

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2009

Alicia Zangger

*Mise au point
d'une méthode d'analyse rapide
de l'activité d'enzymes*

Professeur



Umberto Piantini

Experte

Olivia Berthod

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2008/09	No TD / Nr. DA ca/2009/95
Mandant / Auftraggeber <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire	Etudiant / Student Alicia Zangger	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeur / Dozent Piantini Umberto	Expert / Experte (données complètes) Berthod Olivia	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja ¹ <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

Titre / Titel <p style="text-align: center;">Mise au point d'une méthode d'analyse rapide de l'activité d'enzymes</p>
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele <p>Il s'agit de mettre au point une méthode d'analyse rapide et simple de l'activité enzymatique basée sur l'absorbance UV d'un chromophore. L'idée est de faire réagir un substrat (semi-synthétique) avec une enzyme dont l'action de césure va libérer une molécule active en UV qui va pouvoir être quantifiée par spectrophotométrie. La détermination de sa concentration va permettre de déterminer l'activité de l'enzyme. L'enzyme de démonstration choisie est le lysozyme mais l'application à d'autres enzymes d'intérêt est souhaitée.</p> <p>Cahier des charges :</p> <ul style="list-style-type: none"> — Choix de la ou des molécules cibles (étude de la littérature) — Synthèse de la ou des molécules choisies — Essais de quantification UV — Mini validation de la méthode — Elargissement de la méthode à d'autres enzymes

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Resp. de la filière Leiter des Studieng.:  ¹ Etudiant / Student: 	Délais / Termine Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 27.04.2009 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 19.08.2009 — 12h00 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 04.09.2009 Défense orale / Mündliche Verfechtung: semaines 36 ou 37 — selon programme
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

¹ Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition.
 Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

Mise au point d'une méthode d'analyse rapide de l'activité d'enzymes

Diplômant/e Zangger Alicia

Objectif du projet

Le but de ce travail est de mettre au point une méthode simple et rapide du dosage de l'activité enzymatique du lysozyme en réponse aux difficultés rencontrées dans la méthode existante la plus couramment employée.

Méthodes | Expériences | Résultats

Le principe de mesure choisi pour cette nouvelle méthode est la spectrophotométrie, en raison de sa simplicité et sa rapidité d'utilisation. Le substrat employé est la chitine, car sa dégradation par le lysozyme est connue.

La chitine a tout d'abord été transformée en chitine colloïdale afin de favoriser une dispersion homogène de celle-ci en solution, puis elle a été colorée au moyen du colorant suivant : le Remazol Brilliant Blue R de manière à ce qu'une fois dégradée par l'enzyme, elle libère des molécules solubles et colorées, séparables de la chitine non soluble par centrifugation. L'emploi d'un mordant (méthode de coloration C) pour créer des ponts entre les molécules de chitine et celles de colorant durant la réaction a favorisé la coloration du substrat. Le taux de fixation le plus élevé a été atteint par ce moyen, et il est de 20 %.

Le test de la méthode a montré que le substrat coloré avec la méthode C est dégradé par le lysozyme. On constate une différence d'absorbance entre les échantillons et le blanc après 60 minutes d'incubation à 50°C, pour une concentration en enzymes allant de 0.2 à 1 g/l, et un substrat de 0.15 g/l (poids sec). Cependant, la sensibilité et la reproductibilité de la méthode ne permettent pas encore à celle-ci de concurrencer la méthode existante.

Travail de diplôme
| édition 2009 |

Filière

Technologies du Vivant

Domaine d'application

Chimie analytique

Professeur responsable

Pr. Piantini Umberto
umberto.piantini@hevs.ch

Partenaire

Pr. Crelier Simon
simon.crelier@hevs.ch

Entwicklung einer Methode für schnelle Analyse der Aktivität von Enzymen



Diplomand/in Zangger Alicia



Ziel des Projekts

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines einfachen und schnellen Bestimmung der Enzymaktivität von Lysozym bei der Antwort auf die Schwierigkeiten bei der bestehenden Methode, die am häufigsten verwendet.

Diplomarbeit
| 2009 |



Studiengang
Lebensmittel

Anwendungsbereich
Analytische Chemie

Verantwortliche/r Dozent/in
Pr. Piantini Umberto
umberto.piantini@hevs.ch

Partner
Pr. Crelier Simon
simon.crelier@hevs.ch

Methoden / Experimente / Resultate

Das Messprinzip dieser neuen Methode ist die Spektrophotometrie, wegen seiner Einfachheit und Schnelligkeit werden. Das Substrat verwendet wird Chitin, weil seine Degradierung bei Lysozym bekannt ist.

Chitin wurde zunächst in eine kolloidale Chitin verwandelt, um eine einheitliche Dispersion dieser Lösung zu unterstützen. Dann wurde sie mit dem Remazol Brilliant Blue R gefärbt. Verschlechtert Moleküle werden aus Chitin (unlöslich) durch Zentrifugieren getrennt. Der höchste Festsetzunganteil der Farbstoff ist 20%.

Der Test der Methode hat gezeigt, dass das Substrat durch Lysozym verschlechtert wird. Die Absorption ist unterschiedlich zwischen den Proben und weiß nach 60 Minuten Inkubation bei 50 °C mit einer Konzentration von Enzymen von 0,2 bis 1 g/l, und ein Substrat von 0,15 g/l (Trockengewicht). Jedoch sind die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit der Methode noch nicht gut genug, um der aktuelle Methode zu vergleichen.

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction	2
1.1 Généralités	2
1.1.1 Les enzymes	2
1.1.2 Cinétique enzymatique	2
1.2 Le lysozyme	2
1.2.1 Réaction catalysée	2
1.3 Méthode de dosage de l'activité enzymatique du lysozyme	3
1.4 Objectif de ce travail	3
1.5 Choix du substrat à modifier	3
1.6 Choix du principe de mesure	4
1.7 Choix du colorant	4
1.8 En résumé	5
2. Matériel et méthodes	6
2.1 Dosage de l'activité du lysozyme par turbidimétrie	6
2.2 Détermination du domaine linéaire de l'absorbance du RBB R	6
2.3 Détermination de la pureté RMN du Remazol Brilliant Blue R	7
2.4 Fabrication de la chitine colloïdale	7
2.5 Coloration de la chitine colloïdale avec RBB R	8
2.5.1 Méthode A	8
2.5.2 Autres méthodes	9
2.6 Suivi de l'évolution de la coloration de la chitine	9
2.7 Dosages colorimétriques avec le lysozyme	9
2.8 Dosage des sucres réducteurs avec l'acide dinitro-3,5-salicylique	10
2.8.1 Préparation des solutions	11
2.8.2 Mode opératoire	11
3. Résultats et discussion	12
3.1 Dosage de l'activité du lysozyme par turbidimétrie	12
3.2 Détermination du domaine linéaire de l'absorbance du RBB R	14
3.3 Détermination de la pureté RMN du RBB r	15
3.4 Fabrication de la chitine colloïdale	15
3.5 Coloration de la chitine colloïdale	16
3.6 Essais de dosages colorimétriques avec le lysozyme	17
3.7 Dosage des sucres réducteurs par l'acide dinitro-3.5-salicylique	19
4. Conclusion et perspectives	20
4.1 Validation de la méthode	20
4.2 Application à d'autres enzymes	20
4.3 Comparaison des deux méthodes étudiées	21

5. Bibliographie	22
6. Annexes	22
6.1 Matériel employé	23
6.1.1 Dosage de l'activité du lysozyme par turbidimétrie	23
6.1.2 Détermination du domaine linéaire de l'absorbance du RBB R	23
6.1.3 Détermination de la pureté RMN du Remazol Brilliant Blue R	23
6.1.4 Fabrication de la chitine colloïdale	23
6.1.5 Coloration de la chitine colloïdale avec RBB R	23
6.1.6 Suivi de l'évolution de la coloration de la chitine	23
6.1.7 Dosages colorimétriques avec le lysozyme	23
6.1.8 Dosage des sucres réducteurs avec l'acide dinitro-3,5-salicylique	23
6.2 Protocole Sigma	24
6.3 Résultats obtenus avec la méthode de dosage enzymatique par turbidimétrie	27
6.4 Scans UV du Remazol Brilliant Blue R	34
6.5 Détermination du domaine de linéarité	38
6.6 Spectres RMN du proton et du carbone du RBB R, détail des calculs	39
6.7 Résultats du suivi colorimétrique de la coloration du substrat	44
6.8 Résultats du dosage enzymatique sur le substrat à température ambiante	51
6.9 Résultats du dosage enzymatique sur le substrat à 50°C	52
6.10 Modes opératoires	54
6.10.1 Préparation de la chitine colorée	54
6.10.2 Dosage colorimétrique de l'activité du lysozyme	54

1. INTRODUCTION

1.1 GÉNÉRALITÉS

1.1.1 LES ENZYMES

Les enzymes sont généralement des protéines permettant d'abaisser l'énergie d'activation d'une réaction et d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire sans modifier l'équilibre formé^[1].

Chaque enzyme a une double spécificité : elles sont capables de reconnaître les molécules avec lesquelles elles sont en interaction, ainsi que la réaction qu'elles catalysent. Une enzyme est comme une «serrure» et son substrat est la «clé» correspondante, mais ce ne sont pas des structures rigides, contrairement aux serrures.

1.1.2 CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

Avec la cinétique enzymatique, il est possible de déterminer la vitesse maximale de la réaction que l'enzyme catalyse et de mesurer son affinité pour les substrats. Le paramètre le plus intéressant dans le cas présent est la vitesse de réaction.

Celle-ci peut être mesurée, par exemple, en mesurant la vitesse à laquelle le substrat disparaît, ce qui est le cas dans la méthode présentée en 1.3. Un autre cas de figure serait la mesure de la vitesse d'apparition d'un composé coloré issu de la réaction catalysée (produit).

1.2 LE LYSOZYME

L'enzyme étudiée dans le cadre de ce travail est le lysozyme (E.C. 3.2.1.17). Celui-ci est une O-glycosyl hydrolase que l'on trouve entre autres dans le blanc d'œuf de poule ou le liquide lacrymal humain. C'est une protéine globulaire constituée d'une chaîne polypeptidique de 129 acides aminés d'une masse totale d'environ 14 kDa, et contenant 8 cystéines formant quatre ponts disulfures^[2].

1.2.1 RÉACTION CATALYSÉE

Le lysozyme dégrade les polysaccharides, notamment ceux qui constituent la paroi bactérienne, plus précisément celle des bactéries Gram positives comme les staphylocoques ou les bacilles. Celle-ci est composée d'un peptidoglycane, alternance entre deux unités : l'acide N-acétylmuramique (NAM) et la N-acétylglucosamine (NAG).

Comme le montre la figure 1, le lysozyme hydrolyse la liaison β (1, 4) osidique située entre le carbone C1 du NAM et le carbone C4 de la NAG.

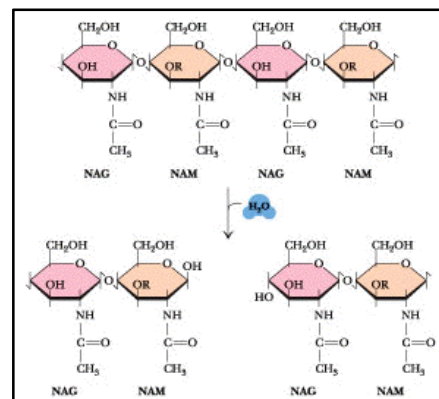


Figure 1: Hydrolyse de la liaison β (1, 4) osidique par le lysozyme.

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

La structure tridimensionnelle du lysozyme révèle une crevasse qui peut accommoder un polysaccharide de 6 résidus d'oses (unités osidiques). Le site d'hydrolyse du substrat se situe généralement entre la quatrième et la cinquième unité, ce qui implique que l'hydrolyse de cette molécule libère deux unités diosidiques.

La figure 2^[3] montre que cela est le cas la plupart du temps, et ce avec des chaînes osidiques de 4, 5 et respectivement unités.

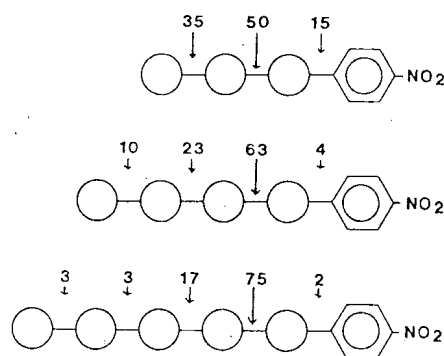


Figure 2: Probabilité d'hydrolyse de la liaison par le lysozyme entre deux unités.

1.3 MÉTHODE DE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DU LYSOZYME

L'une des méthodes les plus couramment employées pour le dosage de l'activité enzymatique du lysozyme est une mesure turbidimétrique de l'hydrolyse de cellules de *Micrococcus lysodeikticus* en suspension dans un tampon phosphate par spectrophotométrie UV-vis^[4]. Cependant, elle présente les inconvénients suivants : la mise en suspension des cellules et la sédimentation de celle-ci durant l'analyse. L'emploi d'un bain à ultrason pour la mise en suspension lyse une partie des cellules, ce qui entraîne une diminution de l'absorbance. De plus, cette analyse nécessite de tâtonner afin de trouver la concentration optimale d'enzyme par rapport au substrat pour obtenir une pente de l'ordre de 0.05 [UA/min] (unités d'absorbance par minute) et de se trouver entre 0.5 et 0.7 unités d'absorbance avant la dégradation, selon les prescriptions de la publication dont cette méthode est tirée^[5].

1.4 OBJECTIF DE CE TRAVAIL

Le but de ce travail était donc de mettre au point une méthode simple et rapide du dosage de l'activité enzymatique du lysozyme en réponse aux difficultés rencontrées dans la méthode turbidimétrique. Dans un premier temps, il s'est agit de choisir un substrat adéquat, ainsi qu'un principe de mesure. L'étape suivante était la synthèse ou la modification du substrat selon les besoins, afin d'obtenir une molécule reconnue par l'enzyme. Pour finir, il a fallu tester et améliorer la méthode mise en place. L'étape finale consistait à valider la méthode analytique.

1.5 CHOIX DU SUBSTRAT À MODIFIER

Un substrat dont la dégradation par le lysozyme est connue est la chitine. Un dérivé de la chitine a également été considéré : le chitosan.

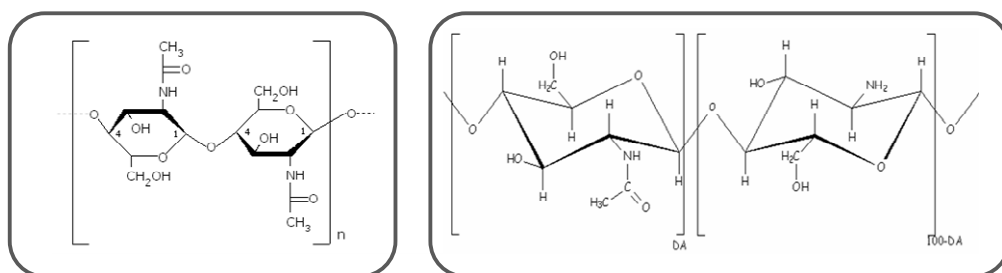


Figure 3: Structure de la chitine (à gauche) et du chitosan (à droite).

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Le chitosan est en fait de la chitine partiellement déacétylée et est souvent décrit au moyen de son degré de déacétylation (DD = 100-DA) ou de son degré d'acétylation (DA). Cependant, il a vite été constaté que, plus le chitosan est déacétylé, moins il est dégradé par le lysozyme, et ce uniquement dans les zones acétylées^[6]. Il en découle que le substrat le plus adapté des deux est donc la chitine.

1.6 CHOIX DU PRINCIPE DE MESURE

L'une des manières les plus simples de doser un composé est la spectrométrie UV-Vis. La chitine étant insoluble dans la plupart des solvants, excepté les acides concentrés, l'idéal serait de la colorer de manière à ce qu'une fois dégradée par l'enzyme, elle libère des molécules solubles et colorées, séparables de la chitine non soluble par centrifugation. L'absorbance du surnageant serait ensuite mesurée par spectrophotométrie après un temps donné d'incubation.

1.7 CHOIX DU COLORANT

Le colorant choisi est le Remazol Brilliant Blue R (RBB R) en raison de son utilisation pour la coloration de la chitine afin de doser l'activité enzymatique de chitinases^[7] ou de *Micrococcus luteus* pour détecter des lysozymes par spectrophotométrie^[7]. Sa structure est représentée à la figure 4.

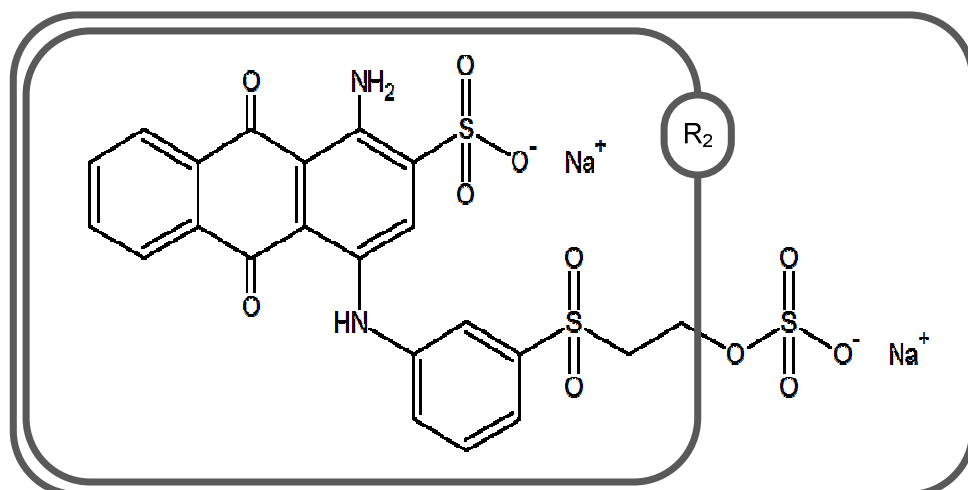


Figure 4: Structure du Remazol Brilliant Blue R.

En plus de ponts hydrogènes, l'interaction possible entre cette molécule et la chitine est une substitution nucléophile de deuxième ordre sur l'alcool primaire en C6 de chaque ose grâce aux groupes sulfonyles, comme représenté à la figure 5. R₁ correspond au reste de l'unité osidique de la chitine.

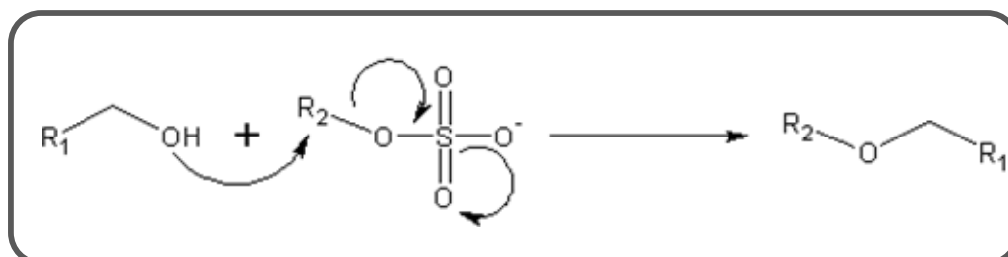


Figure 5: Mécanisme d'une substitution nucléophile du deuxième ordre entre une unité osidique de la chitine et le RBB R.

