



HAL
open science

Dosage en microplaque de l'activité Carboxyl Esterase (CE)

P. Noury

► **To cite this version:**

| P. Noury. Dosage en microplaque de l'activité Carboxyl Esterase (CE). 2022. hal-02602446v1

HAL Id: hal-02602446

<https://hal.inrae.fr/hal-02602446v1>

Submitted on 16 May 2020 (v1), last revised 25 Jan 2024 (v3)

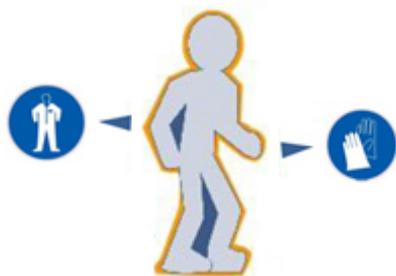
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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 de l'activité enzymatique Glutathion S-Transférase (GST)

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le présent mode opératoire nécessite l'utilisation de **1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE** (CDNB) il convient donc de respecter les règles de sécurité indispensables à l'utilisation d'un tel 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.....	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	5
3.3.1	Préparation de la fraction S9	5
3.3.2	Préparation du spectrophotomètre	6
3.3.3	Réalisation de la plaque	6
3.3.4	Calculs	7
4	SYNTHESE DU DOCUMENT	8

1 INTRODUCTION

1.1 Objet et domaine d'application

Cette procédure décrit la mesure de l'activité enzymatique Glutathion-S-Transférase en microplaque. La mesure est réalisée sur une fraction post-mitochondriale (S9) d'homogénat de tissus (organe ou organisme entier).

Cette mesure peut être réalisée à partir d'homogénats de foies de muscle, de branchie ainsi que sur des organismes entiers de gammaré, daphnie, larve de chironome, potamopyrgus, ou poisson au stade larvaire ou juvénile. D'une part, l'activité GST entre le processus de détoxification de phase II des xénobiotiques hydrophobes (HAP, pesticide, PCB), d'autre part, l'implication du glutathion relie ce marqueur aux paramètres descripteurs du stress oxydant.

1.2 Références

Le protocole, adapté pour la microplaque, est inspiré de la méthode Habig *et al.*¹ (1976).

1.3 Conditions d'application

La GST 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 GST sera réalisé de préférence juste après extraction et centrifugation des échantillons mais supporte la congélation/décongélation des S9. Dans ce cas il est impératif de réaliser la mesure dans un délai optimal ne dépassant pas 1 heure après décongélation des S9. Les dilutions préalables éventuelles des cytosols ainsi que le mélange réactionnel sont effectués en tampon phosphate pH 6,5. L'extraction, la centrifugation et la conservation des surnageants jusqu'à l'analyse sont réalisés à 4°C (bain de glace). La réaction enzymatique en microplaque doit être réalisée à 19-21 °C (climatisation en été).

¹ Habig, W. H., et al. (1976). "Glutathione S-transferase AA from rat liver." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **175**(2): 710-716.

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
- **GST** : Glutathion-S-Tranférase
- **GSH** : L-Glutathion réduit
- **CDNB** : 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE

2 VOLET SECURITE

CDNB



3 PROTOCOLE

3.1 Principe

On mesure l'activité de conjugaison du glutathion réduit (GSH) et d'un substrat, le 1 chloro 2,4 dinitrobenzene (CDNB) via l'enzyme de phase II la Glutathion-S-Tranfèrase contenu dans un échantillon. La Glutathion-S-Tranfèrase étant une enzyme soluble, le dosage est réalisé sur cytosol. La fraction cytosolique est contenue dans un surnageant (S9) obtenu après homogénéisation dans un tampon phosphate et centrifugation à 9000 g. Pour une conservation des homogénats ou des cytosols à -80°C , on peut ajouter préalablement une proportion de 20 % de glycérol au tampon.

3.2 Matériel et réactifs

3.2.1 Produits utilisés

Tableau I : produits utilisés pour le dosage de la GST

PRODUIT	N° CAS	RANGEMENT
Dipotassium Hydrogénophosphate (K_2HPO_4)	7758-11-4	Armoire 1 (B 42)
Potassium Dihydrogénophosphate, (KH_2PO_4)	7778-77-0	Armoire 1 (C7)
CDNB (1-Chloro 2,4 Dinitrobenzene)	97-00-7	Armoire 1 (C 41)
L-glutathion réduit (GSH)	70-18-8	Réfrigérateur Biochimie (réactif 2)

3.2.2 Solutions préparées

Tampon phosphate 100 mM, pH 6,5 :

PO_4H_2K (PM = 136.09) à 0.2 M soit 2.722 g dans 100ml

PO_4HK_2 (PM = 228.23) à 0.2 M soit 4.565 g dans 100 ml

Pour un Tampon à pH 6.5 : 100 ml de PO_4H_2K + environs 55 ml de PO_4HK_2
A ajuster au PHmètre

Tampon de broyage

C'est un tampon phosphate (100mM, pH 7,8) additionné de 0,1 % de Triton X100 (exemple pour 50 μ l + 50 ml). Bien agiter à l'aide d'un barreau aimanté. A noter que c'est le tampon commun à la plupart des biomarqueurs (voir dosage de l'ACHE).

