

Plateforme Activité et Criblage Enzymatique (PACE)

Cette plateforme fait partie du service [UCA-PARTNER](https://partner.uca.fr/uca-partner/uca-partner-1) (<https://partner.uca.fr/uca-partner/uca-partner-1>) (Plateformes Assistance à la Recherche, aux Technologies et aux Entreprises) de l'Université Clermont Auvergne.

Pour toute demande de prestations et d'informations, vous pouvez contacter :

Franck Charmantray, Responsable du Service / Franck.Charmantray@uca.fr (<http://iccf.univ-bpclermont.fr/Franck.Charmantray@uca.fr>) Tél. : 04.73.40.76.42

Savoir-Faire :

Cette plateforme permet de gérer de façon automatisée le remplissage de microplaques 96 puits dans le cadre de dosages analytiques de composés et/ou le suivi d'activité enzymatique en parallèle. Sont susceptibles d'être dosés les composés présentant un chromophore, un fluorophore ou un luminophore.

Domaines d'applications :

- Chimie analytique (analyse quantitative)
- Biochimie (enzymologie)

Secteurs d'activités :

Recherche – recherche et développement en biocatalyse, enzymologie et chimie analytique pour les secteurs de la chimie et biologie -santé

Équipements :

- Plateforme de travail EVO® Tecan (bras robotisé, 4 aiguilles (capacité 5 à 950 µL), agitateur de microplaques, cryostat)
- Lecteur de microplaques 96 ou 384 puits Safire II® Tecan
- Centrifugeuse à microplaques Heraeus® Labofuge® 400 R (Thermoscientific)

Prestations :

- Gestion d'une chimiothèque : Conditionner, dupliquer, mixer des microplaques en vue de l'exploitation d'une chimiothèque.
- Préparation d'échantillons avant analyse : Purification d'échantillons par dilution, centrifugation, agitation, aliquotage, filtration sur phase solide.
- Tests chimiques ou enzymatiques : Adaptation d'un protocole établi (ex : kit de dosage enzymatique) au format d'une microplaque 96 puit et lecture en absorbance, fluorescence, luminescence.

Développement méthodologique :

- Recherche et développement de nouveaux tests susceptibles de répondre à une problématique de dosage chimique et/ou enzymatique en partenariat avec le responsable de la plateforme et ceci sous la forme d'une collaboration scientifique. (ex : mise au point d'un nouveau test de criblage fluorescent d'enzyme dans le cadre de la recherche de nouvelles activités).



Exemples d'applications

A – BIODÉGRADATION ET DE PHOTODÉGRADATION DU 2-AMINOBENZOTHIAZOLE PAR DES MICROORGANISMES

- Traitement d'échantillons automatisé :

But :

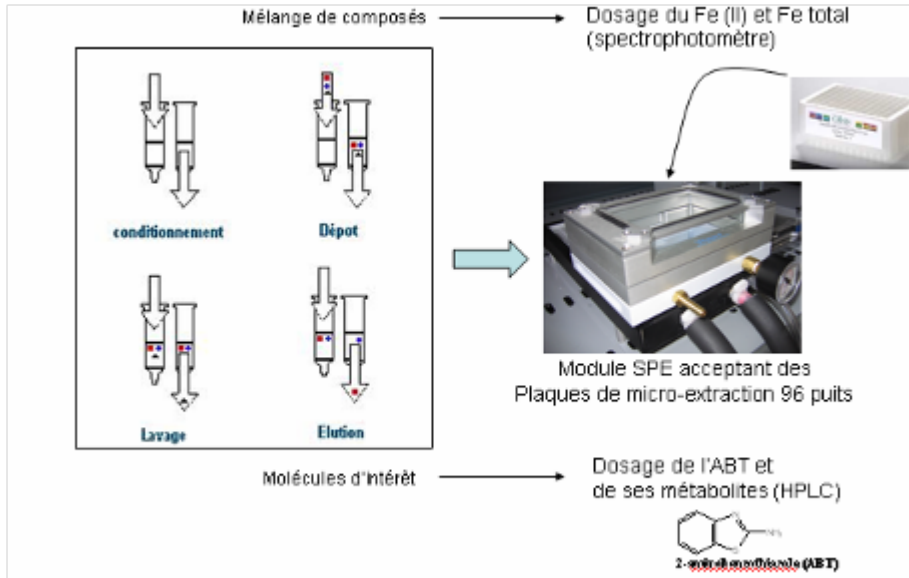
L'analyse des échantillons par HPLC nécessite un traitement préalable. Le protocole développé pour ôter l'alginate sur lequel les souches *Rhodococcus Rhodochrous* sont immobilisées, utilise une phase immobilisée SPE (solid phase extraction). Ce protocole doit être miniaturisé et automatisé.

Intérêts :

Gérer plusieurs dizaines d'échantillon en parallèle. Conditionner les échantillons recueillis en microvial.