1.8 EN RÉSUMÉ

Le travail qui suit est largement inspiré d'une publication concernant la préparation de chitine colloïdale et son utilisation pour doser l'activité de chitinases^[8]. Les étapes à suivre pour la préparation du substrat et l'application de la méthode sont résumées à la figure 6 :

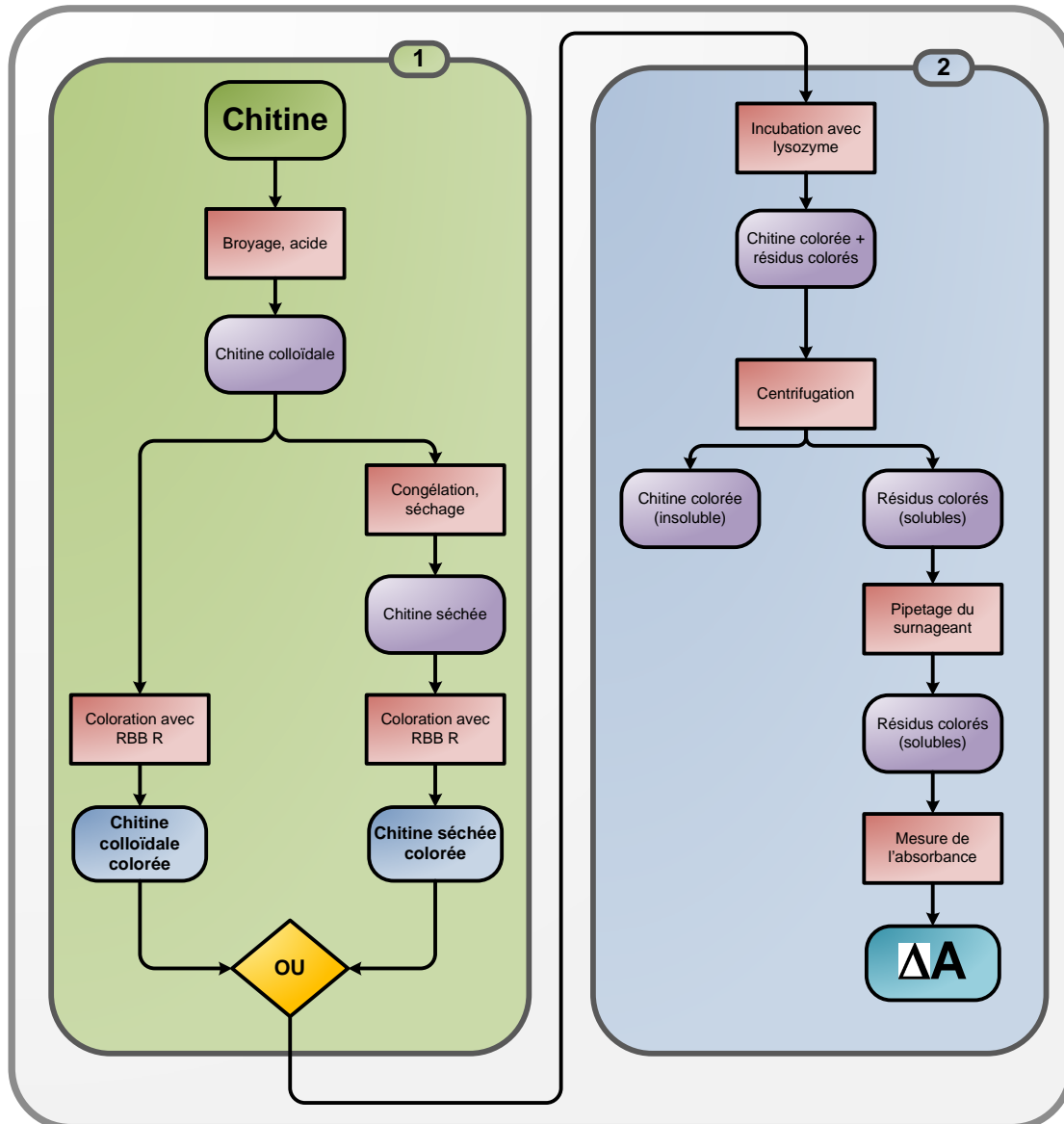


Figure 6: Schématisation des étapes de préparation du substrat (1) et de la méthode de dosage enzymatique (2).

(1) La chitine est tout d'abord broyée et tamisée pour fabriquer de la chitine colloïdale, dont l'homogénéité de la suspension est plus facile à obtenir. Cette dernière est fractionnée en deux : une partie va être colorée avec du RBB R, la seconde va être séchée avant d'être colorée.

(2) Une quantité connue de chitine colorée est ensuite mise en suspension puis incubée à une température donnée durant un temps fixé avec une solution de lysozymes. La partie soluble est ensuite séparée de la partie insoluble par centrifugation, puis pipetée dans une cuvette de mesure. La différence d'absorbance contre le blanc permet ensuite de déterminer l'activité enzymatique du lysozyme.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le détail du matériel employé pour les points suivants est résumé en annexe I.

2.1 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DU LYSOZYME PAR TURBIDIMÉTRIE

Pour commencer, la méthode de dosage de l'activité enzymatique du lysozyme citée au point 1.3 a été testée avec une enzyme dont l'activité est connue afin de mieux prendre conscience des problèmes qu'elle entraîne. Les réactifs employés sont les suivants :

Tableau 1: Réactifs employés.

Réactifs	Référence
Lysozyme from chicken egg white	Sigma L6876
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> cell	Sigma M3770
Phosphate de potassium monobasique, purum p.a., anhydre, ≥99.0%	Fluka 60230
Bovine Serum Albumine (BSA)	Roche 10 735 078 001

Les différentes solutions à préparer sont les suivantes :

- Tampon phosphate 30 mM avec 0.1 % de Bovine Serum Albumine(BSA). Le pH est ajusté à 7.4 avec du KOH 0.1M.
- Suspension de cellules de *Micrococcus lysodeikticus* 0.01 % dans le tampon phosphate (substrat).
- Solution de lysozymes entre 5'000 et 10'000 unités/ ml.

Le protocole suivi^[4] se trouve en annexe II. Une modification à noter est la quantité de substrat pipeté dans la cuvette de 2 ml, et le volume d'enzyme ajouté de 20 µl au lieu de 1 ml, respectivement 10 µl. De plus, la concentration de la solution d'enzyme et celle de la suspension de cellules a fait l'objet de plusieurs essais afin d'obtenir les conditions optimales pour l'analyse^[5].

En outre, un bain à ultrason a été employé lorsque l'agitation du flacon ne suffisait pas à la mise en suspension des cellules lyophilisées (intensité minimale, durant 5 secondes).

2.2 DÉTERMINATION DU DOMAINE LINÉAIRE DE L'ABSORBANCE DU RBB R

Pour permettre le dosage d'une solution aqueuse de Remazol Brilliant Blue R, il faut déterminer dans quel domaine de concentration l'absorbance correspondante obéit à une relation linéaire. Pour ce faire, le maximum d'absorption d'une solution aqueuse de RBB R a été déterminé en balayant le spectre UV-vis de cette dernière (de 190 à 900 nm). Ce maximum d'absorption se situe à 595 nm. Ensuite, une mesure à une concentration choisie arbitrairement a été effectuée à 595 nm pour en déterminer l'absorbance, puis à partir de celle-ci, des dilutions ont été réalisées pour correspondre à un domaine d'absorbance situé entre 0.01 et 1.0. Leurs absorbances respectives ont été mesurées, puis mises en relation avec leurs concentrations.

2.3 DÉTERMINATION DE LA PURETÉ RMN DU REMAZOL BRILLIANT BLUE R

Deux analyses du RBB R par spectrométrie à résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectuées : une du proton et une du carbone, et cela a permis de montrer que le Remazol Brilliant Blue R ne comporte pas d'impuretés organiques.

Une analyse ^1H RMN (Bruker, solvant : eau, méthode : zg, détecteur : 5 mm BBI 1H-BB, 32 scans, fréquence : 400 MHz) de 7.3 mg de RBB R (0.0116 mmol) et de 1.2 mg d'acétate de potassium (0.0122 mmol) a été effectuée pour déterminer la pureté RMN du RBB R et en valider la teneur.

2.4 FABRICATION DE LA CHITINE COLLOÏDALE

La chitine a tout d'abord été broyée et tamisée afin d'obtenir une granulométrie assez fine, mais surtout homogène. Elle a ensuite été transformée en chitine colloïdale pour permettre une dispersion homogène en suspension lors des réactions succédant cette étape.

Les réactifs employés sont les suivants :

Tableau 2: Réactifs employés.

Réactif	Référence	Remarques
Chitin from crab shell, practical grade, powder	Sigma C7170	-
Acide phosphorique 85 %	Laurylab sarl, 40621 26	-
Acide chlorhydrique 37 %	Panreac 141020.1611	-
Acide chlorhydrique 32 %	Panreac 132176.1611	Utilisé dès le 12.06.09

Plusieurs méthodes de broyage ont été testées afin d'obtenir une poudre la plus homogène possible, car ce critère est très important lors de la fabrication de colloïdes. Les moyens utilisés sont les suivants :

- mortier et pilon avec de l'azote liquide : l'azote s'évaporait à grande vitesse et ne fragilisait pas assez la chitine pour permettre un broyage efficace et productif (même après environ une heure d'efforts intenses).
- moulin : le moulin employé avait un mécanisme non étanche qui conservait des traces du produit broyé précédemment (en l'occurrence, du carbone) et les mélangeait à la chitine en cours de broyage. De plus, ce défaut empêchait toute utilisation d'azote liquide pour favoriser le broyage.
- moulin à billes (en suspension liquide) : le problème rencontré avec cet appareil était la séparation de la chitine broyée des billes de verre. En effet, le diamètre des particules de chitine broyée était très proche de celui des billes de verre (de l'ordre du millimètre), ce qui impliquait qu'un tamisage du mélange ne suffirait pas à les séparer.
- broyeur centrifuge : dans ce cas-ci, une complication rencontrée était le blocage de l'appareil en cas d'alimentation trop rapide de l'appareil en chitine. Cela peut en effet provoquer l'échauffement des pièces en mouvement, notamment lors de l'emploi des tamis les plus fins, mais cela peut être contré en employant les tailles intermédiaires en broyant la chitine en plusieurs fois, et en la versant lentement.

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

La méthode la plus efficace parmi celles qui ont été testées est celle du broyeur centrifuge, car la chitine est entièrement broyée. Il est cependant nécessaire de la tamiser pour garantir l'homogénéité du produit. Le diamètre des particules de chitine broyée est de l'ordre de 200 à 315 μm .

Entre 3 et 5 grammes de chitine broyée ont été récupérés dans un flacon en verre, puis 100 ml d'acide phosphorique à 85% ont été ajoutés^[8]. La suspension a ensuite été placée au réfrigérateur (à 5°C) durant 24h. Ensuite, deux litres d'eau courante ont été ajoutés (tel qu'indiqué dans la publication, sinon il n'est pas possible d'atteindre un pH de 6.5 car l'eau déminéralisée a un pH de 5 environ), puis la chitine a été filtrée avec léger vide, et lavée avec de l'eau courante jusqu'à ce que le filtrat ait un pH de 6.5.

Une autre méthode employée pour préparer de la chitine colloïdale est la suivante : de la chitine broyée (environ 6 % m/v) a été mélangée à de l'acide chlorhydrique et agitée durant 45 minutes^[9]. Elle a ensuite été précipitée en suspension colloïdale en l'ajoutant lentement à 2 litres d'eau déminéralisée entre 5 et 10°C. Elle a ensuite été récupérée par filtration sous léger vide, puis lavée en la resuspendant dans 1 litre d'eau **déminéralisée** et en la filtrant à nouveau. Le lavage a été répété jusqu'à ce que le filtrat ait un pH entre 3 et 4.

La chitine colloïdale peut être séchée en la congelant durant 1h30 à -80°C, puis en la plaçant dans une étuve sous vide à température ambiante durant 36h. La phase de congélation est primordiale, car si elle n'a pas lieu, la chitine se compacte et ne peut plus être exploitée. Pour l'étape suivante, une fraction de la chitine colloïdale a été séchée afin de déterminer si cette étape peut être effectuée avant la coloration afin de faciliter le stockage. Cependant, une fois séchée, cette chitine ne permet plus de former une suspension colloïdale.

2.5 COLORATION DE LA CHITINE COLLOÏDALE AVEC RBB R

2.5.1 MÉTHODE A

Tableau 3: Réactifs employés.

Réactif	Référence
Remazol Brilliant Blue R	Sigma R8001
Dichromate de sodium, purum, > 99 % (RT)	Fluka 71490
Tartrate de sodium et potassium tetrahydraté, puriss. p. a. ACS, ≥ 99.0 % (NT)	Fluka 60412
Chitine colorée	-

1 g. de chitine colloïdale séchée a été mélangé à 100 ml d'une solution de RBB avec un rapport stœchiométrique allant de 4:1 à 1:1 jusqu'à obtenir un mélange homogène. Le rapport stœchiométrique a été calculé entre le nombre de moles d'une unité osidique de chitine et le nombre de moles de Remazol Brilliant Blue R (corrigé avec sa pureté RMN). La suspension obtenue était trop foncée pour confirmer visuellement une dispersion homogène de la chitine dans le ballon. La suspension a ensuite été chauffée durant 1h à 1h30 dans un bain-marie à 100°C avec agitation. L'évolution de la coloration a été suivie tout le long de la réaction (suivi cinétique, voir 2.6). La chitine colorée a ensuite été récupérée par filtration. Des essais avec la chitine colloïdale non séchée ont également été réalisés.

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Pour fixer la coloration, la chitine a ensuite été mise en suspension dans 25 ml d'une solution aqueuse de dichromate de sodium 1.5 % et de tartrate de potassium et de sodium 1.5 % (solution de mordant). Ce mordant est la solution de fixation employée dans la publication^[8] donnant les meilleurs résultats. Elle a ensuite été chauffée dans un bain-marie à 100°C durant 10 minutes. Le matériel coloré a finalement été récupéré par filtration et lavé avec de l'eau chaude (environ 3 litres au total) jusqu'à ce que le filtrat soit incolore.

2.5.2 AUTRES MÉTHODES

La filtration du substrat à peser pour préparer les essais enzymatiques, a révélé que la fixation de la couleur n'avait pas fonctionné sur la chitine non séchée : après la filtration de chitine colloïdale colorée en suspension, il s'est avéré que le filtrat n'était pas incolore, et donc qu'une partie du colorant n'était pas fixé. Cela n'a pas été constaté pour la chitine séchée. Par conséquent, d'autres colorations ont été effectuées, en faisant réagir la chitine avec le mordant avant la coloration (méthode B), et en ajoutant le mordant et le colorant ensemble, avant de lancer la réaction (méthode C).

2.6 SUIVI DE L'ÉVOLUTION DE LA COLORATION DE LA CHITINE

Des prélèvements ont été effectués environ toutes les 15 minutes à l'aide d'un septum et d'une seringue munie d'une aiguille durant la réaction de coloration (méthode A). Leur absorbance a ensuite été mesurée à 595 nm après les avoir dilués de telle manière à ce que la concentration en RBB soit inférieure à 100 mg/l.

Lors de l'essai avec de la chitine colloïdale séchée, les prélèvements ont été effectués avec facilité. En revanche, la chitine colloïdale non séchée en suspension bouchait la seringue et a empêché tout prélèvement. Étant donné que la chitine non séchée garantit une dispersion homogène, une autre méthode de prélèvement a été employée : environ 1.5 ml de suspension a été prélevé avec une pipette pasteur, puis centrifugé. Ensuite, un volume précis de surnageant a été pipeté pour être dilué puis dosé par spectrométrie à 595 nm.

Suite aux résultats obtenus lors des dosages enzymatiques (voir 2.7), il s'est avéré que la centrifugation n'était pas assez efficace, car il subsistait encore des particules en suspension. Par la suite, et donc pour les méthodes B et C, les prélèvements ont été filtrés avant le dosage.

2.7 DOSAGES COLORIMÉTRIQUES AVEC LE LYSOZYME

Les tests de dosage de l'activité du lysozyme ont été effectués à différentes températures (à température ambiante : entre 23 et 25°C, à 50°C), dans un tampon phosphate à pH 7.4 (sans BSA). Le substrat a été suspendu dans le tampon à un rapport de 10% (m/v) environ, et les enzymes mises en solutions de concentrations variant de 20 mg/l à 1 g/l (soit entre 800 et 40'000 unités / ml).

Tableau 4: Réactifs employés.

Réactif	Référence
Lysozyme from chicken egg white	Sigma L6876
Phosphate de potassium monobasique, purum p.a., anhydre, ≥99.0%	Fluka 60230
Chitine colorée	-

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

1 ml de substrat a été pipeté dans un tube eppendorf de 1.5 ml, puis 500 µl de la solution d'enzyme y ont été ajoutés. Le mélange a été incubé durant 30 à 60 min à température ambiante, puis placé durant 5 minutes dans un bain d'eau bouillante (entre 95 et 97°C). Après refroidissement dans un bain d'eau à température ambiante, l'échantillon a été centrifugé durant 10 à 15 secondes. Le surnageant a ensuite été pipeté puis mesuré à 595 nm. L'autozéro de l'appareil a été effectué sur la solution de tampon phosphate. Les tests ont été réalisés par séries de 6. Un blanc a été mesuré à chaque série d'analyses, en remplaçant les enzymes par du tampon phosphate.

Une autre méthode de séparation a également été utilisée : après quelques séries d'analyse, la centrifugation a été remplacée par la filtration à l'aide de filtres à seringues, puis par une centrifugation à 17'000 g et 10'000 RPM pendant 10 minutes après 60 minutes d'incubation à 50°C.

2.8 DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEURS AVEC L'ACIDE DINITRO-3,5-SALICYLIQUE

Cette méthode permet de doser les sucres réducteurs par colorimétrie en dosant le résultat de la réduction de l'acide dinitro-3,5-salicylique (DNS) par les sucres en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, représenté à la figure 7.

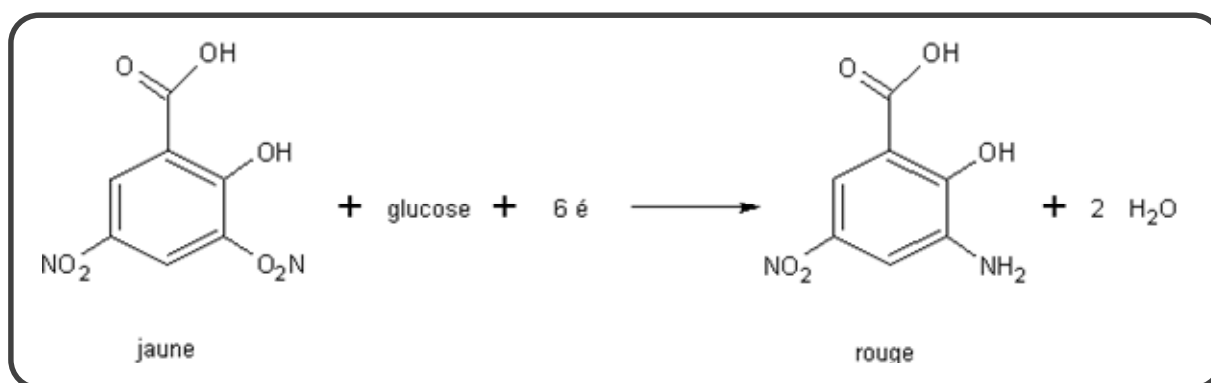


Figure 7: Equation de la réaction de l'acide DNS avec le glucose.

Dans le contexte de ce travail, elle permet de vérifier que l'enzyme dégrade bien le substrat synthétisé, en comparant les échantillons incubés au blanc.

Tableau 5: Réactifs employés.

Réactif	Référence	Remarque
Acide dinitro-3,5-salicylique, purum, > 98 % (T)	Fluka 42260	Date : 1991
Hydroxyde de sodium 2N	dar, 17.04.2009	-
Tartrate de sodium et potassium tétrahydraté, puriss. p. a. ACS, ≥ 99.0 % (NT)	Fluka 60412	-
D (+) - Glucose	Merck 1.08337.0250	

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

2.8.1 PRÉPARATION DES SOLUTIONS

- Standard glucose 1 g/l : 50 mg glucose anhydre dans 50 ml H₂O dist. puis faire des dilutions
- Acide dinitro-3,5-salicylique (DNS) :

Humecter 1 g d'acide DNS avec H₂O dist.

Ajouter lentement 20 ml de NaOH 2N

Diluer avec 50 ml H₂O dist.

Agiter jusqu'à complète dissolution (ajouter un peu d'eau si trouble)

Ajouter 30 g de tartrate de NaK et dissoudre

Compléter à 100 ml avec H₂O dist.

