

EXPÉRIENCES D'ENZYMOLOGIE AVEC L'ÉLECTRODE À OXYGÈNE ET LE SYSTÈME D'ACQUISITION ORPHY - REGRESSI

1^{ère} partie : l'électrode à oxygène : capteur d'une réaction enzymatique

Guy DURLIAT

Principe

La glucose-oxydase (GOD) d'un mélange réactionnel tamponné oxyde le glucose en consommant du dioxygène. L'électrode de Clark plongée dans le milieu détecte la baisse de la teneur en dioxygène dissous. La courbe obtenue est analysée par modélisations.

Matériel

- micro-ordinateur compatible PC,
- interface analogique/numérique Orphy GTS (1),
- module oxymètre et électrode de Clark Micrélec (2),
- logiciel Régressi, version pour Orphy « Régorphy » (3),
- erlen-meyer de 25 ml à col étroit,
- agitateur magnétique et barreau aimanté,
- pipette graduée de 0.5 ml ou pipette automatique de 1 ml,
- facultatif :
 - sonde de température 0-100 °C Micrélec (2),
 - amplificateur-décaleur physique Micrélec (2).

Produits

- mélange-réactifs d'un coffret glucose par GOD/PAP Biomérieux 6127 1 ou équivalent (préparation de GOD à 15 U/ml),
- solutions de glucose dans l'eau distillée à 1 et 2 g/l,
- eau « physiologique » (NaCl 9 g/l).

I. BRANCHEMENTS ET MISE EN SERVICE DE L'ÉLECTRODE À OXYGÈNE

I.1. Branchements (fig. 1)

Orphy raccordée au port série de l'unité centrale du PC (Régressi gère le COM 1 - par défaut - ou le COM 2), on met sous tension l'ordinateur puis l'interface. La fiche DIN du boîtier de l'oxymètre est branchée sur la prise latérale F d'Orphy, contacteur REF en position 0 (le signal sera compris entre 0 et 5 V). L'électrode s'adapte sur le boîtier par sa fiche jack coaxiale.

I.2. Préparation de la sonde à oxygène (fig. 2a)

Après un éventuel nettoyage des électrodes au moyen d'un abrasif super-fin, on dépose dessus la solution d'électrolyte et recouvre d'un carré de membrane de téflon (perméable aux seuls gaz) qu'on fixe à l'aide du joint circulaire ou de la bague souple selon le modèle de l'électrode. Ainsi montée et branchée, l'électrode plongée dans l'eau se polarise en quelques minutes.

I.3. Mise en service

Charger Régressi ; Fichier/Orphy GTS ouvre l'écran d'acquisition. On procède aux réglages :

Voie : 1 voie (2 pour une acquisition simultanée de la température),
 Voie A : 2 (entrée analogique EA2 5V de la prise F),
 Réf : 0 (par défaut),
 Nom : O₂ Unité ou Commentaire : %,
 Etalonne : offre deux possibilités :

non interactif (manuel) : on entre les % O₂ correspondant aux bornes de l'entrée :

tension mesurée (V)	grandeur physique (% O ₂)
0	0
5	100

interactif : par deux solutions-étalons :

- l'électrode dans la solution « 0 » du coffret, on amène le curseur écran au zéro de l'échelle avec le bouton Décalage Zéro du module et entre la valeur 0 de ce premier point.

- on lave soigneusement corps et membrane et trempe l'électrode dans de l'eau bien aérée par agitation : on amène le curseur à 90 % - valeur estimée de la saturation - à l'aide du bouton Pente et entre ce deuxième point.

Rem : dans la plupart des cas, le zéro absolu n'étant pas nécessaire, l'étalonnage manuel est le plus pratique. Le Décalage Zéro restera positionné à son minimum.