Paramètres :

Détermination du Recovery (%) (Qté échantillon recueilli/Qté échantillon déposé). Vérifier l'absence de contamination croisée.



Protocole employé pour la purification de l'ABT et de ses métabolites

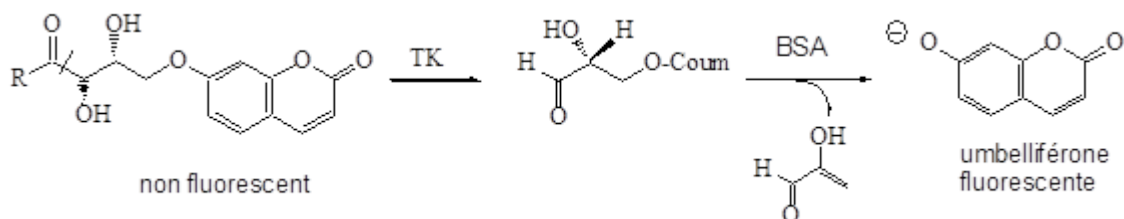
B – TEST DE CRIBLAGE DE TRANSCÉTOLASE PAR FLUORESCENCE

But :

Déterminer la cinétique de la réaction catalysée par l'enzyme transcétolase (TK), grâce au suivi de la fluorescence de l'umbelliférone (molécule fluorescente, abs = 365 nm, émission = 452 nm) au cours du temps.

Intérêts :

La plateforme automatisée permet de réaliser plusieurs expériences en parallèle et à petite échelle en nous assurant d'une grande reproductibilité et d'un débit compatible avec le criblage ultérieur de banque(s) de mutants obtenus par évolution *in vitro*.



Principe du test fluorescent d'activité de TK

Résultats obtenus :

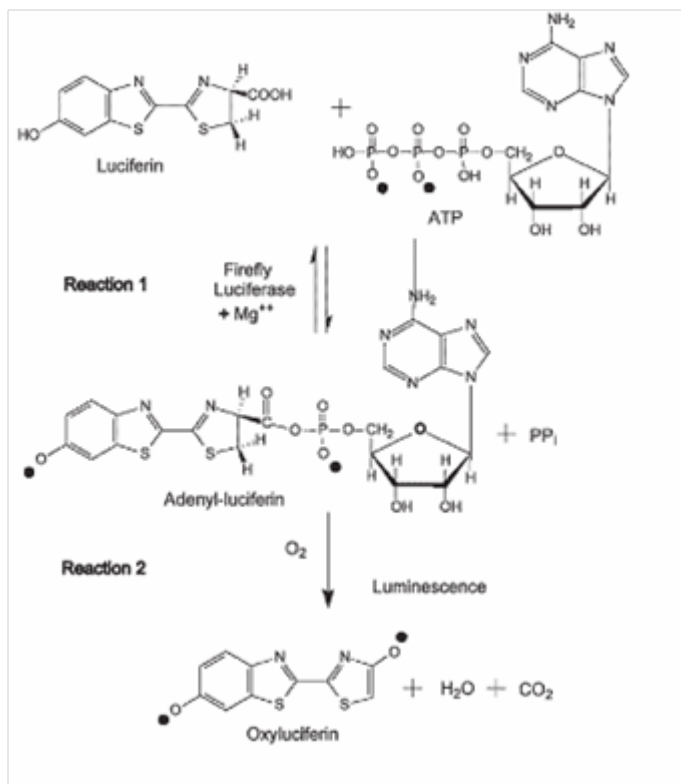
Paramètres statistiques

1. Limites de détection (LOD) et limites de quantification (LOQ), selon les tampons choisis.
2. Rapport Signal/Bruit et quantité minimale de TK détectable.
3. Détermination du Z score (paramètre qui permet d'évaluer la pertinence d'un test de criblage avant son utilisation éventuelle en haut débit, HTS screening).

C – DOSAGE DE L'ATP PAR LA LUCIFÉRIASE/LUCIFÉRINE

But :

Déterminer la concentration en ATP dans une gamme dynamique de 2×10^{-12} à 2×10^{-9} moles/litre grâce à la réaction entre la luciférine et l'ATP, catalysée en présence de luciférase et d'oxygène (voir schéma présenté ci-contre).



Dosage de l'ATP par le couple luciférase/luciférine

Intérêts :

1. Le lecteur Safire® fonctionnant en mode luminescence peut se substituer à un luminomètre.
2. Le coût de l'enzyme luciférase est élevé. En travaillant en microplaques jusqu'à des quantités inférieures à $100 \mu L$, il peut être minimisé.

Résultats :

1. Gamme dynamique de mesure de l'ATP
2. Protocole en macrocuve modifié pour l'utilisation en microplaques

<https://iccf.uca.fr/services/bio-organique/plateforme-de-criblage>(<https://iccf.uca.fr/services/bio-organique/plateforme-de-criblage>)