Garder à 4°C dans un flacon bien fermé

2.8.2 MODE OPÉRATOIRE

Utiliser des tubes Eppendorf 2 ml

Tableau 6: Réactifs à pipeter et opérations à effectuer.

	Blanc	Standards	Echantillons
H ₂ O dist.	250 µl	-	-
Std de glucose	-	250 µl	-
échantillons	-	-	250 µl
Acide DNS	250 µl	250 µl	250 µl
Incuber 15 minutes à 95°C. Refroidir			
H ₂ O dist.	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre le blanc			

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DU LYSOZYME PAR TURBIDIMÉTRIE

Une première série d'essais a été effectuée pour se familiariser avec le matériel et le protocole de l'analyse. Celui-ci a été suivi sans modifications, mais la reproductibilité et la stabilité des résultats laisse à désirer. Cela est dû au fait que le mélange des différentes solutions n'a pas été fait avec suffisamment de rigueur avant l'analyse, alors que cela est crucial pour le bon déroulement de celle-ci (voir annexe III).

Une seconde série d'analyses, visibles à la figure 8, a été réalisée afin d'obtenir des courbes plus monotones. Un élément important à noter est que ces courbes ne sont pas linéaires, ce qui gêne la détermination de l'activité enzymatique. De plus, la pente est trop importante. Chaque analyse a duré 5 minutes, avec une mesure toutes les 15 secondes.

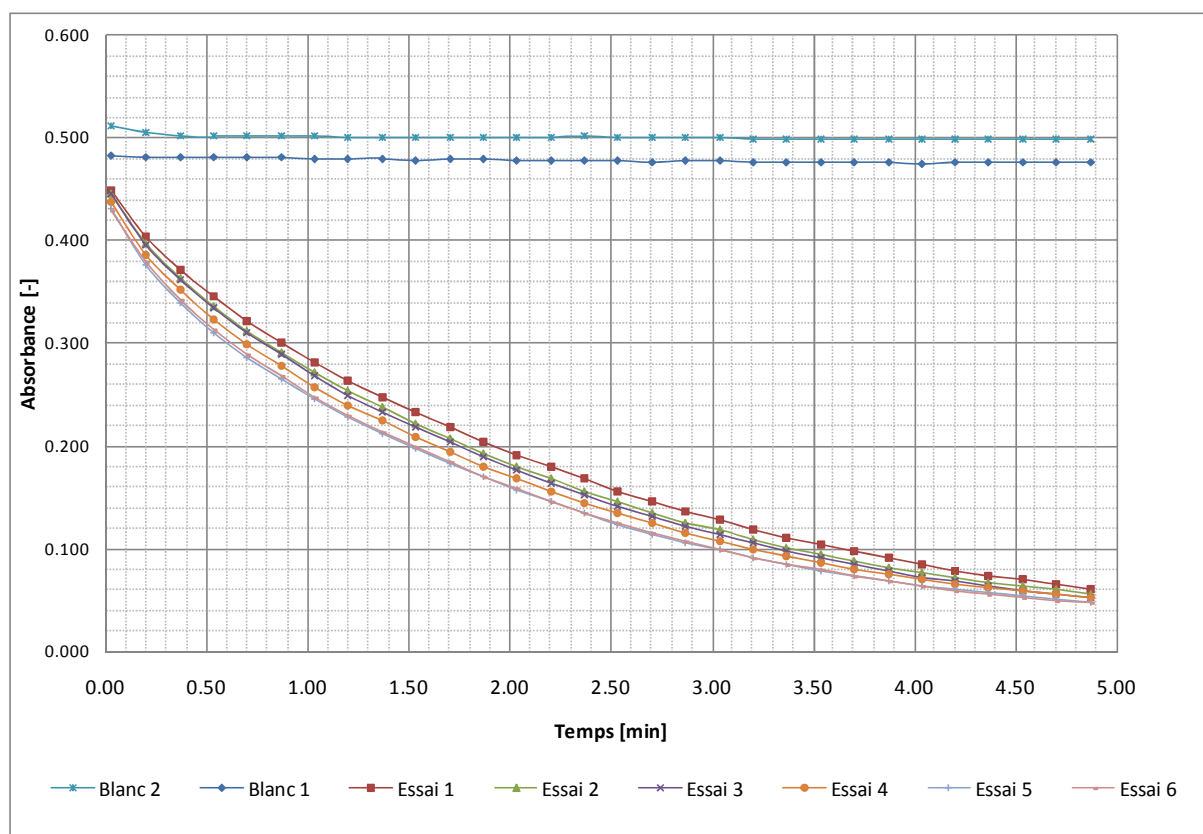


Figure 8: Evolution de l'absorbance de la suspension de cellules en fonction du temps, pour la série d'essais n° 2.

Cette fois, la reproductibilité des analyses ainsi que leur stabilité est bien meilleure. En revanche, l'utilisation du bain à ultrason pour la suspension de cellules a diminué l'absorbance. La pesée effectuée laissait attendre une valeur de l'ordre de 0.7-0.8 [UA] environ.

C'est pourquoi une troisième série de mesures a été effectuée, cette fois en utilisant un vortex pour mélanger et mettre en suspension les cellules, au lieu du bain à ultrason. Le domaine d'absorbance visé est situé entre 0.5 et 0.7 [UA]. Pour ce faire, l'absorbance du substrat a été mesurée à 450 nm, et celui-ci a été dilué jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0.7 environ.

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

La concentration en lysozyme a également été ajustée pour donner une pente de l'ordre de -0.030 [UA/min]. Deux mesures ont été effectuées avec une concentration d'enzyme de 40 mg/l, puis celle-ci a été diluée à 20 mg/l puis 10 mg/l pour des analyses ultérieures.

De plus, chaque analyse a été effectuée sur 2 min, avec une mesure de l'absorbance toute les 5 secondes, afin de « zoomer » sur le domaine linéaire de la courbe de dégradation des cellules.

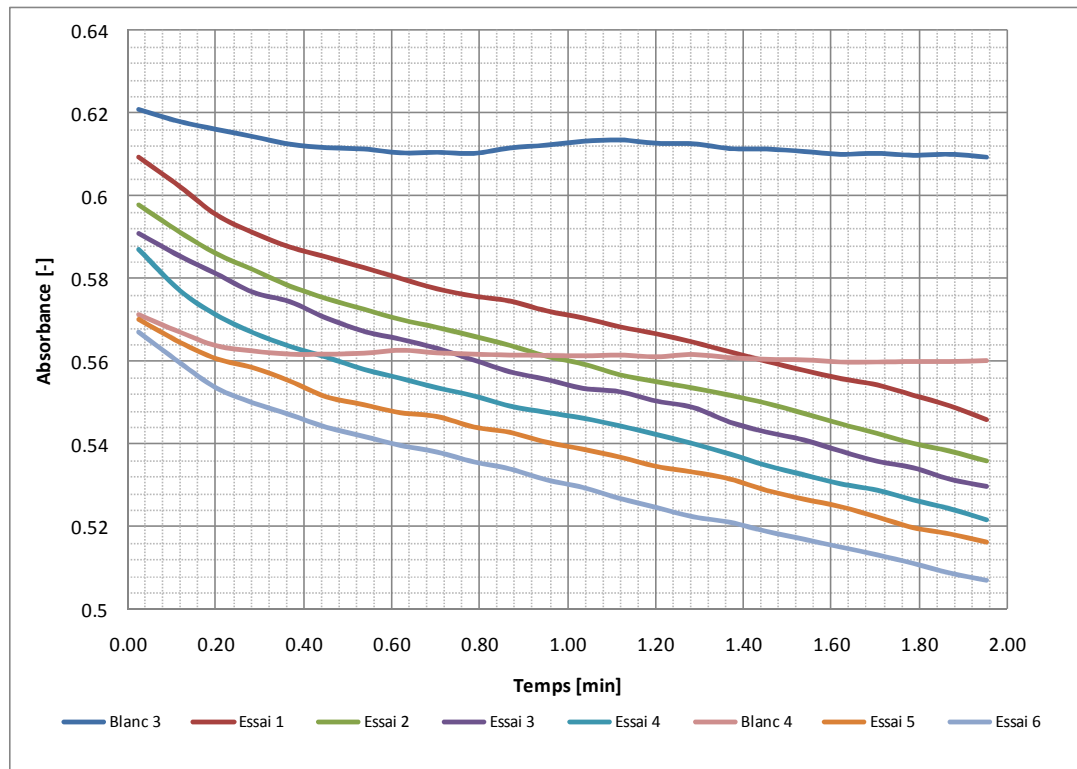


Figure 9: Evolution de l'absorbance de la suspension de cellules en fonction du temps, avec une solution d'enzymes de 10 mg/l.

Après linéarisation, avec une concentration en enzyme de 10 mg/l, on obtient une pente moyenne de -0.028 [UA/ min].

En revanche, l'absorbance initiale a fortement diminué durant l'analyse, qui a duré environ 1h30 au total. En effet, elle était supérieure à 0.7 [UA] au départ, tandis que dans la figure 9, le blanc effectué en dernier l'indique comme étant inférieure à 0.6 [UA]. Il semblerait donc que la suspension de cellules préparée ce jour-là présente un problème de stabilité, probablement dû à la température ambiante, plus élevée que les jours précédents.

D'après les résultats obtenus, pour obtenir une pente située entre 0.03 et 0.04 [min^{-1}], il faut préparer une solution d'enzyme de 15 mg/l, ce qui correspond à environ 600 unités/ml. De plus, la diminution d'absorbance est linéaire entre 0 et 120 secondes. La concentration de la solution de substrat, quant à elle, doit être de 13 mg/l pour obtenir une absorbance initiale de 0.7 [UA] environ.

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

De nouvelles mesures ont été effectuées une semaine plus tard pour contrôler les résultats obtenus précédemment. Elles sont représentées à la figure 10. Chaque analyse a duré 2 mn, avec une mesure toutes les 5 secondes.

La concentration de la suspension de cellules était de 140 mg/l, et celle du lysozyme de 20 mg/l. La pente attendue à partir des résultats précédents était de l'ordre de 0.05 unités d'absorbance, mais elle s'est révélée plus élevée : -0.067 [UA/min].

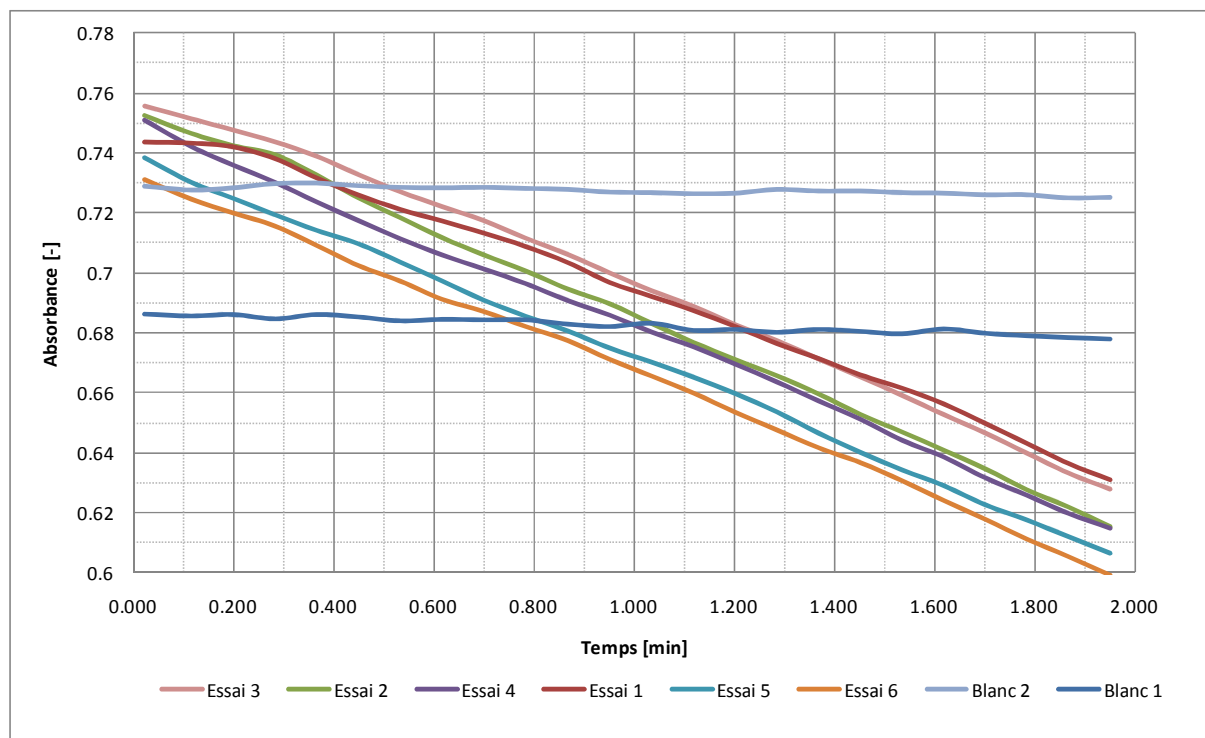


Figure 10: Evolution de l'absorbance de la suspension de cellules en fonction du temps, avec une solution d'enzymes de 20 mg/l.

Malgré le fait que les conditions optimales de cette analyse sont désormais connues, la préparation de la suspension de cellules reste un problème. En effet, en prélevant uniquement ce qui correspond à une granulométrie la plus fine possible lors de la pesée (autrement dit, ce qui se trouve au fond du récipient, en excluant les agglomérats), on peut obtenir une suspension correcte sans recourir au bain à ultrason. Cependant, cela se retrouve en quantité limitée dans le récipient. D'autant plus que, au fil des analyses, les cellules lyophilisées prennent un peu d'humidité à chaque ouverture du récipient et forment de nouveaux agglomérats. De plus, la solution d'enzymes doit être préparée avec grande précision, et peut malgré tout ne pas correspondre aux attentes.

3.2 DÉTERMINATION DU DOMAINE LINÉAIRE DE L'ABSORBANCE DU RBB R

Pour commencer, le spectre d'absorption du Remazol Brilliant Blue R a été déterminé. Pour ce faire, deux échantillons du colorant de concentrations connues ont été utilisés afin de balayer le spectre UV-vis et de déterminer le maximum d'absorption. Celui-ci se trouve bien à 595 nm (voir annexe IV).

La linéarité de la relation entre l'absorbance et la concentration en colorant a ensuite été vérifiée (voir annexe V).

L'équation obtenue est la suivante ($R^2 = 0.999$):

$$y = 0.008x + 0.006$$

Equ. (1)

Avec y = absorbance à 595 nm [UA]

Et x = concentration en RBB R (non corrigée) [mg/l]

Le domaine situé entre 0.0 et 1.0 [UA] est donc bien linéaire, comme montré à la figure 11.

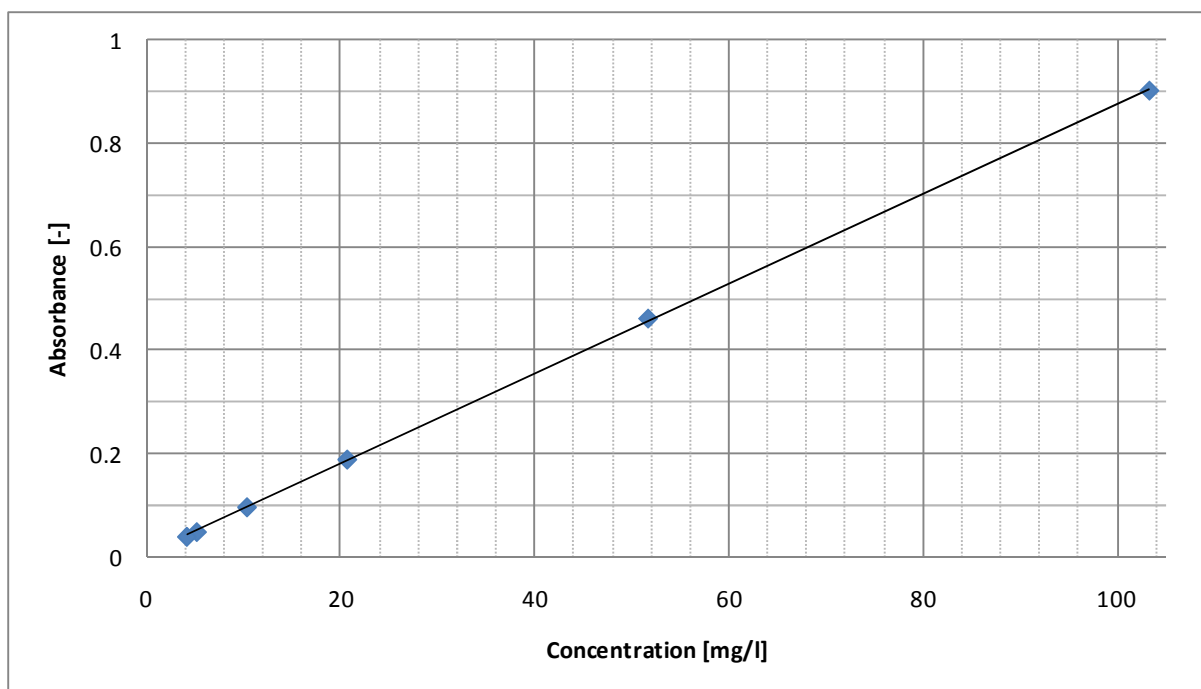


Figure 11: Représentation graphique de l'absorbance en fonction de la concentration du RBB R.

3.3 DÉTERMINATION DE LA PURETÉ RMN DU RBB R

Pour ce faire, les intégrales des signaux à δ 1.8 et à δ 3.7 correspondant au méthyl de l'acétate de potassium, respectivement à l'un des CH_2 du RBB R ont été comparées. Les intégrales obtenues sont de 3.3796 et de 1.0000, ce qui donne une pureté de 47 % environ. Cela confirme la composition annoncée par Sigma comme étant de « 50 % environ ». Les spectres RMN et le détail des calculs se trouvent en annexe VI. Les concentrations molaires citées plus pas sont corrigées en fonction de la pureté RMN, ce qui n'est pas le cas pour les concentrations massiques.

3.4 FABRICATION DE LA CHITINE COLLOÏDALE

Les deux méthodes décrites au point 2.4 ont été testées, et il en résulte que la plus adaptée des deux est celle où l'on emploie de l'acide chlorhydrique. En effet, la chitine colloïdale filtrée a l'aspect d'un gel, contrairement à l'autre méthode avec laquelle elle présentait des grumeaux et avait donc visiblement coagulé durant le séjour à 5°C. La température, le temps de réaction, ainsi que le pH semblent avoir de l'importance pour garantir la reproductibilité de la méthode.

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

L'acide employé entraîne une polymérisation des molécules de chitine^[10], vraisemblablement au niveau de la fonction amide. La différence entre les deux acides employés est que l'acide chlorhydrique n'a pas de pouvoir oxydant, tandis que les phosphates issus de l'acide phosphorique peuvent avoir un effet stabilisant sur les colloïdes. En revanche, le temps de séjour à 5°C doit être maîtrisé pour empêcher la coagulation des colloïdes.

Une grande attention a été portée sur la reproductibilité du temps de réaction de la chitine avec l'acide chlorhydrique, ainsi que sur la température de l'eau lors du mélange.

3.5 COLORATION DE LA CHITINE COLLOÏDALE

Plusieurs essais de coloration avec des rapports stœchiométriques différents ont été réalisés. L'absorbance des prélèvements dilués a été mesurée à 595 nm, puis a été reliée à la concentration en g/l du Remazol Brilliant Blue. Etant donné que ce dernier n'est pas pur, sa concentration en mol/l a été corrigée avec un facteur 0.47 (environ 47 % de pureté, voir 2.3). La différence de concentration en mol/l du RBB entre le début et la fin de la réaction correspond à la quantité de colorant fixé sur la chitine. Cette différence, rapportée à la quantité de chitine employée (en moles), donne le taux de fixation du colorant sur la chitine.

$$\text{Taux de fixation [\%]} = \frac{(\text{concentration initiale du RBB} - \text{concentration finale du RBB}) \times \frac{\text{mol}}{\text{l}}}{\text{concentration des unités osidiques de la chitine} \times \frac{\text{mol}}{\text{l}}} \times 100 \quad \text{Equ. (2)}$$

Le premier essai a été effectué avec de la chitine colloïdale séchée. Le rapport stœchiométrique entre la chitine et le RBB était de 2 :1.