I.4. Test de bon fonctionnement

Le signal étant fonction de la vitesse de diffusion du gaz, donc de sa pression partielle... et de l'agitation du milieu, on vérifie très simplement l'activité du capteur :

Dans l'eau agitée le curseur doit rester stable ; l'arrêt de l'agitation se traduit par une baisse rapide de la tension qui doit retrouver sa valeur quand on relance l'agitation, ce qu'on peut visualiser en programmant une acquisition :

- Abscisse : temps,
- Enregistrement : Durée (s) : 180,
- Nombre de mesures : 0 (relevé automatique),
- Déclenchement : Clavier.

La barre espace déclenche l'acquisition, on observe à l'écran l'effet de l'arrêt/reprise de l'agitation (fig. 3).

A la fin (ou avant la fin), la validation puis la réponse « Oui » au message « Acquisition terminée » fait quitter Orphy et renvoie le tableau des données t/O₂.

I.5. Conservation de l'électrode

Entre les expériences, le capteur se conserve dans l'eau. Le test de fonctionnement précédent révélera le besoin de le reconstituer.

II. MISE EN ÉVIDENCE DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE PAR LA RÉACTION CATALYSÉE PAR LA GLUCOSE-OXYDASE

On peut procéder de deux façons :

- soit plonger le capteur dans le mélange réactionnel (GOD) et déclencher la réaction en ajoutant une prise de glucose,

- soit l'inverse : le capteur est plongé dans une solution de glucose, on déclenche la réaction par introduction de GOD.

II.1. Déclenchement par addition du glucose

- Le réactif GOD Biomérieux est dilué 2 fois avec de l'eau physiologique.
- On en introduit dans la fiole un volume suffisant pour que, l'électrode plongeant, son niveau arrive jusqu'au col, soit environ 20 ml (fig. 2b).
- On réajuste le curseur à 90 % par le bouton Pente.
- Le programme d'acquisition est préparé : durée 15 minutes.
- L'acquisition est déclenchée par la barre espace. Après quelques instants - pour contrôle à l'écran de la stabilité du signal - on ajoute le plus rapidement possible une prise de 0.4 ml de glucose à 2 g/l.

On observe à l'écran presque instantanément une baisse sur l'échelle du pointeur actif « O₂ ». Parallèlement, le milieu se colore en rose.

- En fin d'enregistrement, on valide et sauvegarde les données (Fichier/Sauve).

Un exemple de courbe est reproduit à la fig. 4a.

II.2. Déclenchement par addition de l'enzyme

- On remplit la fiole d'une solution de glucose à 1 g/l de façon qu'avec l'électrode et l'agitation sa surface atteigne le col (fig. 2b) ; un repère permettra de prendre ensuite toujours le même volume.
- On déclenche l'acquisition (programme du I4) ; après une minute - contrôle de stabilité - on ajoute rapidement la solution enzymatique (0.5 ml, non diluée) : la baisse de la teneur en O₂ est suivie en temps réel à l'écran.
- En fin d'acquisition, on valide et sauve ces données.

III ANALYSE DE LA COURBE OBTENUE

III.1. Interprétation

Le contact substrat-enzyme déclenche l'oxydation du glucose qui consomme du dioxygène. La baisse de la teneur de ce gaz dissous dans le milieu réactionnel est détectée par le capteur ampérométrique de Clark.

La réaction s'arrête, par manque de glucose dans nos conditions d'expérience (dans d'autres conditions l'oxygène pourrait être limitant).

On voit qu'après la fin de réaction marquée par le plateau de faible % O₂, l'enregistrement a tendance à « remonter ». C'est que dans notre montage, le milieu n'étant pas isolé de l'air ambiant il redissout lentement du dioxygène.

La coloration progressive du milieu est due à une réaction indicatrice couplée : la peroxydase (POD) du mélange-réactifs oxyde un chromogène incolore en un composé rose à l'aide du peroxygène produit par la GOD.

Schématiquement :



Rem : dans le cas de l'acquisition simultanée de la température, on juge de sa stabilité dans ce dispositif non thermostaté.

III.2. Etude des phases de la courbe O₂ = f(t) (fig. 3) :

On cherche les fonctions paramétrées des phases cinétique et d'arrêt de la courbe à l'aide du module Modélisation de Régressi. Il permet de définir plusieurs intervalles dont on propose l'équation-modèle (voir 9).

