un tel produits.

Le schéma ci-contre rappelle des Equipements de Protection Individuels (EPI) 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	Nom : TUTUNDJIAN Fonction : IR	Nom : CHAUMOT Fonction : Responsable du laboratoire d'Ecotoxicologie

Mises à jour

N° de version	Date	Auteur	Modifications apportées par rapport à la précédente version
1.1	24/08/2021	PN	Quelques corrections de formes et précisions, et ajouts
1.2	24/01/2024	PN	désignation du tampon PBS

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	Matériel.....	4
3.2.2	Produits utilisés.....	4
3.2.3	Solutions préparées	4
	A l'avance	4
	Le jour du dosage	5
3.3	Mode opératoire.....	5
3.3.1	Préparation de la fraction S9.....	5
3.3.2	Préparation du spectrophotomètre.....	5
3.3.3	Réalisation de la plaque.....	6
3.3.4	Calculs.....	6
4	SYNTHESE DU DOCUMENT	7

1 INTRODUCTION

1.1 Objet et domaine d'application

Cette procédure décrit la mesure de l'activité enzymatique Phénol Oxydase en microplaque. La mesure est réalisée sur une fraction post-mitochondriale (cytosol) d'homogénat de tissus (organe ou organisme entier).

La mesure de l'activité phénol oxydase peut être utilisée en tant que marqueur biochimique du système immunitaire chez les invertébrés (insectes, mollusques). Elle est révélatrice d'une activité de défense cellulaire, en particulier chez les hémocytes, qui conduit par une cascade de réaction protéique à la synthèse de mélanine dont le rôle est d'encapsuler les agents pathogènes afin de faciliter leur élimination.

A noter que le présent document ne propose qu'une application sur extraits de gammare ou de larves d'odonates en attendant une plus ample expérience de notre laboratoire sur d'autres organismes.

1.2 Références

Le protocole, adapté pour la microplaque, est inspiré de la méthode de *Janssens, L. and R. Stoks (2014)*¹

1.3 Conditions d'application

La PO est en général mesurée au sein d'une batterie de biomarqueurs. L'extraction commune est alors réalisée dans du tampon phosphate pH 7,8 + triton 0,1% (voir protocole AChE). Le dosage de la PO est réalisé de préférence juste après extraction et centrifugation des échantillons, l'effet d'une congélation/décongélation des S9 n'ayant pas encore été testé

¹ Janssens, L. and R. Stoks (2014). "Non-pathogenic aquatic bacteria activate the immune system and increase predation risk in damselfly larvae." *Freshwater Biology* **59**(2): 417-426.

1.4 Définitions et abréviations

Pour les besoins du présent mode opératoire, les définitions et abréviations suivantes sont nécessaires :

- **Fraction S9** : surnageant obtenu après centrifugation de 15 minutes à 9000g des homogénats de tissus
- **PO** : Phénol Oxydase
- **L-DOPA** : 3,4-Dihydroxy-L-Phénylalanine
- **FCR** : Force Centrifuge Relative

2 VOLET SECURITE

L-DOPA



Chymotrypsine

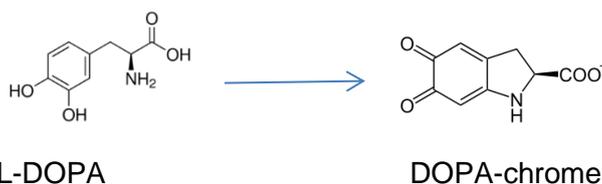


3 PROTOCOLE

3.1 Principe

En réaction avec le 3,4-Dihydroxy-L-Phénylalanine (L-DOPA) la phénol oxydase du cytosol conduit à la formation de dopachrome de couleur rouge dont l'absorbance est lue à 490 nm et à 30°C toutes les 30 secondes, durant 6 minutes (gammare) ou 45 minutes (odonate). L'activité est calculée sur la partie linéaire de la cinétique et exprimée en nmol de produit formé par minute et par mg d'équivalent matière fraîche (ou mg de protéines).

En plus de la phénol oxydase « active » on pourra doser la phénol oxydase « Totale » en pré incubant préalablement l'échantillon avec de la chymotrypsine pour transformer la part de pro-enzyme de l'échantillon en enzyme active.