Tableau 7: Résultats obtenus lors des colorations du substrat.

Essai	Chitine colloïdale	Méthode	Rapport Chitine : RBB	Temps [min]	Taux de fixation (Tf) [%]
1	Séchée	A	1 :0.5	87	4
2	Non séchée	A	1 :0.2	60	1
3	Non séchée	A	1 :2	98	0 < Tf < 3
4	Séchée	A	1 :1	179	Valeur négative
5	Non séchée	A	1 :2.5	375	Valeur négative
6	Non séchée	A	1 :2	57	5
7	Non séchée	B	1 :2	90	Valeur négative
8	Non séchée	C	1 :2	90	20

Les mesures effectuées montrent une erreur importante lors des essais 4, 5 et 7 (taux de fixation négatif). De plus, une différence de concentration de colorant a été constatée en comparant le résultat de la première mesure, avant le début de la réaction, et la concentration théorique, calculée à partir de la pesée du colorant (voir annexe VII).

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Lors du premier essai avec de la chitine colloïdale non séchée, les prélèvements à la seringue n'ont pu être effectués qu'au début et à la fin de la réaction, car le substrat bouchait la seringue. Par la suite, le substrat et le colorant ont été séparés par centrifugation, mais il s'est avéré que malgré cela, un peu de chitine colloïdale restait en suspension et faussait les mesures colorimétriques. Dès l'essai n°6, les prélèvements ont été effectués avec une pipette pasteur, puis filtrés à l'aide d'une seringue.

Lors de l'essai n°8, la coloration semble avoir fonctionné. Visuellement, la chitine est beaucoup plus colorée. L'absorbance diminue sensiblement durant la réaction. Étant donné que le prélèvement à 15 min. est plus élevé que le prélèvement initial, et que la correspondance en g/l correspond à la pesée effectuée, le taux de fixation a été recalculé en considérant la concentration de RBB à 15 min afin de se rendre compte du taux de fixation dans ce cas de figure, ce qui donne un taux de fixation de 28 %. Cependant, le taux de fixation considéré est le taux calculé avec la pesée initiale, qui vaut 20 %.

3.6 ESSAIS DE DOSAGES COLORIMÉTRIQUES AVEC LE LYSOZYME

Après la préparation du substrat, le dosage de l'activité du lysozyme a été testé (voir annexe VIII). Deux types de substrat ont été employés (méthode A) : la chitine en suspension colloïdale et la chitine séchée afin de déterminer si le séchage peut être employé pour faciliter le stockage.

Tableau 8: Résultats obtenus lors des premiers essais.

Chitine séchée				Chitine colloïdale			
Essai	Temps [min]	Absorbance [-]	Remarques	Essai	Temps [min]	Absorbance [-]	Remarques
1	60	0.020	1 ml de substrat, 100 µl d'enzyme, centrifugation.	1	30	0.134	1 ml de substrat, 100 µl d'enzyme, centrifugation.
2	60	0.020		2	30	0.129	
3	60	0.018		3	30	0.201	
4	60	0.021		4	30	0.110	
Blanc	60	0.020		5	30	0.112	
5	30	0.134	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.	Blanc	30	0.237	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.
6	30	0.119		6	86	0.058	
7	30	0.100		7	86	0.060	
8	30	0.129		8	86	0.074	
9	30	0.119		9	86	0.065	
Blanc	30	0.015	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.	10	86	0.065	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.
10	30	0.067		Blanc	86	0.096	
11	30	0.116		11	30	0.077	
12	30	0.174		12	30	0.079	
13	30	0.140		13	30	0.075	
14	30	0.128	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, filtration.	14	30	0.083	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, filtration.
Blanc	30	0.015		15	30	0.081	
15	30	0.009		Blanc	30	0.100	
16	30	0.006		16	30	0.016	
17	30	0.005		17	30	0.014	
18	30	0.005	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, filtration.	18	30	0.013	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, filtration.
19	30	0.004		19	30	0.014	
Blanc	30	0.009		20	30	0.014	
				Blanc	30	0.016	

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Les essais pour la chitine séchée montrent que la dégradation de la chitine par les lysozymes ne peut être mesurée à l'aide du Remazol Brilliant Blue R. En effet, pour les essais 1 à 4 et 15 à 19, il n'y a aucune différence entre les tests et le blanc, ce qui témoigne de l'absence de colorant issu de la dégradation en solution. Les essais 5 à 14 montraient la présence de petites particules, vraisemblablement de la chitine séchée ayant résisté à la centrifugation.

Les essais 1 à 15 pour la chitine en suspension colloïdale (non séchée) correspondent en fait à un dosage turbidimétrique de la chitine, car le problème dû à la centrifugation s'est également posé. C'est pourquoi les essais 16 à 19 ont été effectués avec filtration. Dans ce cas-là, le blanc et les tests ne se différencient pas à nouveau.

De nouveaux essais ont été effectués avec de la chitine colloïdale colorée (méthode C) et une solution de lysozymes à deux concentrations différentes (200 mg/l et 1 g/l). Les quantités employées sont les suivantes : 1 ml de substrat, et 500 µl de solution d'enzymes (ou de tampon, pour le blanc).

Tableau 9: Résultats obtenus pour une incubation de 60 minutes à température ambiante.

Enzyme à 200 [mg/l] (1)		Enzyme à 1 [g/l] (2)
Essai	Absorbance [-]	Absorbance [-]
1	0.016	0.006
2	0.013	0.005
3	0.015	0.003
4	0.013	0.006
5	0.014	0.005
6	0.011	0.003
Blanc	0.006	0.003

A partir des résultats de la première des deux séries d'essais, on peut supposer que la différence d'absorbance correspond au résultat de la dégradation du substrat. Cependant, si c'était le cas, une différence d'absorbance beaucoup plus marquée aurait dû être observée. Or, les échantillons sont encore plus proches du blanc. La séparation par filtration ne semble donc pas adaptée.

D'autres essais ont été effectués à 50°C et avec une centrifugation plus conséquente (17'000 g durant 10 minutes). Le substrat employé a une concentration de 0.15 g/l de chitine colorée (poids sec). Les essais ont été effectués avec 1 ml de substrat et 500 µl d'enzymes (voir annexe IX).

Tableau 10: Résultats obtenus après 60 mn d'incubation à 50°C avec une concentration en enzymes variable.

Essai n°	Remarques	Moyenne [-]	Écart-type [-]	C. V. [%]
1 – 6	Enzyme à 1 g/l	0.123	0.004	3
Blanc	Tampon phosphate	0.064	-	-
7 – 12	Enzyme à 1 g/l	0.139	0.016	12
Blanc	Tampon phosphate	0.079	-	-
13 – 15	Enzyme à 2 g/l, matin	0.141	0.004	2
16 – 18	Enzyme à 1 g/l, matin	0.140	0.015	11
19 – 21	Enzyme à 0.5 g/l, matin	0.120	0.012	10
Blanc	Tampon phosphate	0.043	-	-
22 – 27	Enzyme à 2 g/l, après-midi	0.113	0.011	10
28 – 33	Enzyme à 1 g/l, après-midi	0.111	0.017	15
34 – 39	Enzyme à 0.5 g/l, après-midi	0.102	0.011	11
Blanc (2)	Tampon phosphate	0.060	0.009	15
40 – 45	Enzyme à 1 g/l	0.119	0.014	12
46 – 51	Enzyme à 0.1 g/l	0.077	0.005	7
Blanc (2)	Tampon phosphate	0.070	0.005	7
52 – 57	Enzyme à 1 g/l	0.114	0.014	13
58 – 63	Enzyme à 0.2 g/l	0.081	0.005	6
Blanc (6)	Tampon phosphate	0.069	0.001	2

Le premier détail à remarquer, est la différence de reproductibilité entre les analyses effectuées le matin et celles réalisées l'après-midi. De plus, on peut constater une différence au niveau de la valeur de l'absorbance, qui est plus élevée le matin que l'après-midi dans le tableau 10. Les solutions d'enzymes ont donc été conservées dans une chambre froide à 4°C entre les séries d'analyses pour contrer ce problème.

Lors des essais 40 à 63, les différences de reproductibilité et de valeur d'absorbance sont effectivement moins marquées. Il est donc recommandé de conserver les solutions d'enzyme à 4°C pour pouvoir les utiliser une journée entière.

3.7 DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEURS PAR L'ACIDE DINITRO-3,5-SALICYLIQUE

Afin d'écarter un problème de spécificité entre le substrat et l'enzyme, l'activité de l'enzyme peut être vérifiée en dosant les sucres réducteurs issus de la dégradation du substrat par l'enzyme à l'aide d'acide dinitrosalicylique. Cependant, le Remazol Brilliant Blue R absorbe également à la longueur d'onde employée (540 nm) et perturbe le dosage. Cette méthode n'est donc pas adaptée comme méthode de contrôle de l'activité enzymatique.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

D'après les résultats obtenus avec une incubation à 50°C durant 60 minutes, puis une séparation entre composés solubles et insolubles par centrifugation, la méthode envisagée pour doser l'activité enzymatique des lysozymes semble fonctionner. Néanmoins, la reproductibilité des résultats nécessite encore une amélioration.

Celle-ci peut être apportée en augmentant le taux de fixation de colorant sur le substrat, en augmentant le rapport stœchiométrique entre la chitine et le Remazol Brilliant Blue R (par exemple à 1 : 4). Cependant, cela va entraîner une consommation importante en colorant, qui n'a qu'une pureté de 50 % environ : pour colorer 0.5 g de chitine (poids sec), il faut 6.6 g. de RBB R (rapport stœchiométrique 1 : 2). Si l'on garde le même rapport, il faudrait prolonger le temps de réaction jusqu'au taux de fixation désiré. Il est également important de vérifier que le mordant ne limite pas la coloration. Si tel est le cas, il faudrait en adapter la concentration, ou encore changer de mordant.

Un autre élément intéressant à observer serait d'étudier l'influence d'une lyophilisation de la chitine colloïdale sur sa capacité à former une suspension colloïdale. Si cette opération n'empêche pas la formation d'une suspension colloïdale, le stockage du substrat en serait facilité.

Un mode opératoire de la fabrication du substrat, ainsi que de la méthode mise en place est disponible en annexe X.

4.1 VALIDATION DE LA MÉTHODE

La méthode mise en place n'a été que partiellement validée. Sa précision est représentée par la répétabilité et la reproductibilité. Sur 6 mesures effectuées en parallèle, le coefficient de variation varie de 3 à 15. Les plus grandes variations sont dues à un problème de stabilité des solutions d'enzymes à température ambiante. La répétabilité de la coloration du substrat ainsi que de la fabrication de la chitine colloïdale devrait être vérifiée. Un contrôle avec une enzyme inactivée devrait également être effectué.

Le domaine de linéarité a été déterminé au point 3.2. Quant au domaine d'application, il correspond à une concentration en enzymes située entre 0.2 et 1.0 g/l. En augmentant le taux de fixation du colorant sur le substrat, ce domaine sera modifié.

4.2 APPLICATION À D'AUTRES ENZYMES

La méthode mise au point dans le cadre de ce travail peut être appliquée à d'autres enzymes, pour autant qu'elles dégradent la chitine (chitinases). Dans le cas contraire, un autre substrat mieux adapté devra être modifié pour permettre un dosage de l'activité enzymatique par colorimétrie.

4.3 COMPARAISON DES DEUX MÉTHODES ÉTUDIÉES

Ces deux méthodes ont été comparées sous deux aspects : la sensibilité (pente) et le coût des réactifs (enzyme, substrat).

Tableau 11: Comparaison des deux méthodes concernant leur sensibilité et leur coût en substrat.

Méthode	Concentration du substrat [mg/l]	Concentration en enzymes [mg/l]	Pente [UA/h]
Turbidimétrique	13	20	1.8
Colorimétrique (RBB R)	150	200	0.012

Le tableau 11 montre que, pour la méthode colorimétrique, il est nécessaire d'employer environ 10 fois plus de substrat et d'enzyme que pour la méthode turbidimétrique, afin d'obtenir une pente environ 150 fois moins importante.

Dans un cas réel, la concentration en lysozyme est généralement inconnue au début de l'analyse. Le cas échéant, l'analyse peut ne pas donner de résultat en raison d'une faible concentration en enzymes. S'ajoute à cela le coût d'achat des réactifs, en tenant compte que seule la moitié du RBB R est effectivement utilisée.

Si la sensibilité de cette analyse ne peut être améliorée, elle ne pourra pas servir de substitut à la méthode actuellement employée.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Andlauer W., Module 316, Support de cours de Biochimie I, Enzymes et cinétique enzymatique, pp. 6 à 16.
2. Cours sur la structure du lysozyme, université d'Angers : <http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/7RelStructFonction/6Proteases/1Lysozyme/1Lysozyme.htm>
3. Nanjo F. et al., Journal of Biochemistry, Volume 104, No 2, 1988, p. 255-258
4. Sigma Enzymatic Assay of Lysozyme
5. Shugar D., Biochimica et Biophysica Acta, Volume 8, 1952, p. 302-309
6. Varum K. M., Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects, Volume 1291, Issue 1, August 1996, p. 5-15
7. Hardt M. et al., Analytical Biochemistry, Volume 312, Issue 1, January 2003, p. 73-76
8. Ramírez G. et al., Journal of Microbiological Methods, Volume 56, Issue 2, February 2004, p. 213-219
9. Hsu S. C. and Lockwood J. L., Applied Microbiology, Volume 29, March 1975, p. 422-426
10. Private communication with prof. A.-F. Grogg

6. ANNEXES

- I. Matériel employé
- II. Protocole Sigma, Enzymatic Assay of LYSOZYME
- III. Résultats obtenus avec la méthode de dosage enzymatique par turbidimétrie
- IV. Scans UV du Remazol Brilliant Blue R
- V. Détermination du domaine de linéarité
- VI. Spectres RMN du proton et du carbone du RBB R, détail des calculs
- VII. Résultats du suivi colorimétrique de la coloration du substrat
- VIII. Résultats du dosage enzymatique sur le substrat à température ambiante
- IX. Résultats du dosage enzymatique sur le substrat à 50°C
- X. Modes opératoires
- XI. Publications, dans l'ordre d'apparition dans ce travail

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

6.1 MATÉRIEL EMPLOYÉ

6.1.1 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DU LYSOZYME PAR TURBIDIMÉTRIE

Balance analytique Precisa XT 220A (F107)

Spectromètre Agilent (F106)

6.1.2 DÉTERMINATION DU DOMAINE LINÉAIRE DE L'ABSORBANCE DU RBB R

Balance analytique Ohaus Discovery (F101)

Spectromètre UV/VIS PerkinElmer Lambda40

6.1.3 DÉTERMINATION DE LA PURETÉ RMN DU REMAZOL BRILLIANT BLUE R

Spectromètre à RMN Bruker

6.1.4 FABRICATION DE LA CHITINE COLLOÏDALE

Moulin Ika M20

Broyeur centrifuge Retsch

Tamiseuse à vibrations Fritsch n°8987,

Tamis DIN 4188

Filtres en papier Schleicher & Schuell, Ref. No. 300112, Ø 150 mm

pH-indicator strips, Merck, 1.09535.0001

6.1.5 COLORATION DE LA CHITINE COLLOÏDALE AVEC RBB R

Balance Mettler PM 480 DeltaRange

6.1.6 SUIVI DE L'ÉVOLUTION DE LA COLORATION DE LA CHITINE

Seringue ERSTA® 2 ml E82061-1

Aiguille Terumo Neolus 0.9x55 mm 0197

Filtres à seringue EXAPURE™, No ATSY25TF4, porosité 0.45 µm

Spectrophotomètre Biochrom Libra S12

Mini centrifugeuse Carl Roth

6.1.7 DOSAGES COLORIMÉTRIQUES AVEC LE LYSOZYME

Mini centrifugeuse Roth

Centrifugeuse Hettich zentrifugen, universal 32 R

Biosan Thermo Shaker TS-100

6.1.8 DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEURS AVEC L'ACIDE DINITRO-3,5-SALICYLIQUE

Biosan Thermo Shaker TS-100

6.2 PROTOCOLE SIGMA

Enzymatic Assay of LYSOZYME (EC 3.2.1.17)

PRINCIPLE:

Micrococcus lysodeikticus Cells (Intact) ----- > Micrococcus lysodeikticus Cells (Lysed)

CONDITIONS: T = 30°C, pH = 7.4, A_{450 nm}, Light path = 1 cm

METHOD: Turbidimetric

REAGENTS:

- A. 30 mM Potassium Phosphate Buffer with 0.1% (w/v) Bovine Serum Albumin, pH 7.4 at 30°C
(Prepare 100 ml in deionized water using Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous, Sigma Prod. No. P-5379 and Albumin, Bovine, Sigma Prod No. A-4503. Adjust to pH 7.4 at 30°C with 1 M KOH.)
- B. 0.01 % (w/v) Micrococcus lysodeikticus Cell Suspension (Substrate)
(Prepare 25 ml in Reagent A using Micrococcus lysodeikticus, ATCC 4698 lyophilized tells, Sigma Prod. No. M-3770. The A_{450 nm}, of this suspension should be between 0.6 and 0.7.)
- C. Lysozyme Enzyme Solution
(Immediately before use, prepare a solution containing 5000 - 10,000 units/ml of lysozyme in cold Reagent A.)

PROCEDURE:

Pipette (in milliliters) the following reagents into suitable cuvettes:

	Test	Blank
Reagent B (Substrate)	1.00	1.00

Enzymatic Assay of LYSOZYME (EC 3.2.1.17)

PROCEDURE: (continued)

Equilibrate to 30°C. Monitor the A_{450} nm until constant, using a suitably thermostatted spectrophotometer.² Then add:³

Reagent C (Enzyme Solution)	0.01	—
Reagent A (Buffer)	—	0.01

Immediately mix by inversion and record the decrease in A_{450} nm for approximately 5 minutes. Obtain the ΔA_{450} nm/minute using the maximum linear rate for both the Test and Blank.

CALCULATIONS:

$$\text{enzyme} = \frac{(\Delta A_{450}/\text{min Test} - \Delta A_{450}/\text{min Blank})(\text{df}) \text{ Units/ml}}{(0.001)(0.01)}$$

df = Dilution factor

0.001 = Change in absorbance at A_{450} nm, as per the Unit Definition 0.01 = Volume (in milliliter) of enzyme used

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

UNIT DEFINITION:

One unit will produce a ΔA_{450} nm of 0.001 per minute at pH 7.4 at 30°C using a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* as substrats, in a 1.0 ml reaction mixture.

FINAL ASSAY CONCENTRATION:

In a 1.00 ml reaction mix, the final concentrations are 30 mM potassium phosphate, 0.01% (w/v) *Micrococcus lysodeikticus* tell suspension, 0.1% (w/v) bovine serum albumin, and 50 - 1000 units lysozyme.

**Enzymatic Assay of LYSOZYME
(EC 3.2.1.17)**

REFERENCE:

Shugar, D. (1952) *Biochimica et Biophysica Acta* 8, 302-309.