III.2.1. Modélisation de la phase initiale :

La fonction Régression Linéaire du logiciel n'est pas pratique ici : s'appliquant à l'ensemble des points, il faudrait d'abord éliminer tous ceux hors de la partie linéaire. On opte pour une modélisation par entrée d'équation.

On marque les bornes de cette phase d'ordre 0 (on peut s'aider du zoom pour repérer la linéarité), on entre l'équation d'une droite. On obtient les paramètres avec leur incertitude (fig. 4B) : l'écart relatif moyen courbe théorique - données expérimentales permet d'apprécier l'adéquation.

La pente donne la vitesse initiale de la réaction enzymatique.

III.2.2. Modélisation de la fin de réaction :

On borne les points de valeur minimum et entre une constante : on obtient la valeur du plateau de fin de réaction (fig. 4b).

Remarque : La modélisation de la phase de décroissance suivant la phase initiale ne pose pas de problème : on introduit une équation d'ordre 1.

COMMENTAIRES

L'électrode à oxygène Micrélec se révèle très didactique (véritable électrode de Clark des livres), est très facile à reconstituer et à manipuler. On est surpris par ses réponses très rapides, sa sensibilité et sa bonne stabilité. Avec ce capteur, on accède à tout un domaine d'expérimentation réservé auparavant aux possesseurs d'oxygraphes sophistiqués. Les références 4-6 indiquent des logiciels dédiés l'utilisant pour diverses expériences de biologie.

Le montage très simple décrit ici rend aisées la manipulation des solutions et l'addition de réactifs. Mais le *contact* - bien que réduit - avec l'air limite la validité des résultats en particulier aux faibles concentrations de glucose (la teneur en oxygène détectée est à tout moment la résultante de sa consommation par la réaction enzymatique et de sa redissolution dans le milieu agité). Pour éviter cette difficulté, il faut adapter un bouchon à l'électrode mais muni d'un tube de trop-plein pour éliminer l'air et permettre l'ajout de réactifs.

On peut par ailleurs fixer la *température* du milieu en plongeant la fiole dans un bain thermostaté. Le décaleur-amplificateur Micrélec permet d'ouvrir une plage de 5° C avec la sonde de température 0 - 100° C.

On a vu que si la préparation de GOD employée est le mélange tampon/enzymes d'un coffret glucose/GOD-POD, on observe parallèlement à la consommation d'oxygène la coloration du milieu. On peut envisager une *double acquisition* par Orphy-Régressi des paramètres % O₂ et Absorbance du milieu, donc le tracé simultané à l'écran des célèbres courbes substrat et produit en fonction du temps. Nous le faisons :

- soit en déclenchant au même instant la réaction dans des milieux équivalents séparés : l'un dans le spectrophotomètre, l'autre dans la fiole « oxygène »,
- soit en amenant à l'aide d'une pompe péristaltique la solution dans une cuve à circulation de spectrophotomètre.

Des comparaisons de sensibilité des deux détections deviennent possibles.

Guy DURLIAT (membre du groupe EVARISTE)
Ecole Normale Supérieure de Cachan
Département de Biochimie-Génie Biologique
61 avenue du Président Wilson
94235 Cachan Cedex

N.B. La suite de cet article sera consacrée à l'étude quantitative de la concentration du substrat sur les courbes enregistrées (2^{ème} partie) et à la réalisation d'une électrode enzymatique à glucose (3^{ème} partie).

RÉFÉRENCES

Matériel informatique

1 : Orphy GTS, interface analogique/numérique conçue par le groupe Evariste (DLC15-CNAM), fabriquée et distribuée par MICRELEC, 4 place A. Leblanc, 77120 Coulommiers.

2 : Capteurs (oxygène, température, lumière, pression ...) conçus pour l'interface Orphy par le groupe Evariste et distribués par MICRELEC. Un amplificateur-décaleur permettant d'adapter ou d'amplifier des capteurs pour l'interface Orphy est disponible.

Logiciels

Les logiciels suivants conçus par le groupe Evariste sont distribués par MICRELEC.

