



HAL
open science

Dosage en microplaque de l'activité enzymatique AChE du gammare

P. Noury

► **To cite this version:**

P. Noury. Dosage en microplaque de l'activité enzymatique AChE du gammare. 2016, pp.9. hal-02602445v1

HAL Id: hal-02602445

<https://hal.inrae.fr/hal-02602445v1>

Submitted on 16 May 2020 (v1), last revised 26 Jan 2024 (v5)

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 AChE du gammare

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le présent mode opératoire nécessite l'utilisation de **5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)** et d' **Acétyl Thiocholine Iodide** il convient donc de respecter les règles de sécurité indispensables à l'utilisation de tels produits.

Le schéma ci-contre rappelle 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	2
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.....	6
3.3.3	Préparation de la microplaque et lecture	7
3.3.4	Calculs.....	7
4	SYNTHESE DU DOCUMENT	8

1 INTRODUCTION

1.1 Objet et domaine d'application

Mesure de l'activité enzymatique AChE (Acétylcholinestérase) par une méthode colorimétrique sur microplaque 96 puits à partir de la fraction post-mitochondriale (S9) d'un homogénat de gammare. Cette mesure peut être réalisée avec des homogénats gammares pêchés sur le terrain ou exposés en laboratoire. Elle permet le diagnostic de l'exposition des organismes aquatiques à des inhibiteurs de l'activité AChE tels que les pesticides organophosphorés et les carbamates.

1.2 Références

La méthode utilisée est basée sur le dosage colorimétrique en cuve de Ellman *et al.* (1961) adapté sur microplaque par Urios (1997). Autre références : Flammarion (1994), Galgani *et al.* (1991), Marden *et al.* (1994), Pollidès (1992). Xuereb (2007)

1.3 Conditions d'application

La station d'étude sur le terrain ou la condition expérimentale de laboratoire est caractérisée par l'échantillonnage de 5 lots de 5 gammares mâles d'un point de vue phénotypique. Chaque lot de gammares doit avoir une masse comprise entre 80 et 100 mg afin de s'affranchir d'un effet taille observé avec ce biomarqueur.

Pour la récolte sur le terrain, les substrats propices sont grattés, les gammares recueillis au filet de Surber, tamisés entre 2,5 et 2 mm puis stabulés jusqu'au laboratoire dans un seau avec de l'eau de la rivière.

Ils sont successivement pesés par lots de 5 individus après un bref essorage sur papier absorbant (noter le poids). Chacun des 5 lots est conditionné en tube de 2 ml polypropylène à bouchon vissant, congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C jusqu'au dosage.

L'extraction, la centrifugation et la conservation des surnageant jusqu'à l'analyse sont réalisés à 4°C (bain de glace). La réaction enzymatique en microplaque doit être réalisée à $19-21^{\circ}\text{C}$ (climatisation en été).

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 15 minutes à 9000g des homogénats de gammares.