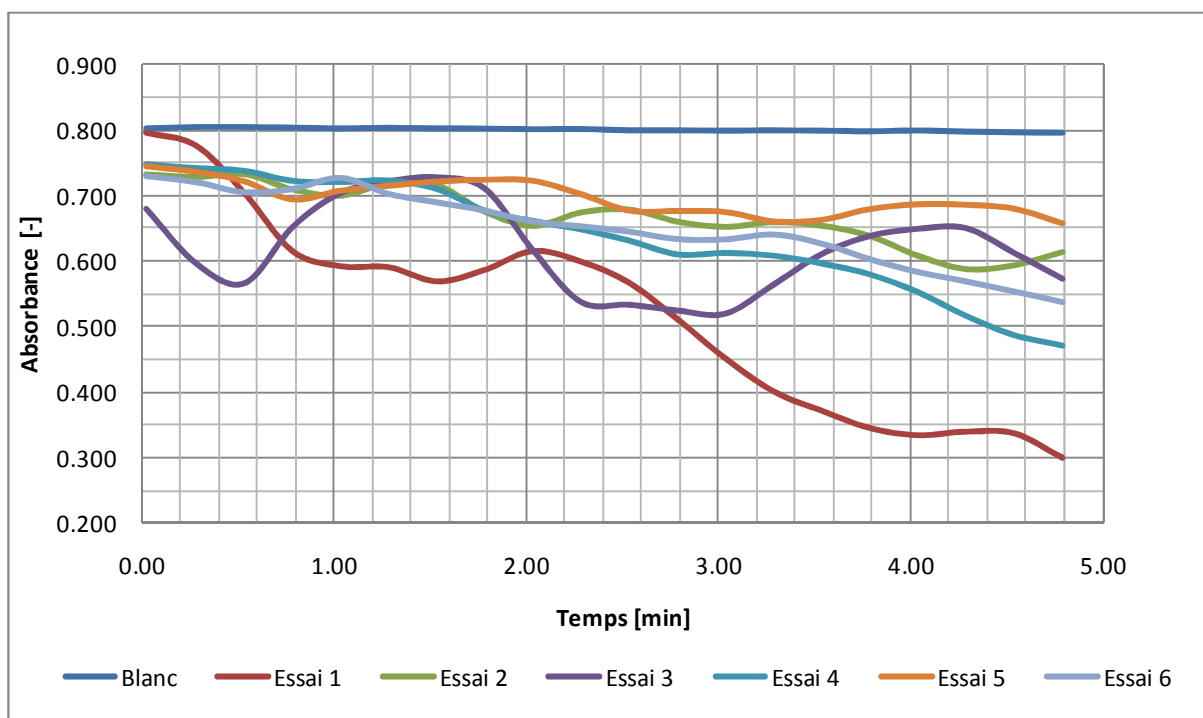
NOTES:

1. Store the micrococcus lysodeikticus cell suspension until homogenous. This may take up to 15 minutes.
2. The initial absorbance should be between 0.5 and 0.7.
3. Run one test at a time. The reaction is too fast to enable multiple tests to be run simultaneously.
4. This assay is based on the cited reference.
5. Where Sigma Product or Stock numbers are specified, equivalent reagents may be substituted.

This procedure is for informational purposes. For a current copy of Sigma's quality control procedure contact our Technical Service Department.

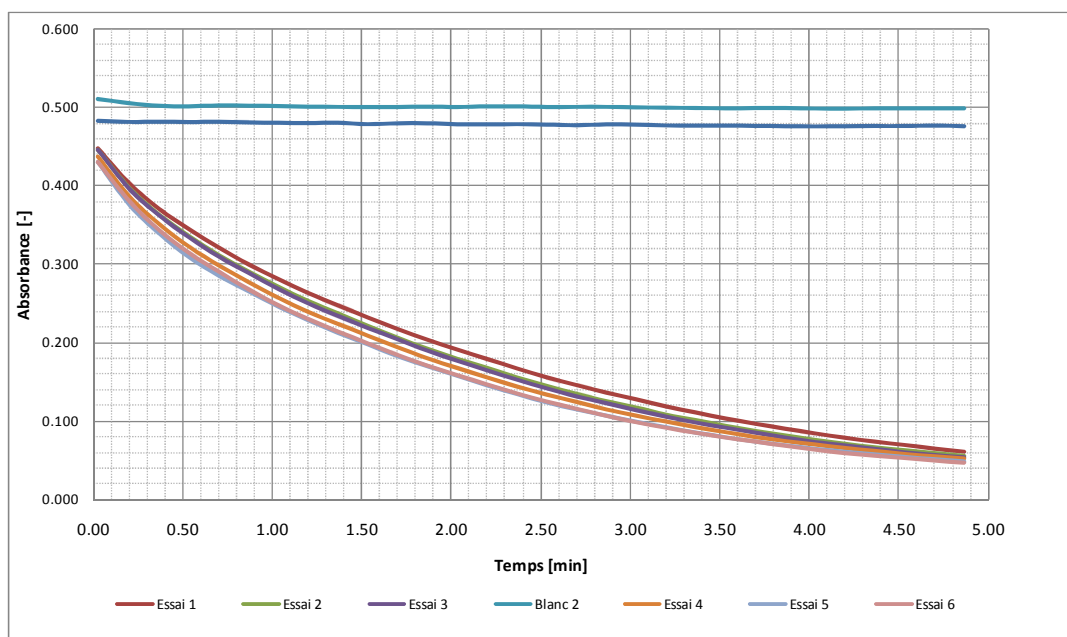
6.3 RÉSULTATS OBTENUS AVEC LA MÉTHODE DE DOSAGE ENZYMATIQUE PAR TURBIDIMÉTRIE

Première série		Blanc	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6
Time(s)	Temps [min]	Absorbance [UA]						
1.5	0.03	0.801	0.795	0.734	0.678	0.747	0.746	0.729
17	0.28	0.803	0.776	0.730	0.596	0.741	0.737	0.719
32.1	0.54	0.803	0.703	0.734	0.566	0.737	0.723	0.704
47.1	0.79	0.802	0.615	0.710	0.651	0.722	0.695	0.709
62.1	1.04	0.801	0.592	0.701	0.703	0.720	0.709	0.726
77.1	1.29	0.802	0.590	0.720	0.720	0.722	0.716	0.701
92.1	1.54	0.801	0.568	0.717	0.726	0.709	0.723	0.689
107	1.78	0.801	0.586	0.676	0.709	0.677	0.725	0.676
122	2.03	0.800	0.615	0.655	0.616	0.661	0.724	0.659
137	2.28	0.800	0.599	0.675	0.537	0.648	0.703	0.652
152.1	2.54	0.798	0.566	0.679	0.533	0.631	0.678	0.644
167.1	2.79	0.798	0.511	0.661	0.524	0.610	0.678	0.632
182.1	3.04	0.798	0.450	0.653	0.520	0.612	0.676	0.632
197.1	3.29	0.798	0.400	0.660	0.564	0.608	0.662	0.639
212.1	3.54	0.798	0.371	0.655	0.610	0.597	0.664	0.625
227	3.78	0.797	0.345	0.639	0.637	0.580	0.680	0.602
242	4.03	0.798	0.334	0.609	0.648	0.553	0.688	0.582
257	4.28	0.796	0.339	0.588	0.649	0.517	0.687	0.568
272.1	4.54	0.796	0.336	0.594	0.612	0.488	0.681	0.552
287.1	4.79	0.795	0.299	0.614	0.573	0.473	0.659	0.536
$\Delta A / \text{min}$		0.001	0.014	0.029	0.013	0.056	0.014	0.038



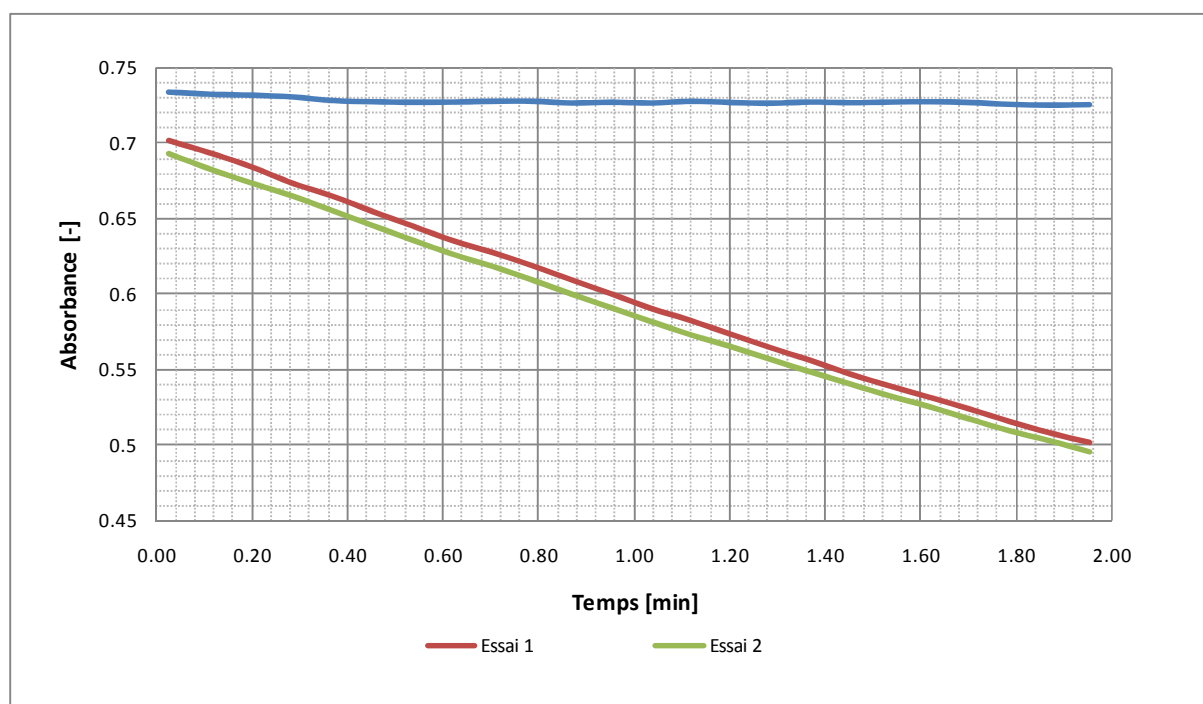
Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Deuxième série		Blanc 1	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Blanc 2	Essai 4	Essai 5	Essai 6
Time(s)	Temps [min]	Absorbance [AU]							
1.5	0.03	0.483	0.448	0.446	0.446	0.512	0.437	0.431	0.430
12.1	0.20	0.481	0.404	0.397	0.396	0.506	0.386	0.376	0.380
22.1	0.37	0.482	0.371	0.363	0.362	0.502	0.351	0.340	0.343
32.0	0.53	0.481	0.345	0.336	0.335	0.501	0.323	0.310	0.314
42.1	0.70	0.481	0.322	0.312	0.310	0.502	0.299	0.286	0.290
52.1	0.87	0.481	0.300	0.291	0.289	0.502	0.277	0.266	0.268
62.1	1.04	0.480	0.282	0.271	0.268	0.502	0.257	0.246	0.247
72.0	1.20	0.480	0.264	0.253	0.250	0.501	0.240	0.229	0.230
82.1	1.37	0.480	0.248	0.238	0.234	0.500	0.224	0.213	0.214
92.1	1.54	0.478	0.233	0.222	0.218	0.500	0.209	0.198	0.199
102.1	1.70	0.479	0.218	0.206	0.204	0.500	0.195	0.183	0.184
112.0	1.87	0.479	0.205	0.193	0.190	0.501	0.181	0.170	0.171
122.1	2.04	0.478	0.192	0.180	0.177	0.500	0.168	0.158	0.159
132.1	2.20	0.478	0.180	0.168	0.164	0.501	0.156	0.145	0.147
142.1	2.37	0.478	0.168	0.156	0.152	0.501	0.145	0.134	0.135
152.0	2.53	0.478	0.156	0.145	0.141	0.500	0.134	0.124	0.125
162.1	2.70	0.477	0.147	0.135	0.131	0.500	0.125	0.115	0.116
172.1	2.87	0.478	0.137	0.126	0.122	0.500	0.115	0.106	0.107
182.1	3.04	0.478	0.128	0.118	0.113	0.500	0.107	0.099	0.099
192.0	3.20	0.477	0.119	0.109	0.105	0.499	0.100	0.092	0.092
202.1	3.37	0.476	0.111	0.102	0.098	0.499	0.093	0.085	0.085
212.1	3.54	0.476	0.104	0.095	0.091	0.499	0.086	0.079	0.079
222.1	3.70	0.476	0.097	0.088	0.085	0.499	0.080	0.073	0.074
232.2	3.87	0.476	0.091	0.082	0.078	0.499	0.075	0.069	0.069
242.1	4.04	0.475	0.085	0.077	0.073	0.498	0.071	0.064	0.064
252.1	4.20	0.476	0.079	0.072	0.068	0.498	0.066	0.060	0.060
262.1	4.37	0.476	0.074	0.067	0.064	0.498	0.062	0.057	0.056
272.1	4.54	0.476	0.070	0.064	0.059	0.498	0.059	0.054	0.053
282.1	4.70	0.476	0.065	0.060	0.056	0.498	0.056	0.051	0.050
292.1	4.87	0.476	0.062	0.057	0.053	0.498	0.053	0.048	0.047
a		-0.001	0.014	0.015	0.016	-0.001	0.016	0.017	0.017
b		0.481	-0.144	-0.149	-0.151	0.504	-0.151	-0.152	-0.153
c		-	0.424	0.418	0.418	-	0.408	0.397	0.400
R ²		0.921	0.995	0.994	0.994	0.586	0.993	0.991	0.992



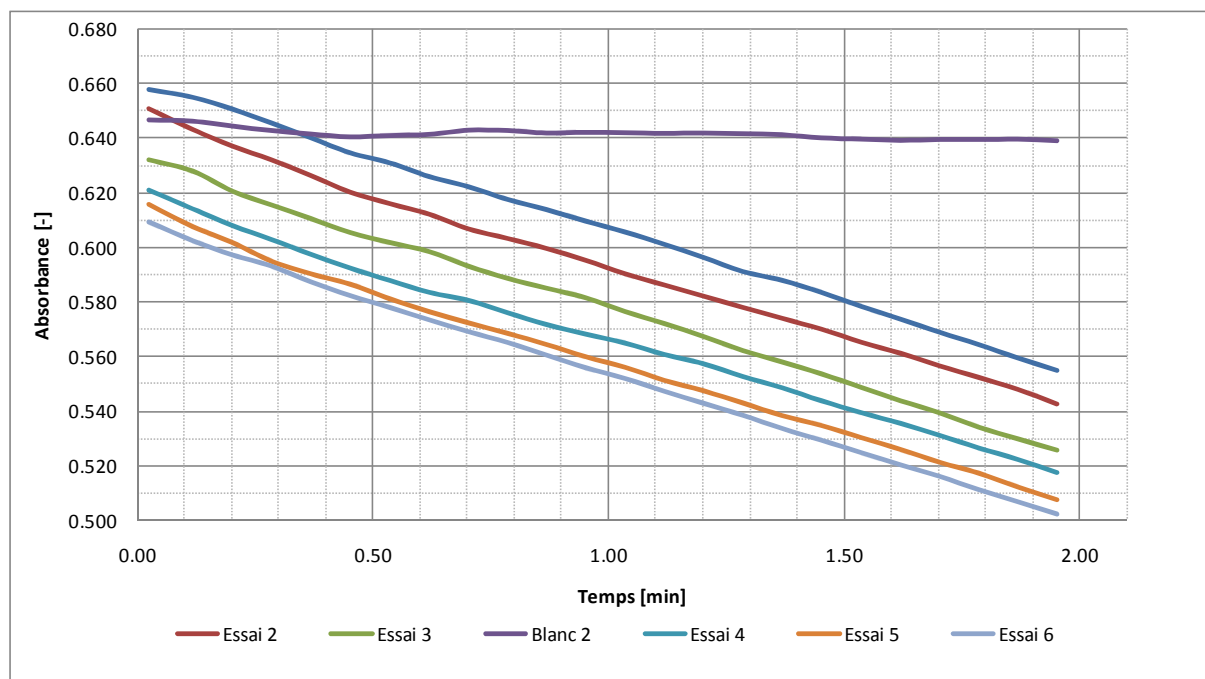
Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Enzyme à 40 mg/ L		Blanc 1	Essai 1	Essai 2		
Time(s)	Temps [min]	Absorbance [AU]				
1.5	0.03	0.734	0.702	0.693		
7.1	0.12	0.732	0.693	0.682		
12.1	0.20	0.732	0.684	0.673		
17.1	0.29	0.731	0.673	0.665		
22.1	0.37	0.728	0.665	0.655		
27.1	0.45	0.728	0.655	0.646		
32.2	0.54	0.727	0.645	0.636		
37.2	0.62	0.727	0.635	0.626		
42.2	0.70	0.728	0.627	0.618		
47.2	0.79	0.728	0.618	0.609		
52.1	0.87	0.727	0.609	0.600		
57.1	0.95	0.727	0.600	0.591		
62.1	1.04	0.727	0.590	0.582		
67.1	1.12	0.728	0.582	0.573		
72.1	1.20	0.727	0.573	0.565		
77.1	1.29	0.727	0.564	0.557		
82.1	1.37	0.727	0.556	0.548		
87.1	1.45	0.727	0.547	0.540		
92.2	1.54	0.727	0.539	0.532		
97.2	1.62	0.728	0.531	0.525		
102.2	1.70	0.727	0.523	0.517		
107.1	1.79	0.726	0.515	0.509		
112.1	1.87	0.725	0.508	0.503		
117.1	1.95	0.726	0.501	0.496	Moyenne	Ecart-type
a		-0.002	-0.103	-0.105	-0.104	0.001
b		0.73	0.692	0.702		
R ²		0.612	0.998	0.998		



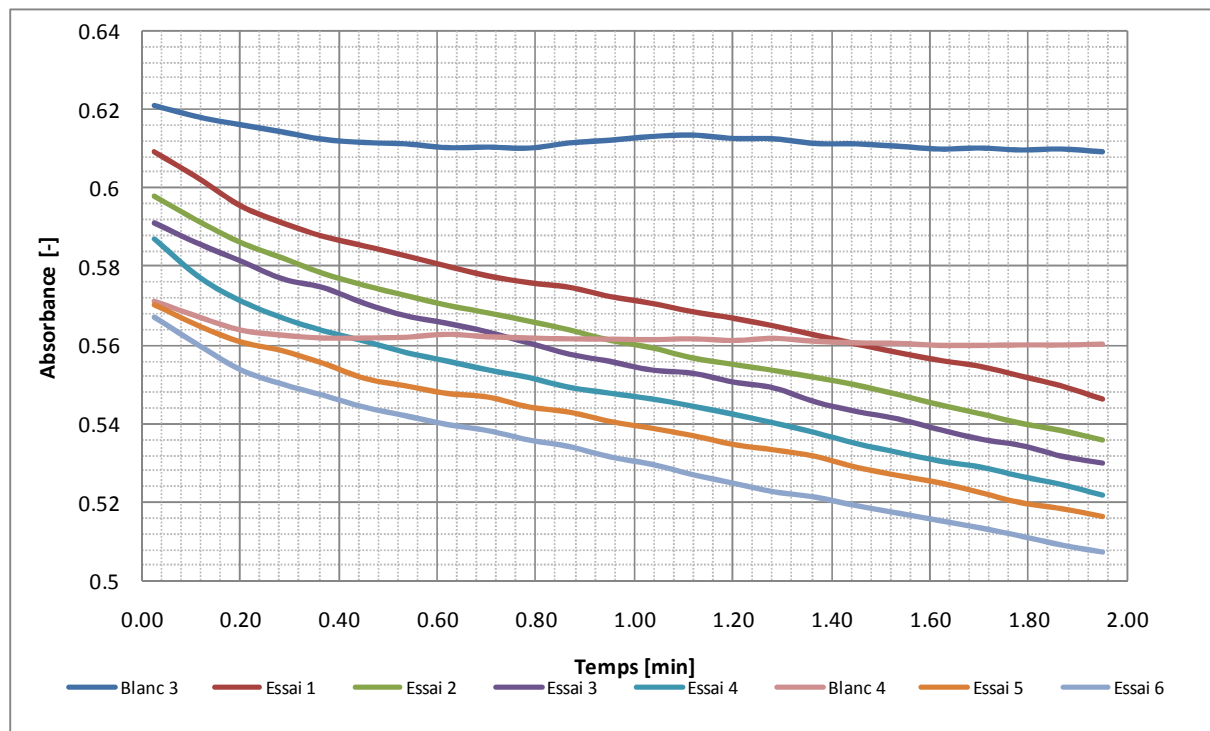
Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Enzyme à 20 mg/ L		Essai 1	Essai 2	Essai 3	Blanc 2	Essai 4	Essai 5	Essai 6		
Time(s)	Temps [min]	Absorbance [AU]								
1.5	0.03	0.658	0.651	0.632	0.646	0.621	0.616	0.610		
7.1	0.12	0.655	0.643	0.628	0.646	0.614	0.608	0.603		
12.1	0.20	0.651	0.637	0.621	0.644	0.608	0.602	0.597		
17.1	0.29	0.645	0.632	0.616	0.643	0.603	0.595	0.593		
22.1	0.37	0.640	0.626	0.611	0.641	0.598	0.590	0.588		
27.1	0.45	0.635	0.620	0.605	0.640	0.592	0.586	0.583		
32.2	0.54	0.631	0.616	0.602	0.641	0.588	0.581	0.578		
37.2	0.62	0.626	0.612	0.598	0.641	0.584	0.576	0.574		
42.2	0.70	0.622	0.606	0.593	0.643	0.581	0.572	0.569		
47.2	0.79	0.617	0.603	0.589	0.643	0.576	0.568	0.565		
52.1	0.87	0.614	0.599	0.585	0.642	0.572	0.564	0.561		
57.1	0.95	0.610	0.595	0.582	0.642	0.568	0.560	0.556		
62.1	1.04	0.606	0.590	0.577	0.642	0.565	0.556	0.552		
67.1	1.12	0.601	0.586	0.572	0.642	0.561	0.551	0.548		
72.1	1.20	0.596	0.582	0.567	0.642	0.557	0.548	0.543		
77.1	1.29	0.591	0.578	0.562	0.641	0.553	0.543	0.539		
82.1	1.37	0.588	0.574	0.558	0.641	0.548	0.538	0.534		
87.1	1.45	0.583	0.570	0.554	0.640	0.544	0.535	0.530		
92.2	1.54	0.578	0.565	0.549	0.639	0.539	0.530	0.525		
97.2	1.62	0.574	0.561	0.544	0.639	0.535	0.526	0.521		
102.2	1.70	0.569	0.556	0.539	0.639	0.531	0.521	0.516		
107.1	1.79	0.564	0.552	0.534	0.639	0.526	0.517	0.511		
112.1	1.87	0.559	0.548	0.530	0.639	0.522	0.512	0.507		
117.1	1.95	0.555	0.542	0.526	0.639	0.517	0.508	0.502	Moyenne	Ecart-type
a		-0.053	-0.053	-0.054	-0.002	-0.051	-0.053	-0.054	-0.053	0.001
b		0.660	0.646	0.632	0.644	0.617	0.611	0.608		
R ²		0.999	0.997	0.999	0.666	0.997	0.997	0.999		



Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

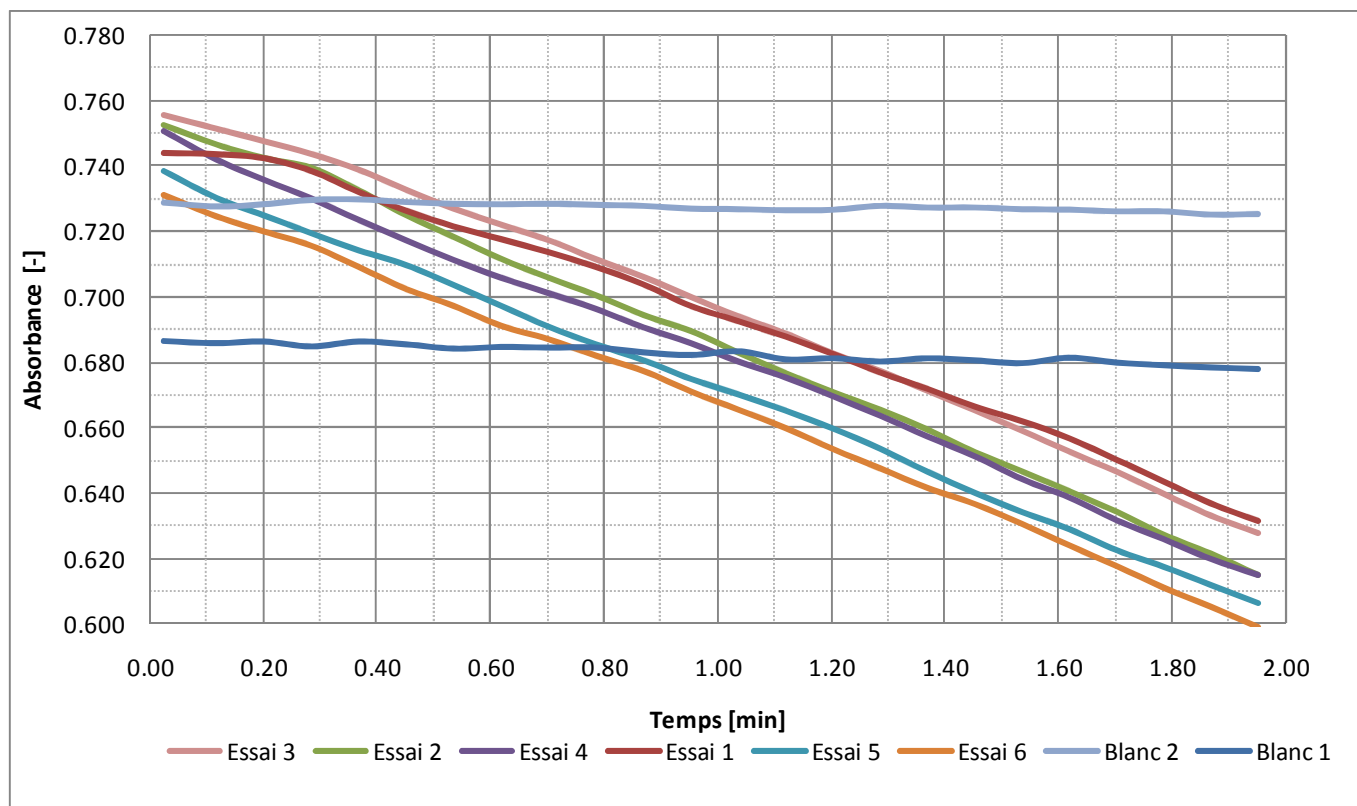
Enzyme à 10 mg/ L		Blanc 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6	Blanc 4
Time(s)	Temps [min]	Absorbance [AU]							
1.5	0.03	0.621108	0.609379	0.59797	0.591064	0.586944	0.570074	0.566991	0.571362
7.1	0.12	0.618117	0.602314	0.591409	0.585614	0.577067	0.564564	0.559628	0.567208
12.1	0.20	0.616208	0.595469	0.586176	0.581319	0.571147	0.560578	0.553533	0.563937
17.1	0.29	0.614424	0.591185	0.582316	0.576856	0.566884	0.558387	0.549947	0.562664
22.1	0.37	0.612543	0.587727	0.578374	0.574587	0.563615	0.555173	0.547108	0.561934
27.1	0.45	0.611725	0.585287	0.575343	0.57061	0.560984	0.551371	0.544082	0.561934
32.2	0.54	0.611375	0.582745	0.572757	0.567412	0.558071	0.549445	0.541869	0.562144
37.2	0.62	0.610433	0.580122	0.570292	0.565511	0.555894	0.54751	0.53968	0.562875
42.2	0.70	0.610558	0.577611	0.568376	0.563288	0.553635	0.546594	0.538088	0.562247
47.2	0.79	0.610313	0.575879	0.566248	0.560467	0.551684	0.544068	0.535715	0.56193
52.1	0.87	0.611614	0.574688	0.564032	0.557654	0.549233	0.542768	0.534042	0.561724
57.1	0.95	0.612313	0.57232	0.561415	0.555797	0.547719	0.540374	0.531391	0.561622
62.1	1.04	0.613251	0.570609	0.559532	0.553633	0.546294	0.538675	0.529543	0.561519
67.1	1.12	0.613614	0.568475	0.55694	0.55281	0.54448	0.536805	0.526929	0.561721
72.1	1.20	0.612774	0.566781	0.555277	0.550561	0.542371	0.534534	0.524708	0.561303
77.1	1.29	0.612666	0.564767	0.55374	0.549031	0.540172	0.533153	0.5225	0.561836
82.1	1.37	0.611491	0.562451	0.551995	0.545491	0.537685	0.531495	0.521159	0.561092
87.1	1.45	0.611371	0.560156	0.550044	0.543077	0.53492	0.528759	0.518975	0.560685
92.2	1.54	0.610785	0.557968	0.547614	0.541173	0.532663	0.52663	0.517078	0.560578
97.2	1.62	0.610076	0.556001	0.545081	0.538479	0.530515	0.524802	0.515196	0.560056
102.2	1.70	0.610316	0.554455	0.542779	0.536016	0.52896	0.522308	0.513321	0.560055
107.1	1.79	0.609847	0.551988	0.540371	0.534438	0.526636	0.519732	0.511255	0.56016
112.1	1.87	0.610084	0.549438	0.53849	0.531693	0.524513	0.518215	0.508935	0.560153
117.1	1.95	0.609377	0.546093	0.53611	0.529928	0.52183	0.516224	0.507178	0.560368
a		-0.003	-0.028	-0.028	-0.029	-0.028	-0.025	-0.027	-0.003
b		0.615	0.600	0.590	0.585	0.576	0.565	0.559	0.565
R ²		0.493	0.972	0.980	0.987	0.970	0.989	0.978	0.556



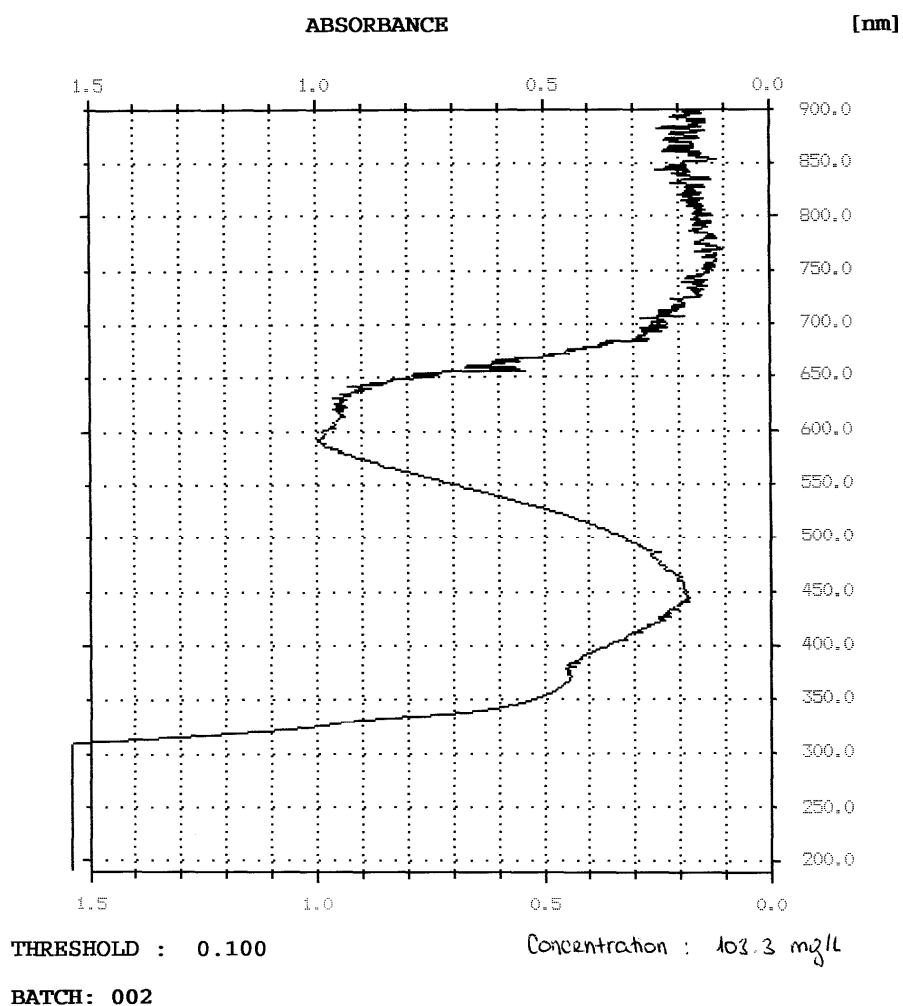
Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Quatrième essai		Blanc 1	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6	Blanc 2		
Time(s)	Temps [min]	Absorbance [AU]									
1.4	0.02	0.686	0.744	0.753	0.756	0.751	0.738	0.731	0.729		
7	0.12	0.686	0.743	0.747	0.752	0.742	0.730	0.724	0.728		
12	0.20	0.686	0.742	0.742	0.748	0.736	0.725	0.720	0.728		
17	0.28	0.685	0.738	0.739	0.744	0.730	0.719	0.715	0.730		
22	0.37	0.686	0.732	0.733	0.739	0.724	0.714	0.709	0.730		
27	0.45	0.685	0.726	0.725	0.733	0.717	0.710	0.702	0.729		
32	0.53	0.684	0.721	0.718	0.727	0.711	0.704	0.697	0.728		
37	0.62	0.684	0.717	0.712	0.722	0.706	0.697	0.691	0.728		
42	0.70	0.684	0.713	0.706	0.718	0.701	0.691	0.687	0.728		
47	0.78	0.684	0.709	0.701	0.712	0.696	0.686	0.682	0.728		
52.1	0.87	0.683	0.704	0.695	0.706	0.691	0.681	0.677	0.728		
57.1	0.95	0.682	0.697	0.690	0.700	0.686	0.675	0.671	0.727		
62.1	1.04	0.683	0.692	0.683	0.694	0.680	0.670	0.665	0.727		
67.1	1.12	0.681	0.688	0.677	0.689	0.675	0.665	0.660	0.726		
72.1	1.20	0.681	0.682	0.671	0.683	0.670	0.660	0.653	0.727		
77.1	1.29	0.680	0.677	0.666	0.678	0.664	0.654	0.647	0.728		
82.1	1.37	0.681	0.672	0.660	0.671	0.657	0.647	0.642	0.727		
87.1	1.45	0.681	0.666	0.653	0.665	0.651	0.640	0.637	0.727		
92.1	1.54	0.680	0.662	0.647	0.659	0.644	0.634	0.631	0.727		
97.1	1.62	0.681	0.656	0.641	0.653	0.639	0.629	0.624	0.727		
102.1	1.70	0.680	0.650	0.634	0.647	0.632	0.623	0.618	0.726		
107	1.78	0.679	0.643	0.628	0.640	0.626	0.618	0.611	0.726		
112	1.87	0.679	0.637	0.622	0.633	0.620	0.612	0.605	0.725		
117	1.95	0.678	0.631	0.615	0.628	0.615	0.607	0.599	0.725	Moyenne	Ecart-type
a		-0.004	-0.060	-0.072	-0.067	-0.069	-0.067	-0.068	-0.001	-0.067	0.004
b		0.686	0.753	0.757	0.762	0.750	0.739	0.734	0.729		
R ²		0.931	0.994	0.999	0.997	0.998	0.999	0.998	0.738		

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

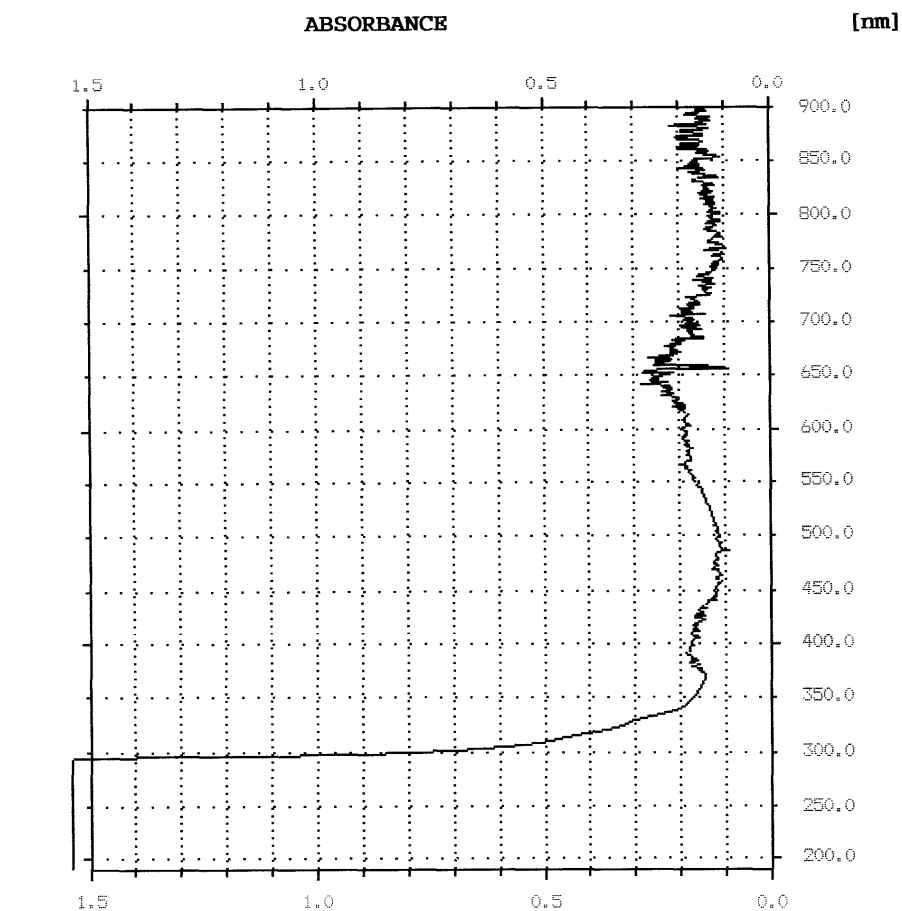


6.4 SCANS UV DU REMAZOL BRILLIANT BLUE R



SAMPLE	TIME	WAVELENGTH	DATA
001	16:17	769.5 nm (MIN)	0.109 A
		660.1 nm (MAX)	0.669 A
		656.3 nm (MIN)	0.540 A
		592.2 nm (MAX)	0.999 A
		441.6 nm (MIN)	0.181 A
		276.5 nm (MAX)	4.013 A
		273.9 nm (MIN)	3.761 A

272.7 nm (MAX)	3.925	A
271.5 nm (MIN)	3.773	A
261.5 nm (MAX)	4.151	A
255.6 nm (MIN)	3.953	A
254.3 nm (MAX)	4.094	A
252.5 nm (MIN)	3.948	A
248.0 nm (MAX)	4.358	A
246.9 nm (MIN)	4.182	A
246.1 nm (MAX)	4.310	A
243.6 nm (MIN)	4.138	A
242.6 nm (MAX)	4.324	A
241.2 nm (MIN)	4.068	A
237.2 nm (MAX)	4.283	A
235.3 nm (MIN)	3.948	A
234.2 nm (MAX)	4.342	A
230.5 nm (MIN)	3.996	A
227.4 nm (MAX)	4.218	A
226.4 nm (MIN)	4.114	A
225.4 nm (MAX)	4.268	A
220.8 nm (MIN)	4.066	A
219.7 nm (MAX)	4.262	A
217.6 nm (MIN)	3.899	A
214.8 nm (MAX)	4.094	A
211.7 nm (MIN)	3.926	A
208.0 nm (MAX)	4.198	A
199.3 nm (MIN)	3.708	A
198.2 nm (MAX)	3.934	A



THRESHOLD : 0.100

Concentration : 10.33 mg/L

BATCH: 001

SAMPLE	TIME	WAVELENGTH	DATA
001	16:11	641.8 nm (MAX)	0.285 A
		486.4 nm (MIN)	0.094 A
		291.9 nm (MAX)	2.131 A
		290.2 nm (MIN)	2.030 A
		259.5 nm (MAX)	3.891 A
		258.3 nm (MIN)	3.710 A
		253.8 nm (MAX)	3.985 A
		252.5 nm (MIN)	3.773 A
		251.5 nm (MAX)	3.927 A
		250.6 nm (MIN)	3.793 A
		246.4 nm (MAX)	4.150 A
		245.5 nm (MIN)	3.948 A