3 : Régressi, logiciel d'acquisition, de traitement et de modélisations de données conçu par J-M. Millet. Des versions différentes sont adaptées à la plupart des interfaces.

4 : Photor, logiciel d'étude de la photosynthèse (A. Videaud, J.F. Madre) utilisant les capteurs oxygène et luxmètre.

5 : Respor, logiciel d'étude de la respiration de végétaux, animaux, micro-organismes (A. Videaud, J.F. Madre) utilisant le capteur oxygène et éventuellement la sonde de pH.

6 : Méthor, logiciel d'étude du métabolisme humain, de A. Videaud et J.F. Madre, utilisant le capteur oxygène et un boîtier de mesure du volume d'air expiré.

L'électrode à oxygène.

7 : « L'électrode à oxygène, capteur d'une réaction enzymatique ». Guy Durliat, recueil de TP informatisés , groupe Evariste - CNAM. A paraître.

8 : article issu de l'université d'été de septembre 1992 « Informatique et Enseignement Technique de la Biologie » à paraître dans l'Opéron. Il concerne le suivi informatique de différentes réactions au moyen de l'électrode à oxygène et de l'interface Orphy.

Autres expériences avec Orphy-Régressi

9 : « Acquisition et exploitation de données à l'aide de l'interface Orphy et du logiciel Régressi ». Guy Durliat et J-M. Millet :

- EPI, sept 90, n°59, 195-208.
- l'Opéron spécial informatique, XVI, 1990, n°3-4, 29-46 (journal de l'UPBM : Union des professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie, Lycée La Martinière, avenue A. Sakharov, 69338 Lyon cedex 9).

10 : « L'informatisation des dosages pHmétriques avec l'interface Orphy et le logiciel Régressi ». Guy Durliat et J-M Millet :

- EPI, déc 91, n°64, 163-172, EPI, mars 92, n°65, 103-117,
- l'Opéron, XVII, 1991, n°2, 3-16.

11 : Entretiens de la Villette « Les Biotechnologies », 6-7 avril 1991. Présentation d'un réacteur expérimental à enzyme immobilisé suivi par ordinateur et d'un montage vidéo. Guy Durliat. Actes 109-111 (publications de la Cité des Sciences et de l'industrie).

12 : « Travaux pratiques avec la b-galactosidase ». Guy Durliat

- 1ère partie : enzyme solubilisé. L'Opéron, XVIII, 1992, n°1,
- 2ème partie : immobilisation et réacteurs. L'Opéron, XVIII, 1992, n°2.

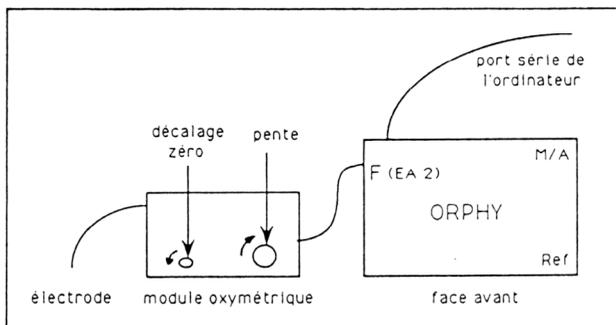


figure 1. Branchement de l'électrode à oxygène.

L'interface alimente le module oxymétrique et numérise le signal produit par le capteur. Elle communique avec l'ordinateur par un port série.

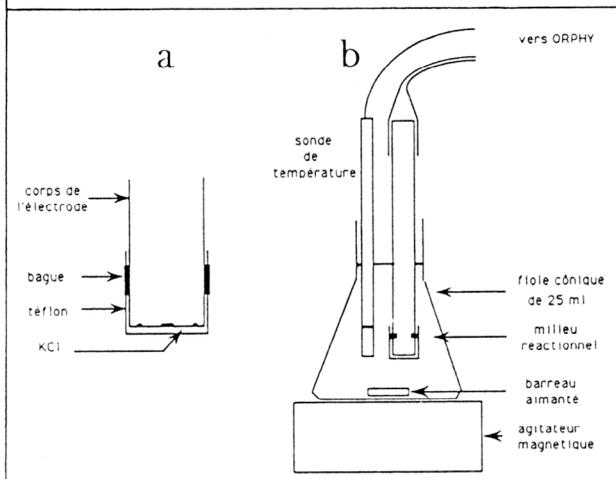


figure 2. Préparation de l'électrode et dispositif de mesure.