AChE : Acétylcholinestérase

ATCi : Acétylthiocoline

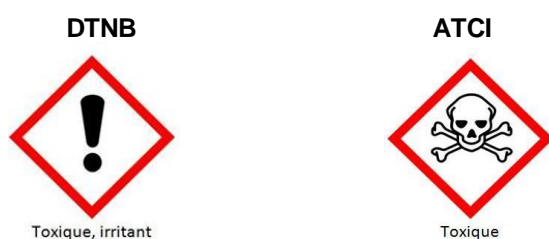
DTNB : dithiobisnitrobenzoate

TNB : 5-thio-2-nitro-acide benzoïque

BSA : Bovine Serum Albumine

FCR : Force Centrifuge Relative

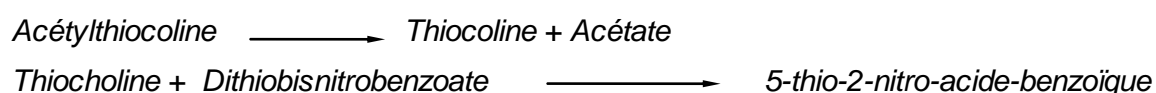
2 VOLET SECURITE



3 PROTOCOLE

3.1 Principe

Après broyage et centrifugation de l'échantillon on mesure, sur la fraction S9, la capacité de l'AChE à dégrader l'acétylthiocoline (ATCi), analogue de l'acétylcholine. La thiocoline formée réagit avec l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former le 5-thio-2-nitro-acide benzoïque (TNB), un complexe de coloration jaune, stable à un pH voisin de 7,8 et à la température ambiante aux environs de 20°C.



L'intensité de la coloration jaune est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm, toutes les 30 secondes à partir du début de la réaction.

Une activité AChE étalon peut être mesurée parallèlement sur une gamme d'enzyme commerciale.

Contrairement au dosage sur poisson, l'activité témoin sans substrats (ATCi) est négligeable ; sa mesure devient donc facultative.

Pour le gammare, l'activité enzymatique AChE peut être exprimée directement en nmol /min pour des conditions constantes de mise en œuvre (rapport masse/volume de tampon de 1/10 et prise d'essai de S9 de 20 µl).

Avec étalonnage de la mesure au moyen d'une gamme étalon d'enzyme, l'activité est exprimée en Unité enzymatique par gramme frais (U/g).

3.2 Matériel et réactifs

3.2.1 Produits utilisés

Nom	N° CAS	Ref. Fournisseur	Localisation
Disodium Hydrogenophosphate (Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O)	10039-32-4	Sigma # 71650	Armoire 1 (E9)
Potassium dihydrogenophosphate, (KH ₂ PO ₄)	7778-77-0	Sigma # P5655	Armoire 1 (C7)
Triton X 100	9002-93-1	Sigma # 234729	Armoire 1
DTNB	69-78-3	Aldrich # D218200	Armoire 2
Acétyl Thiocholine Iodide	1866-15-5	Sigma # A5751	Congél. -20°C
AChE étalon	9000-81-1	Sigma # C3389	Congél. -80°C
Bovine Serum Albumine (BSA)	9048-46-8	Sigma # A7906	Congél. -20°C

3.2.2 Solutions préparées

Tampon phosphates (100 mM, pH 7,8)

- solution A : 35,8 g de Na₂HPO₄, 12H₂O (358 g.mol⁻¹) dans 1l d'eau ultra pure.
- solution B : 3,4 g de KH₂PO₄ (136 g.mol⁻¹) dans 250ml d'eau ultra pure

La solution A est ajustée à pH 7,8 avec la solution B. Se conserve au frais (3-7°C) jusqu'à 6 mois. Verrerie spécifique.

Tampon de broyage

Le tampon de broyage est du tampon phosphate (100mM, pH7,8) additionné de 0,1 % de Triton X100 (exemple pour 50 µl + 50 ml). Bien agité à l'aide d'un barreau aimanté.

Solution de DTNB 0,0076 M

Le jour du dosage, dissoudre 30,119 mg de DTNB (396,4 g.mol⁻¹) dans 10 ml de tampon phosphate (100mM, pH 7,8). Conserver à température ambiante

Solution de D'ATCI 0,076 M

Extemporément, dissoudre 21,9776 mg d'ATCI (289,2 g.mol⁻¹) par ml d'eau pure (32,9664 mg /1,5 ml pour une plaque). Conserver au froid dans la glace.

Gamme étalon d'AChE

L'utilisation d'une gamme étalon d'enzyme est en cours de validation. Le mode opératoire est néanmoins présenté à titre indicatif.