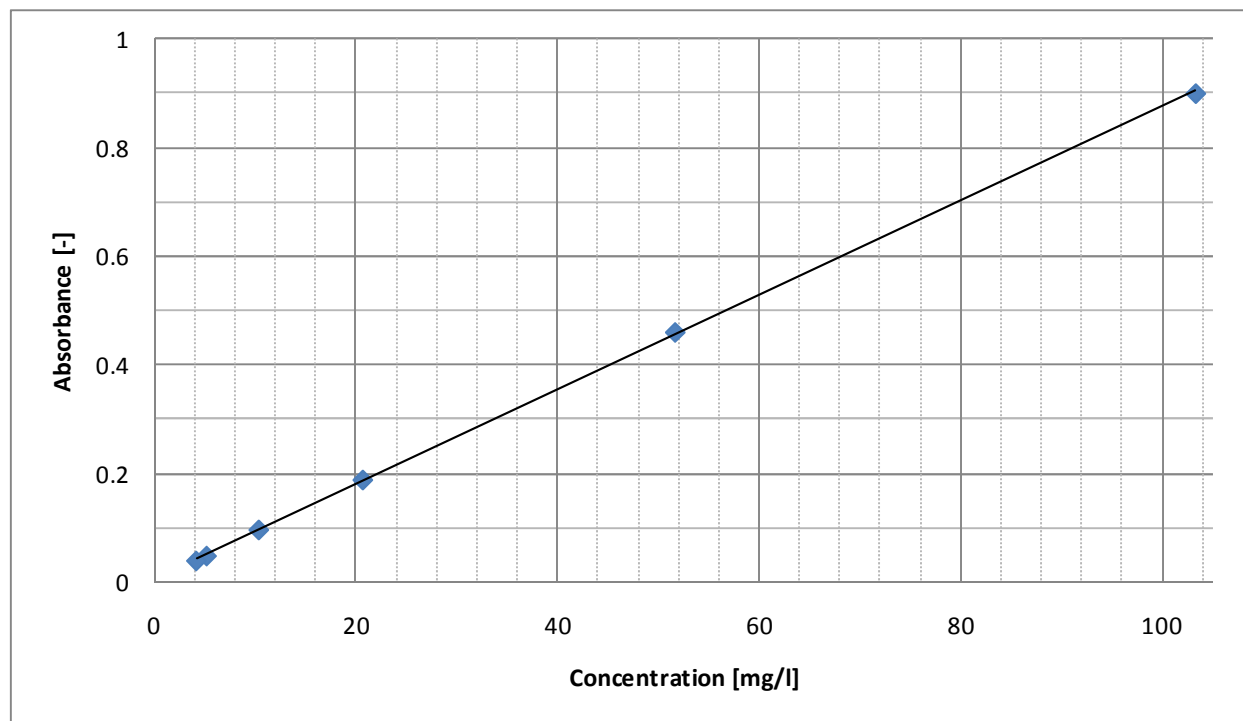
244.4 nm (MAX)	4.134	A
241.4 nm (MIN)	3.934	A
238.3 nm (MAX)	4.135	A
235.3 nm (MIN)	3.847	A
234.1 nm (MAX)	4.187	A
230.4 nm (MIN)	3.932	A
229.0 nm (MAX)	4.088	A
227.9 nm (MIN)	3.932	A
226.6 nm (MAX)	4.140	A
220.8 nm (MIN)	3.928	A
219.6 nm (MAX)	4.078	A
217.6 nm (MIN)	3.731	A
211.0 nm (MAX)	3.914	A
210.0 nm (MIN)	3.811	A
207.8 nm (MAX)	3.990	A
204.6 nm (MIN)	3.705	A
203.2 nm (MAX)	3.829	A
199.3 nm (MIN)	3.452	A
198.1 nm (MAX)	3.929	A

6.5 DÉTERMINATION DU DOMAINE DE LINÉARITÉ

Pesée [g]	0.10330
Concentration [g/l]	1.0330

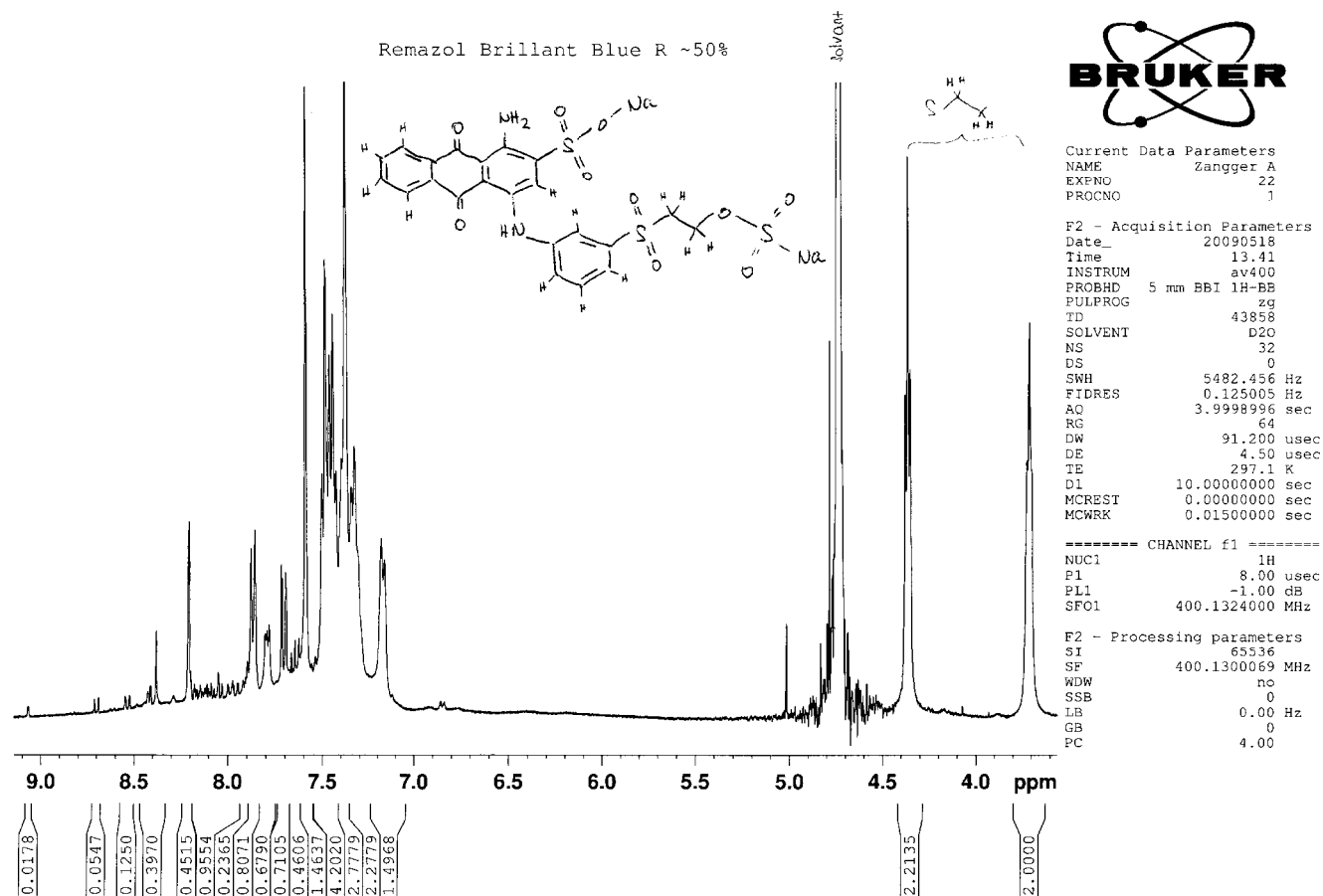
Concentration des solutions de référence [mg/l]	Absorbance [-]
103.3	0.901
51.65	0.461
20.66	0.189
10.33	0.097
5.165	0.049
4.132	0.040
0.0	0.000

a	0.008
b	0.006
R²	0.999

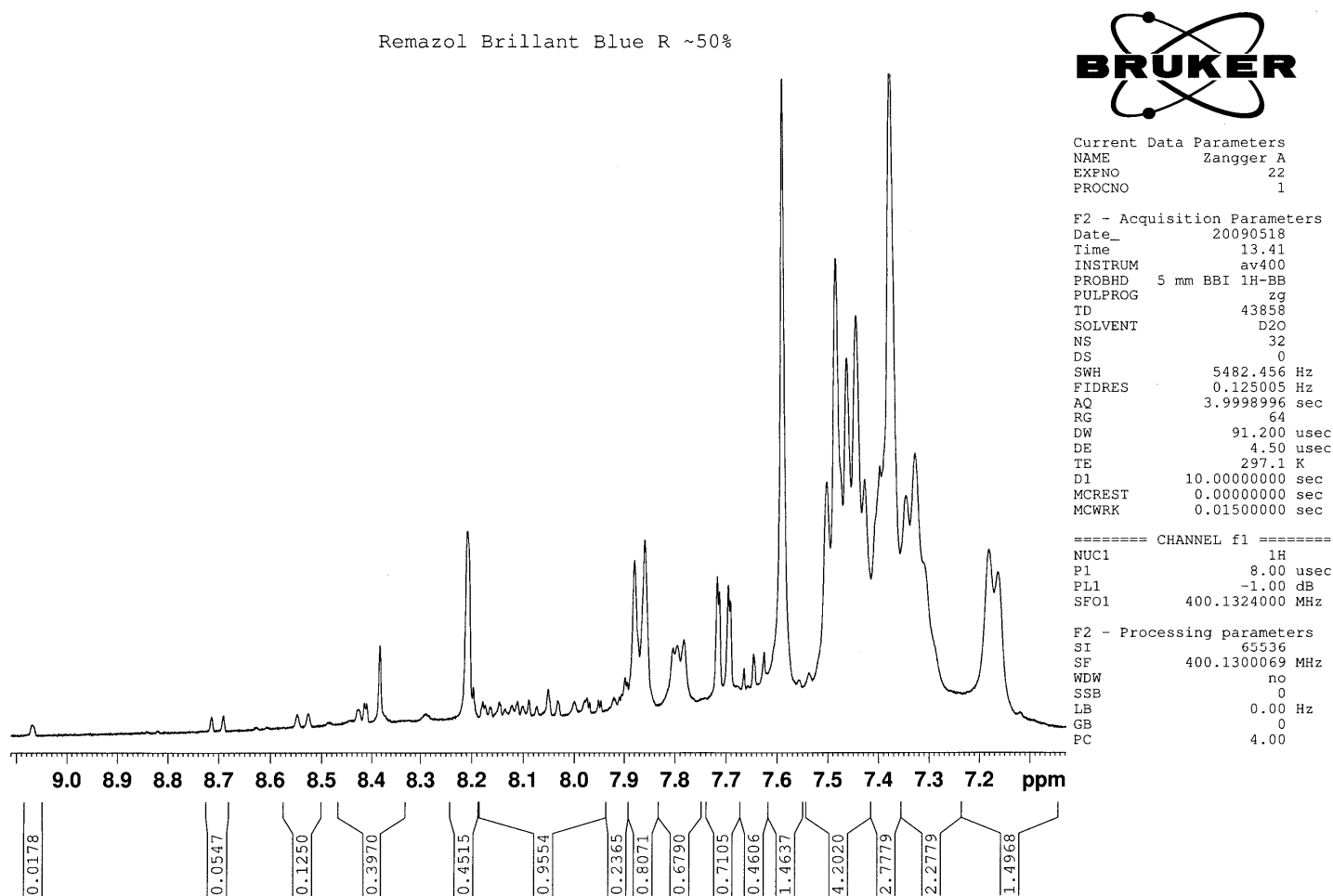


Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

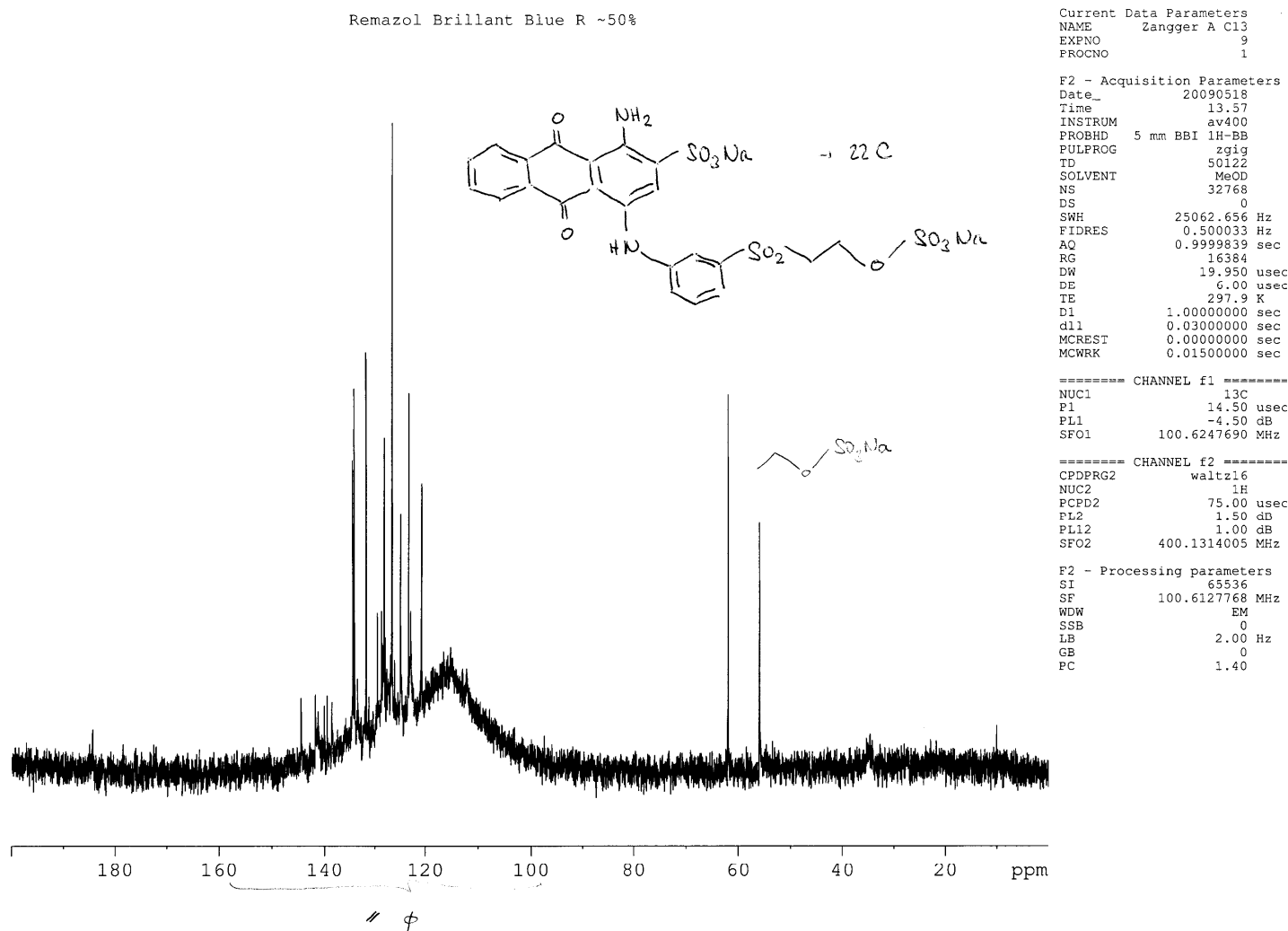
6.6 SPECTRES RMN DU PROTON ET DU CARBONE DU RBB R, DÉTAIL DES CALCULS



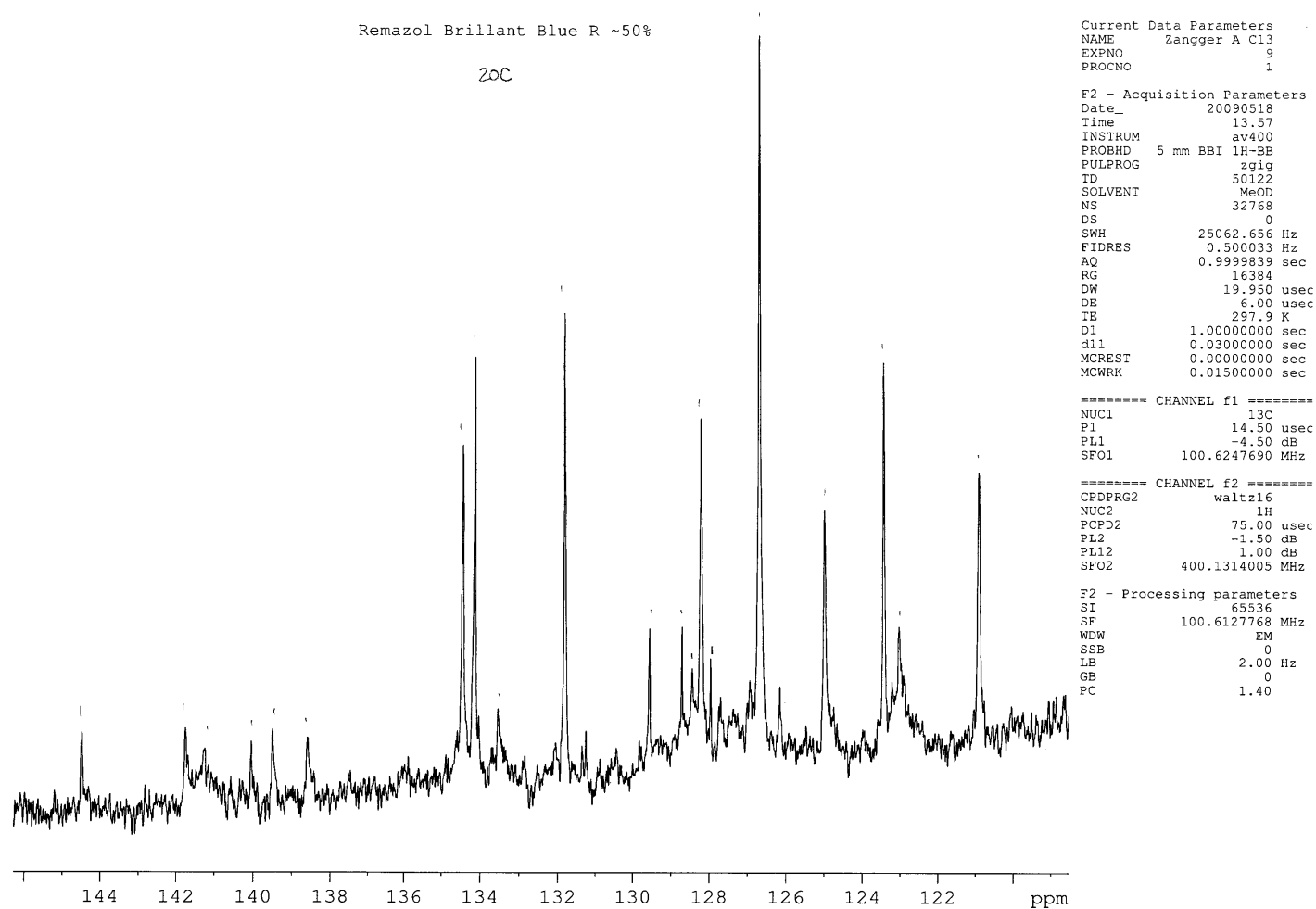
Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme



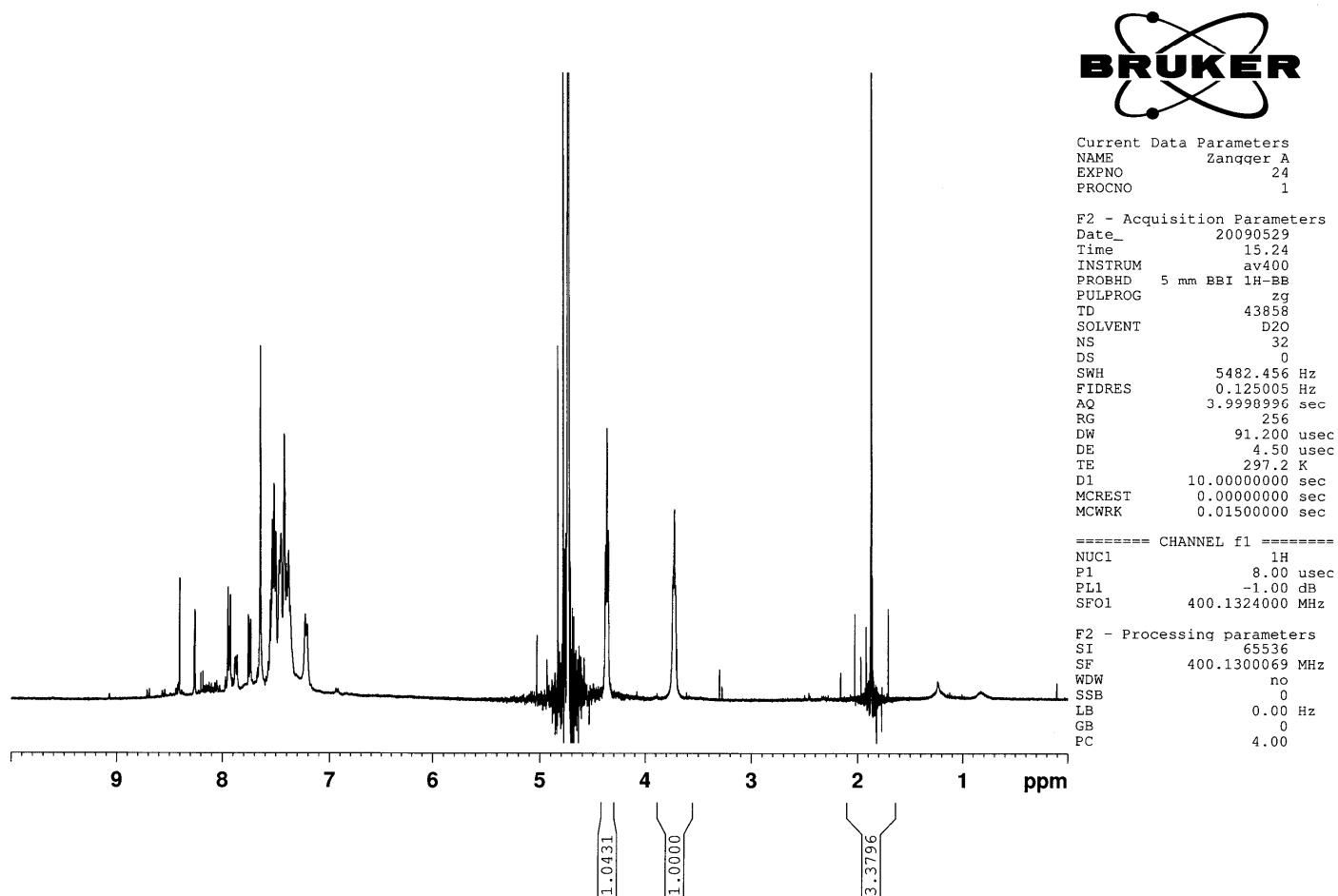
Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme



Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme



Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme



Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

6.7 RÉSULTATS DU SUIVI COLORIMÉTRIQUE DE LA COLORATION DU SUBSTRAT

Masses molaires [g/mol]	
Chitine (unité osidique)	203.1927
RBB	626.56
Pureté du RBB	0.47

Premier essai

Chitine [g]	1.003
Chitine [mol/l]	0.0494
RBB [g]	3.1230
RBB [mol/l]	0.0234
RBB théorique [g/l]	31.23
Volume [ml]	100
Dilution	400

Chitine	1
RBB	0.5

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
7	0.693	34.35	0.0258	
29	0.720	35.70	0.0268	-0.0010
57	0.692	34.30	0.0257	0.0000
87	0.644	31.90	0.0239	0.0018

Chitine séchée

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Deuxième essai

Chitine [g]	0.92
Chitine [mol/l]	0.0453
RBB [g]	1.5954
RBB [mol/l]	0.0096
RBB théorique [g/l]	12.76
Volume [ml]	125
Dilution	200

Chitine	1
RBB	0.2

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
4	0.592	14.65	0.0110	
60	0.576	14.25	0.0107	0.0003

Chitine non séchée

Troisième essai

Chitine [g]	0.49
Chitine [mol/l]	0.0096
RBB [g]	6.5720
RBB [mol/l]	0.0197
RBB théorique [g/l]	26.29
Volume [ml]	250
Dilution	250

Chitine	1
RBB	2

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
19	0.835	25.91	0.0194	
31	0.842	26.13	0.0196	-0.0002
51	0.836	25.94	0.0195	0.0000
64	0.837	25.97	0.0195	0.0000
74	0.818	25.38	0.0190	0.0004
98	0.833	25.84	0.0194	0.0000

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Quatrième essai

Chitine [g]	0.891
Chitine [mol/l]	0.0351
RBB [g]	5.8740
RBB [mol/l]	0.0353
RBB théorique [g/l]	46.99
Volume [ml]	125
Dilution	500

Chitine	1
RBB	1

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
5	0.868	61.36	0.0460	
15	0.915	64.71	0.0485	-0.0025
27	0.833	58.86	0.0442	0.0019
41	0.878	62.07	0.0466	-0.0005
50	0.919	65.00	0.0488	-0.0027
60	0.990	70.07	0.0526	-0.0065
85	0.858	60.64	0.0455	0.0005
152	0.899	63.57	0.0477	-0.0017
179	0.877	62.00	0.0465	-0.0005

Chitine séchée

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Cinquième essai

Chitine [g]	0.4727
Chitine [mol/l]	0.0233
RBB [g]	7.650
RBB [mol/l]	0.0574
RBB théorique [g/l]	76.50
Volume [ml]	100
Dilution	500

Chitine	1
RBB	2.5

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
0	0.973	68.86	0.0517	
18	0.992	70.21	0.0527	-0.0010
138	0.968	68.50	0.0514	0.0003
198	0.982	69.50	0.0521	-0.0005
235	1.045	74.00	0.0555	-0.0039
258	1.034	73.21	0.0549	-0.0033
288	0.995	70.43	0.0528	-0.0012
318	0.980	69.36	0.0520	-0.0004
348	1.005	71.14	0.0534	-0.0017
375	1.001	70.86	0.0532	-0.0015

Chitine non séchée

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Sixième essai

Chitine [g]	0.5023
Chitine [mol/l]	0.0124
RBB [g]	6.495
RBB [mol/l]	0.0244
RBB théorique [g/l]	32.48
Volume [ml]	200
Dilution	500

Chitine	1
RBB	2.0

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
0	0.565	39.71	0.0298	
1.5	0.538	37.79	0.0283	0.0014
16.5	0.539	37.86	0.0284	0.0014
40.5	0.543	38.14	0.0286	0.0012
57.0	0.543	38.14	0.0286	0.0012

Chitine non séchée

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Septième essai

Chitine [g]	0.5000
Chitine [mol/l]	0.0246
RBB [g]	6.516
RBB [mol/l]	0.0489
RBB théorique [g/l]	65.16
Volume [ml]	100
Dilution	1000

Chitine	1
RBB	2.0

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
0	0.524	73.57	0.0552	
15	0.546	76.71	0.0575	-0.0024
30	0.544	76.43	0.0573	-0.0021
75	0.549	77.14	0.0579	-0.0027
90	0.547	76.86	0.0577	-0.0025

Chitine non séchée

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Huitième essai

Chitine [g]	0.5004
Chitine [mol/l]	0.0164
RBB [g]	6.620
RBB [mol/l]	0.0331
RBB théorique [g/l]	44.13
Volume [ml]	150
Dilution	500

Chitine	1
RBB	2.0

Temps [min]	Absorbance [-]	Concentration du RBB [g/l]	Concentration [mol/l]	Δ concentration [mol/l]
0	0.685	42.44	0.0318	
15	0.714	44.25	0.0332	-0.0014
30	0.687	42.56	0.0319	-0.0001
45	0.686	42.50	0.0319	0.0000
60	0.668	41.38	0.0310	0.0008
75	0.658	40.75	0.0306	0.0013
90	0.616	38.13	0.0286	0.0032

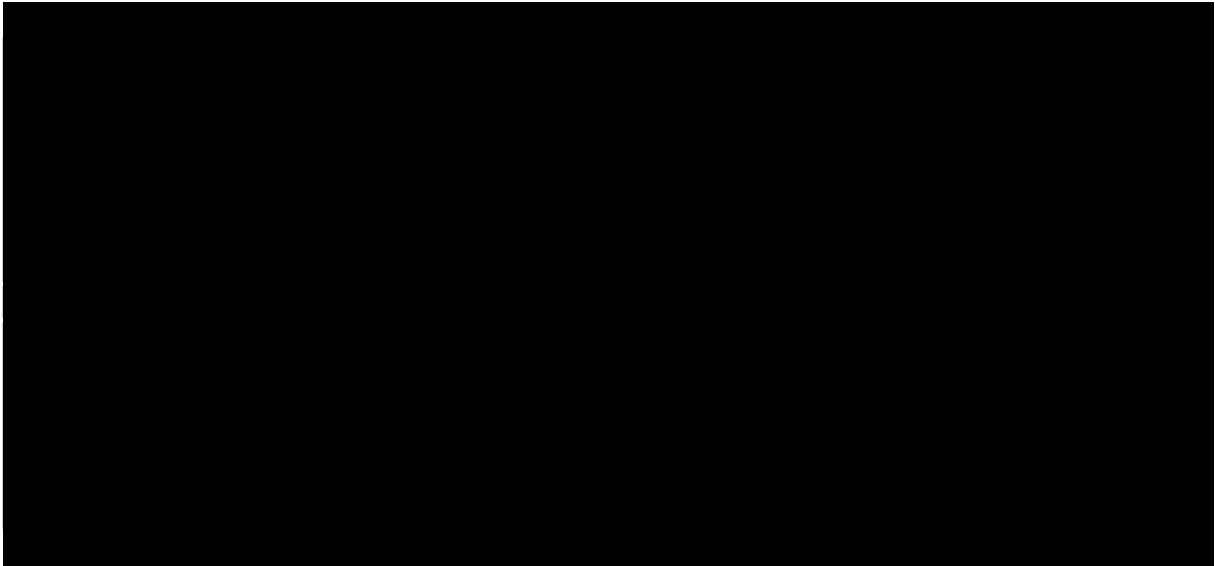
Chitine non séchée

Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

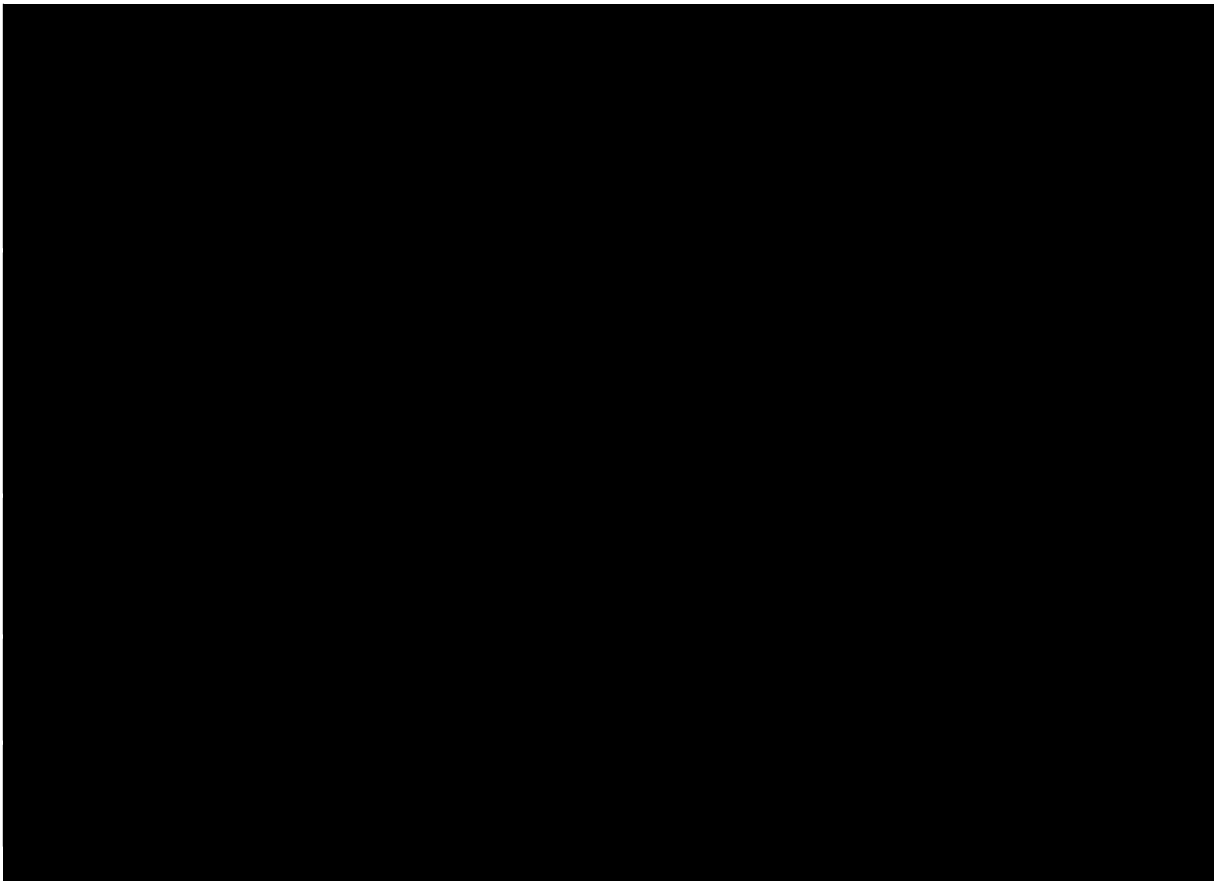
6.8 RÉSULTATS DU DOSAGE ENZYMATIQUE SUR LE SUBSTRAT À TEMPÉRATURE AMBIANTE

Substrat (chitine colloïdale) [%]	0.35
Substrat (chitine séchée) [%]	0.164
Enzyme [%]	0.017
a	0.007
b	0.009

Chitine séchée				Chitine colloïdale			
Essai	Temps [s]	Absorbance [-]	Remarques	Essai	Temps [s]	Absorbance [-]	Remarques
1	3600	0.020	1 ml de substrat, 100 µl d'enzyme, centrifugation.	1	1800	0.134	1 ml de substrat, 100 µl d'enzyme, centrifugation.
2	3600	0.020		2	1800	0.129	
3	3600	0.018		3	1800	0.201	
4	3600	0.021		4	1800	0.110	
Blanc	3600	0.020		5	1800	0.112	
5	1800	0.134	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.	Blanc	1800	0.237	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.
6	1800	0.119		6	5160	0.058	
7	1800	0.100		7	5160	0.060	
8	1800	0.129		8	5160	0.074	
9	1800	0.119		9	5160	0.065	
Blanc	1800	0.015	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.	10	5160	0.065	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.
10	1800	0.067		Blanc	5160	0.096	
11	1800	0.116		11	1800	0.077	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, centrifugation.
12	1800	0.174		12	1800	0.079	
13	1800	0.140		13	1800	0.075	
14	1800	0.128	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, filtration.	14	1800	0.083	
Blanc	1800	0.015		15	1800	0.081	
15	1800	0.009		Blanc	1800	0.100	1 ml de substrat, 500 µl d'enzyme, filtration.
16	1800	0.006		16	1800	0.016	
17	1800	0.005		17	1800	0.014	
18	1800	0.005		18	1800	0.013	
19	1800	0.004		19	1800	0.014	
Blanc	1800	0.009		20	1800	0.014	
				Blanc	1800	0.016	



6.9 RÉSULTATS DU DOSAGE ENZYMATIQUE SUR LE SUBSTRAT À 50°C



Synthèse d'un substrat et mise en place d'une méthode de dosage de l'activité du lysozyme

Essai	Temps [min]	Absorbance [-]	Remarque	Moyenne [mg/l]	Ecart-type [mg/l]	C.V. [%]
22	60	0.094	Enzyme à 2 g/l, après-midi	0.113	0.011	10
23	60	0.108				
24	60	0.115				
25	60	0.117				
26	60	0.118				
27	60	0.128				
28	60	0.101	Enzyme à 1 g/l, après-midi	0.111	0.017	15
29	60	0.107				
30	60	0.113				
31	60	0.100				
32	60	0.100				
33	60	0.143				
34	60	0.116	Enzyme à 0.5 g/l, l'après-midi	0.102	0.011	11
35	60	0.110				
36	60	0.108				
37	60	0.095				
38	60	0.097				
39	60	0.085				
Blanc 1	60	0.053	Tampon	0.060	0.009	15
Blanc 2	60	0.066				
40	60	0.109	Enzyme à 1 g/l	0.119	0.014	12
41	60	0.121				
42	60	0.099				
43	60	0.119				
44	60	0.129				
45	60	0.139				
46	60	0.070	Enzyme à 0.1 g/l	0.077	0.005	7
47	60	0.074				
48	60	0.084				
49	60	0.074				
50	60	0.080				
51	60	0.080				
Blanc 1	60	0.066	Tampon	0.070	0.005	7
Blanc 2	60	0.073				
52	60	0.088	Enzyme à 1 g/l	0.114	0.014	13
53	60	0.115				
54	60	0.120				
55	60	0.110				
56	60	0.130				
57	60	0.122				
58	60	0.076	Enzyme à 0.2 g/l	0.081	0.005	6
59	60	0.081				
60	60	0.087				
61	60	0.076				
62	60	0.084				
63	60	0.084				
Blanc 1	60	0.070	Tampon	0.069	0.001	2
Blanc 2	60	0.068				
Blanc 3	60	0.075				
Blanc 4	60	0.074				
Blanc 5	60	0.072				
Blanc 6	60	0.081				

6.10 MODES OPÉRATOIRES

6.10.1 PRÉPARATION DE LA CHITINE COLORÉE

Broyage

Broyer 10 g de chitine à 1 mm, puis 0.5 mm et enfin 0.25 mm. La tamiser durant 30 minutes à amplitude 2 pour obtenir une granulométrie située entre 200 et 315 μm .

Fabrication de la suspension colloïdale

Mélanger environ 6 % (m/v) de chitine avec de l'acide chlorhydrique concentré et agiter de telle manière à ce que la chitine et l'acide se mélangent lentement (solution très visqueuse au début, qui devient plus liquide peu à peu) durant 45 minutes, précisément.

Précipiter ce mélange en le versant très lentement dans 2 litres d'eau déminéralisée entre 5 et 10 °C. Filtrer avec un léger vide (grand filtre), puis ressuspendre dans 1 litre d'eau déminéralisée et filtrer à nouveau. Le lavage doit être répété jusqu'à ce que le filtrat ait un pH entre 3 et 4.

Coloration de la chitine colloïdale

Peser 0.5 g de chitine colloïdale (poids sec !) dans un ballon 3 cols, puis ajouter 50 ml de solution 1.5 % de dichromate de sodium et 1.5 % de tartrate de potassium. Agiter fortement pour mettre la chitine en suspension. Ajouter 100 ml de solution aqueuse de Remazol Brilliant Blue R 6.6 %. Agiter jusqu'à ce que le bain d'huile soit à 100°C, puis lancer la réaction pour 90 minutes.

Filtrer le mélange à chaud avec léger vide, puis le laver à l'eau déminéralisée à 50°C environ, jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. La chitine colloïdale peut être conservée dans un flacon bien fermé.

6.10.2 DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE L'ACTIVITÉ DU LYSOZYME

Mettre en suspension 0.15 g/l de chitine colorée (poids sec) dans un tampon phosphate 30 mM dont le pH a été ajusté à 7.4 avec du KOH 1 M. Préparer une solution d'enzyme dont la concentration se situe entre 0.2 et 1.0 g/l, toujours dans du tampon phosphate, et juste avant de commencer les mesures. Ces solutions doivent être conservées à 4°C dès qu'elles ne sont plus utilisées.

Préparer 7 tubes eppendorf de 2.5 ml comme suit : pipeter 1 ml de substrat dans chacun d'entre eux, puis 500 μl d'enzyme dans les 6 échantillons, et 500 μl de tampon dans le blanc. Refermer les tubes et agiter. Incuber durant 60 minutes à 50°C.

Pour stopper la réaction, incuber durant 5 minutes à 100°C. Laisser refroidir.

Mesurer l'absorbance des échantillons et du blanc contre le tampon phosphate à 595 nm.