Solution de CDNB

Solution à 38 mM (202,56 $g \cdot mol^{-1}$) dans l'éthanol :

Nécessaire pour une plaque : 15,4 mg dans 2 ml d'éthanol pur (7,7 $mg \cdot ml^{-1}$).

Protéger la solution de la lumière (papier alu)

Solution de GSH

Solution à 2.235 mM (307,33 $g \cdot mol^{-1}$) dans le tampon phosphate pH 6,5

Nécessaire pour une plaque : 17,18 mg dans 25 ml de tampon

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 µl et 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.

Pré-dilution du cytosol : chaque S9 doit être préalablement prédilué dans du tampon phosphate pour qu'avec une prise d'essai de 20 µL on ne dépasse pas 1,5 d'absorbance en 3 minutes de cinétique.

- **1/8** (12,5%) pour des **gammarex** extraits à 1/10 (m/V)
- **Pur** (20 µl) pour des **chironomes** extraits au 1/25 (m/V)
-pour des **potamos** extraits au 1/50 (m/v)
- pour du foie de **poisson** extrait au 1/20 (m/v)

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-dessous.

Measurement mode:	Absorbance
Measurement wavelength:	340 nm
Number of flashes:	1
Plate definition file:	GRE96ft.pdf
Number of kinetic cycles:	15
Kinetic interval:	30 s

3.3.3 Réalisation de la plaque

- préparer extemporanément la mixture :
 Au minimum : 17 ml GSH + 1 ml CDNB = 18 ml pour une plaque
 Ou plus confortable : 21,25 ml GSH + 1,25 ml CDNB = 22.5 ml)
- répartir dans une microplaque 96 puits les volumes suivants en triplicat :

	Essai	Témoin
<i>Tampon</i>	150 µl	170 µl
<i>Cytosol (dilué ou non)</i>	20 µl	-
<i>Mixture</i>	180 µl	180 µl

Suivre l'absorbance à 340 nm toutes les 15 s si possible sinon toutes les 30 s et pendant au moins 3 min

3.3.4 Calculs

Activité GST en nmol/min

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

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

Puis d'après Ber Lambert

$$\Delta \text{DO} = \varepsilon \times L \times \Delta c$$

ε = coefficient d'absorption molaire du CDNB conjugué = $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig, 74)

L = parcours optique pour 350 μl par puit = 1 cm (estimation)

Δc = accroissement de concentration en nmol/ml/min

On cherche

ΔQ = $\Delta c \times V$ = accroissement de quantité dans le puit par minute en **nmol/min**

(V = le volume réactionnel)

$$\Delta Q = (\Delta \text{DO} \times 0,35) / 0,0096$$

Activité GST en nmol/min/mg frais

Soit C_m = concentration en équivalent matière fraîche dans le S9 (mg/ml)

Soit v = volume de S9 (dilué) dans le puit de microplaque en ml

Soit R le rapport de pré-dilution du S9

$Q_m = (C_m \times v \times R)$ = quantité d'équivalent matière fraîche dans le puit en **mg**

GST = $\Delta Q / Q_m$ en **nmol/min/mg frais**

Formule intégrée (nmol/min/mg frais) pour le gammare extrait au 1/10 :

$$\mathbf{GST = \Delta DO \times 145,83 \text{ nmol/min/mg frais}}$$

Activité GST en nmol/min/mg protéines

soit C_p = concentration en protéines du S9 en mg/ml

soit v = volume de S9 dans le puit de microplaque en ml

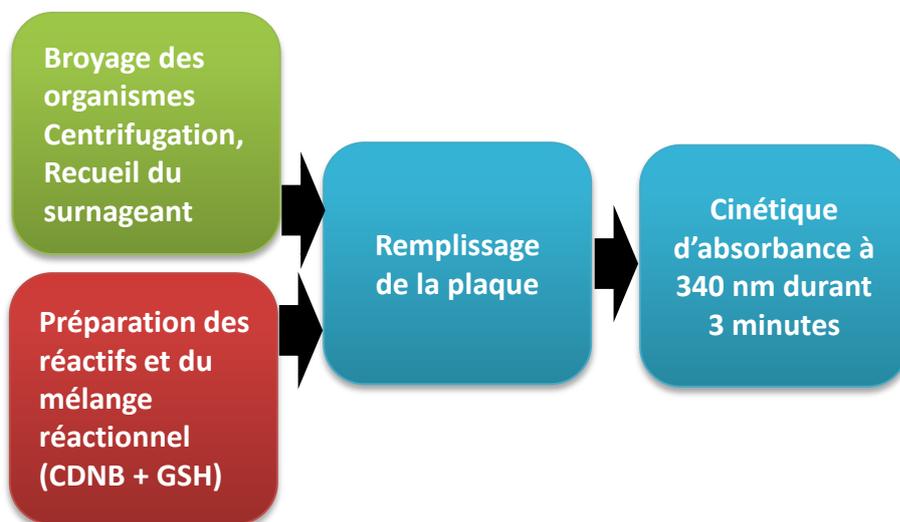
Soit R le rapport de pré-dilution du S9 (exemple : 1/8)

Q_p = $C_p \times v \times R$ = quantité de protéine dans le puit en **mg**

$$Q_p = C_p \times 0.002 \times R$$

GST = $\Delta Q / Q_p$ en **nmol/min/mg prot**

4 SYNTHÈSE DU DOCUMENT



Habig, W. H., et al. (1976). "Glutathione S-transferase AA from rat liver." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **175**(2): 710-716.