Une gamme étalon peut être réalisée à partir d'AChE commerciale Sigma (réf : C3389) extraite d'une anguille électrique (*Electrophorus electricus*). Pour cela une solution mère (**SM**) est préparée en dissolvant les 500 Unités du flacon d'AChE dans 1000 µl de tampon phosphate additionné de BSA à 1mg/ml. Cette solution à 500 U/ml est ensuite aliquotée en tube de 0,5 ml à raison de 40 µl (20 U) par tube puis congelés et conservés à -80°C.

Extemporément, un aliquote est décongelé puis un volume de 20 µl dilué dans 2000 µl (20µl+1980µl) de tampon phosphate +BSA

A partir de cette solution fille (**SF**) à 5 U/ml une gamme en progression géométrique de raison 2/3 est réalisée en microtube dans du tampon+BSA.

Tableau 1 : Exemple de gamme étalon d'AChE

N°Tube	0	1	2	3	4	5	6	SF
Volume tampon+BSA (µl)	400	400	400	400	400	400	400	0
volume d'AChE (µl)	0	800 de 2	800 de 3	800 de 4	800 de 5	800 de 6	800 de SF	2000
U/ml	0	0,44	0,66	0,99	1,48	2,22	3,33	5
U/puit (prise d'essai = 20 µl)	0	0,009	0,013	0,020	0,030	0,044	0,067	0,100

3.2.3 Matériel

- Microtubes Eppendorf 1,5ml
- Tubes 2 ml en polypropylène bouchon à vis
- Bille acier 4 mm + billes de verre 2 mm
- Broyeur à bille muni d'un carrousel 24 tubes 2 ml
- Azote liquide
- Congélateur -80°C
- Spectrophotomètre à microplaques
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Machine à glace
- Verrerie courante de laboratoire
- Pipettes automatiques monocanal (10µl, 200µl 1000 µlet 5000 µl) et multicanaux (8 canaux - volumes 50-300µl)
- Embouts pour pipettes
- Pipette automatique multi coup + réservoirs 1 ml (10µl/coup)
- Microplaques 96 puits sans couvercle (Greiner)

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 Réglage du spectrophotomètre

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

- Allumer le spectrofluorimètre (bouton derrière en bas à gauche) et l'ordinateur.
- Ouvrir le programme Xfluor4 : Démarrer/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:	405 nm
Number of flashes:	1
Plate definition file:	GRE96ft.pdf (plaque greiner)
Number of kinetic cycles:	7
Kinetic interval:	30 secondes

3.3.3 Préparation de la microplaque et lecture

Après ajustement de la température du tampon phosphate à 20°C (bain marie), déposer en triplicat dans chaque puit d'une microplaque Greiner 96 puits :

- 330 µl de tampon phosphate 0,1M pH 7,8 (2x165 µl ; pipette multicanaux)
- 20 µl d'homogénat ou de solution étalon d'AChE
- 20 µl de DTNB (pipette multicanaux)
- 10 µl rapidement de substrat ATCI (Multipette)*

*Etant donné la rapidité de la réaction et la faible durée de la cinétique on choisit par convention d'ajouter l'ATCI en premier dans la gamme puis dans les échantillons.

Mesurer ensuite l'absorbance à 405 nm toutes les 30 secondes durant au moins 3 minutes (7 cycles de mesure)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc			0,0088			0,0132			0,0198		
B	Ech.1	Ech.2	Ech.3	Ech.4	Ech.5	Ech.6	Ech.7	Ech.8	Ech.9	Ech.10	Ech.11	Ech.12
C	Ech.13	Ech.14	Ech.15	Ech.16	Ech.17	Ech.18	Ech.19	Ech.20	Ech.21	Ech.22	Ech.23	Ech.24
D												
E												
F												
G												
H	0,0296			0,0444			0,0667			0,1000		

Figure 1 : Exemple de schéma de plaque pour 24 échantillons et une gamme étalon

3.3.4 Calculs

Pour chaque étape de la cinétique, calculer la moyenne, l'écart type et le pourcentage de variation de chaque triplicat de mesure, en écartant les valeurs qui éventuellement entraînent plus de 10 % de variation.