3.2 Matériel et réactifs

3.2.1 Matériel

- Microtubes Eppendorf de 1,5 mL et microtubes 2 ml à bouchon vissant
- Bonbonne d'azote liquide
- Congélateur -80°C
- Broyeur à bille + billes de verre 2mm et acier 4mm
- Spectrofluorimètre à microplaques: (*Tecan Safire*) appareil permettant de lire des microplaques de 96 puits, il est piloté par ordinateur avec le logiciel XFLUOR (macro Excel)
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Verrerie et pipettes automatiques
Microplaque 96 puits (Greiner)
- Pipette automatique multi coup + réservoirs 1 ml (10µl/coup)
- Microplaques 96 puits sans couvercle (Greiner)

3.2.2 Produits utilisés

Tableau I : produits utilisés pour le dosage de la Phénol Oxydase

PRODUIT	N° CAS	RANGEMENT
Disodium Hydrogénophosphate dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10028-24-7	Armoire Produit (D34)
Potassium chlorure (KCl)	7447-40-7	Armoire Produit (E6)
Potassium dihydrogénophosphate, (KH_2PO_4)	7778-77-0	Armoire Produit (C7)
Sodium chlorure (NaCl)	7647-14-5	Armoire Produit (E8)
L DOPA (3,4-Dihydroxy-L-Phénylalanine) Sigma D9628	59-92-7	Armoire 2 (rayon Biochimie)
Chymotrypsine (A-CHYMOTRYPSIN FROM BOVINE PANCREAS) Sigma C4129	9004-07-3	Congélateur -20°C

3.2.3 Solutions préparées

A l'avance

- *Tampon phosphate (PBS), pH 7,4* :
1,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8,09 mM)
0,2 g de KCl (2,65 mM)
0,2 g de KH_2PO_4 (1,47 mM)
8 g de NaCl (137 mM)
Qsp 800 mL H_2O pure. Ajuster le pH à 7,4. Qsp 1 litre d' H_2O pure.

Le jour du dosage

- PBS 1/2 : pour une plaque ajouter 5 ml de PBS à 5 ml d'eau pure
- *L-DOPA* $1,97 \text{ mg.ml}^{-1}$ de PBS
Nécessaire pour une plaque : 10 ml
Comme la dissolution est lente, préparer la solution au moins 30 minute à l'avance
Agiter à l'abri de la lumière (papier alu)
- *Chymotrypsine* 5 mg.ml^{-1} d'eau pure
Nécessaire pour une plaque : 500 μl
Se conserve 3 jours à 4 °C mais utiliser de préférence une solution fraîchement préparée.

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 environ 400 μl de surnageant (S9) en microtube et conserver en bain de glace jusqu'au dosage à effectuer dans l'heure.

3.3.2 Préparation du spectrophotomètre

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

Measurement mode:	Absorbance
Measurement wavelength:	490 nm
Number of flashes:	1
Plate definition file:	GRE96ft.pdf
Number of kinetic cycles:	30
Kinetic interval:	30 s
Target Temperature:	30 °C

3.3.3 Réalisation de la plaque

Répartir dans une microplaque 96 puits les volumes suivants en triplicat :

	Gammare (1/10 m/v)	Larve Chironome (1/25 m/v)	Dreissen glande digest. (1/4 m/v)	Larve d'odonate	Blanc
<i>Tampon PBS 1/2</i>	80 µl	75 µl	80 µl	45 µl	95 µl
<i>Cytosol</i>	15 µl	50 µl	15 µl	50 µl	-
<i>Chymotrypsine</i>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<i>Incuber 5 minute à T° ambiante , légère agitation</i>					
<i>L-Dopa</i>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Pendant la phase d'incubation à la chymotrypsine préchauffer le L-Dopa à 40 °C. Le mélange de 100 µl de ce réactif préchauffé au 100 µl de milieu à température ambiante (20°C) entraîne un milieu réactionnel à la température de consigne de 30°C, maintenue à cette durant la durée de cinétique dans le spectrophotomètre.

Suivre l'absorbance à 490 nm toutes les 30 s et pendant 6 min quoique la zone linéaire de l'activité prise en compte pour le calcul d'activité correspond le plus souvent aux 3 premières minutes.

3.3.4 Calculs

Corriger préalablement chaque ΔDO (accroissement de DO/min):

$$\Delta DO = \Delta DO \text{ essai} - \Delta DO \text{ témoin}$$

Puis d'après Beer Lambert

$$\Delta DO = \varepsilon \times L \times \Delta c$$

$$\varepsilon = \text{coefficient d'absorption molaire du su Dopa-Chrome} = 3.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$L = \text{parcours optique pour } 200 \mu\text{l par puit} = 0,571 \text{ cm (estimation : } 1 \text{ cm} = 350 \mu\text{l)}$$

$$\Delta c = \text{accroissement de concentration en nmol/ml/min}$$

PO (nmol/min) = $\Delta c \times V$ = accroissement de quantité dans le puit par minute en **nmol/min**
(V = le volume réactionnel)

$$\text{PO (nmol/min)} = (\Delta DO * 0,2) / (0,0036 * 0,571)$$

$$\text{PO (nmol/min/mgfrais)} = ((\Delta DO * 0,2) / (0,0036 * 0,571)) / 1,5$$

1,5 = équivalent mg frais par puit pour du gammare extrait au 1/10 m/V et une prise d'essai S9 de 15 µl.

4 SYNTHÈSE DU DOCUMENT