a : le compartiment électrode - électrolyte est isolé par une membrane hydrophobe perméable aux gaz dissous.

b: dans ce dispositif simple, le milieu n'est pas isolé de l'air ambiant.

La sonde de température éventuellement amplifiée est facultative.

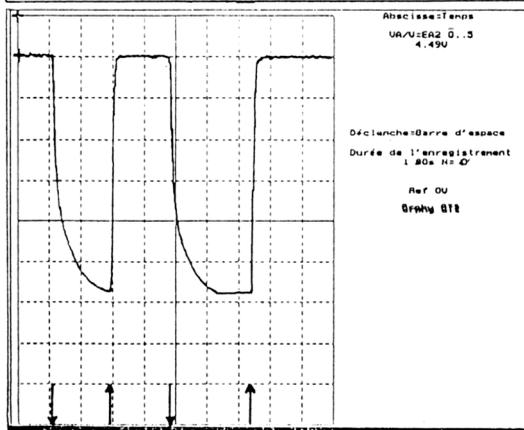
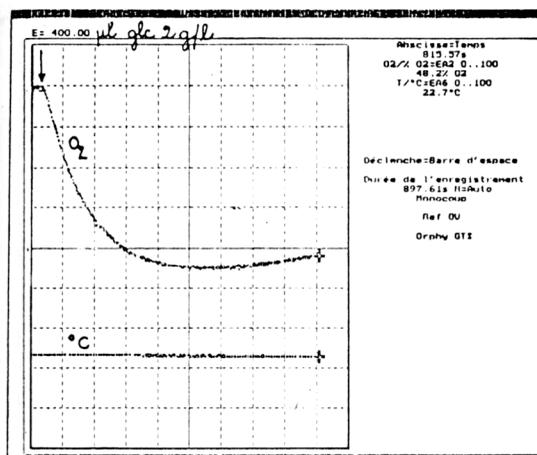


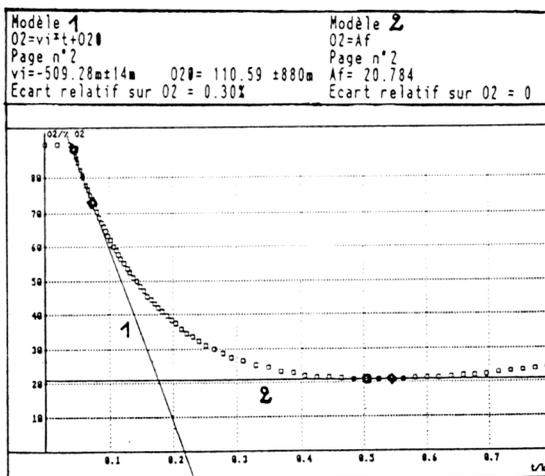
figure 3. Test de fonctionnement de l'électrode à oxygène.

Les arrêts (↓) et reprises (↑) de l'agitation modifient la diffusion de l'oxygène. La réponse du capteur est rapide. (enregistrement sur 3 min).



4a : La réaction est déclenchée par addition d'une dose de glucose au milieu enzymatique. On observe à l'écran en temps réel la consommation de l'oxygène dissous (voir le texte pour la forme de la courbe).

Ici une acquisition simultanée de la température du milieu est enregistrée.



4b : Les phases linéaire (1) et finale (2) sont modélisées. Après le choix des bornes, les équations-modèles sont entrées. Régressi retourne les équations paramétrées avec les incertitudes.

figure 4. Acquisition et traitement d'une courbe de consommation d'oxygène par la réaction enzymatique d'oxydation du glucose par la glucose-oxydase.