Copier-coller les valeurs moyennes dans un tableau et calculer la pente (DO/min) de chaque cinétique pour 0-3 minutes.

Calcul de l'AChE en nmol/min

C'est le mode d'expression utilisé jusqu'à maintenant par notre laboratoire. Il correspond à la quantité de TNB produite par minute dans un puit de microplaque aux conditions définies par la méthode : extraction 1/10 (m/V), 20 µl de prise d'essai, 380 µl de milieu réactionnel et 1 cm de trajet optique.

$$\text{Activité AChE} = \text{dDO} \times \frac{V}{\varepsilon \times L} = \text{dDO} \times \frac{0,38}{0,0136 \times 1}$$

dDO = pente de la cinétique entre 0 et 3 min (abs/min)

V = volume réactionnel (ml)

ε = coefficient d'absorption molaire du TNB = 0,0136 mM⁻¹ cm⁻¹.

L = trajet optique (cm)

Calcul de l'AChE en U/g frais

L'unité enzymatique AChE est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1,0 micromole d'acétylcholine par minute ; communément à pH 8,0 et 37 °C (notice Sigma) mais par extension à pH 7,8 et à 20°C pour le dosage chez les organismes aquatiques.

Au moyen de la gamme étalon d'enzyme, l'activité AChE en DO/min est convertie en U/puit selon une relation de type $y = a \cdot x$:

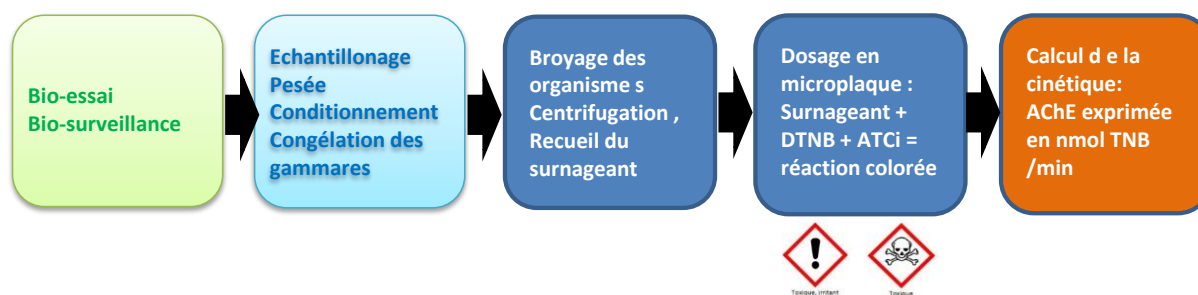
$$(\text{AChE U/puit}) = (\text{AChE Do/min}) / a$$

Pour 20 µl de prise d'essai de S9 (2 mg équivalent poids frais) on a donc :

$$(\text{AChE U/ g frais}) = ((\text{AChE U/puit}) / 2) * 1000$$

L'étalonnage au moyen d'un enzyme étalon peut être une référence pour le suivi de la qualité des mesures (carte de contrôle) et d'éventuelles comparaisons inter laboratoire. Dans l'absolu il permet de s'affranchir des incertitudes¹ liées aux valeurs respectives du trajet optique et du coefficient d'absorption molaire utilisés pour l'expression en nmol/min. La qualité de l'étalonnage dépend revanche de facteurs pouvant entraîner une fluctuation de la qualité de l'enzyme (origine, lot de fabrication, conditions de transport et de conservation, préparation des aliquotes...). Le suivi (en cours) de la variabilité des étalons d'AChE au cours du temps est donc un préalable à la validation de cette méthode pour l'expression de l'AChE.

4 SYNTHÈSE DU DOCUMENT



¹ Note technique : Eléments de réflexion pour la révision du protocole de mesure de l'activité acétylcholinestérase (AChE) chez le gammare. P. Noury ; Document interne Irstea (2014)