

# Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

## Diplôme 2011

*Jason Lachat*

*Caractérisation  
du marquage fluorescent  
de protéines*

Professeur Jean-Manuel Segura

Expert Rudolf Hovius

Jason Lachat

|   |
|---|
| Titre / Titel<br><b>Identification de protéines par spectroscopie de corrélation de fluorescence</b>  |
| Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele<br><p>L'identification et le dosage de protéines spécifiques dans des mélanges complexes tels que des fluides biologiques est un objectif majeur en bioanalytique. Actuellement, les protéines — séparées au préalable par chromatographie ou électrophorèse — sont identifiées par spectrométrie de masse. Les méthodes de fluorescence ultrasensibles seraient cependant une alternative extrêmement intéressante car — par leur sensibilité et capacité de miniaturisation — elles rendraient possible de nombreuses nouvelles applications, notamment dans le diagnostic.</p> <p>Ce travail de diplôme a pour but d'explorer la possibilité d'utiliser la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) pour identifier des protéines marquées au préalable par des sondes fluorescentes. En particulier, ce travail cherchera à atteindre les trois objectifs suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>—— l'optimisation de la performance d'un instrument FCS pour la détection de fluorophores de type rhodamine</li> <li>—— le développement d'une procédure robuste et reproductible de marquage des groupes lysine d'une protéine par des fluorophores de type rhodamine</li> <li>—— la démonstration de la possibilité d'obtenir par FCS une série de signaux spécifiques, signature de la protéine, permettant son identification et son dosage.</li> </ul> |

|   |   |
|---|---|
| Délais / Termine  |   |
| Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:<br><b>02.05.2011</b>   | Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:<br><b>02.09.2011</b>            |
| Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de l'école /<br>Ende der Diplomarbeiten in den Labors der Schule:<br><b>15.07.2011</b> | Défense orale / Mündliche Verteidigung:<br><b>dès la semaine 35 / ab Woche 35</b> |
| Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:<br><b>19.08.2011   12h00</b>  |   |
| Signature ou visa / Unterschrift oder Visum   |   |
| Responsable de la filière<br>Leiter des Studiengangs: .....   | <sup>1</sup> Etudiant/Student: .....  |

<sup>1</sup> Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement la directive et 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 Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.



## Travail de diplôme | édition 2011 |

### Filière

*Technologies du vivant*

### Domaine d'application

*Chimie analytique*

### Professeur responsable

*Dr Jean Manuel Segura*

[jmanuel.segura@hevs.ch](mailto:jmanuel.segura@hevs.ch)

### Partenaire

*HES-SO Valais*

# Caractérisation du marquage fluorescent de protéines

Diplômant

Jason Lachat

## Objectif du projet

Comprendre les paramètres influençant la réaction entre un dérivé isothiocyanate d'un fluorophore et une protéine, afin d'obtenir un marquage fluorescent reproductible et défini pour des analyses ultérieures à l'aide de méthodes de fluorescence ultra-sensibles.

## Méthodes | Expériences | Résultats

Comme système modèle, le marquage des résidus lysines du lysozyme par réaction avec le dérivé isothiocyanate du fluorophore fluorescéine (FITC) a été choisi. Les paramètres de réaction ont tout d'abord été optimisés par analyse de la réaction de la lysine pure avec la FITC avant de transposer ces résultats à la réaction avec le lysozyme.

Des analyses en chromatographie sur couche mince (CCM) ont permis le développement d'une méthode de marquage de la lysine en phase aqueuse avec un tampon borate à 0,1 M et à un pH de 9,1 et l'observation d'une réaction quasiment instantanée entre le réactif fluorescent et l'acide aminé.

Ensuite, des résultats obtenus par chromatographie d'exclusion de taille d'une solution composée d'un mélange de lysozyme et de FITC dilués dans du tampon borate après approximativement 1, 3, 6, 23, 98 et 118 minutes de réaction ont mis en évidence une augmentation non linéaire du nombre de lysines marquées du lysozyme au cours du temps. Une cohabitation de plusieurs molécules de lysozyme possédant un nombre différent de lysines marquées à un temps de réaction inférieur à 2h a également été constatée.



## Table des matières

|        |  |    |
|--------|--|----|
| I.     | Introduction .....                               | 2  |
| II.    | Partie expérimentale .....                       | 4  |
| II.1   | Organisation.....                                | 4  |
| II.2   | Produits .....                                   | 5  |
| II.3   | HPLC-DAD .....                                   | 7  |
| II.3.1 | But recherché.....                               | 7  |
| II.3.2 | Matériel et méthode .....                        | 7  |
| II.3.3 | Résultats et discussion .....                    | 8  |
| II.4   | CCM .....  | 11 |
| II.4.1 | But recherché.....                               | 11 |
| II.4.2 | Matériel et méthode .....                        | 11 |
| II.4.3 | Résultats et discussion .....                    | 13 |
| II.5   | Chromatographie d'exclusion de taille (CE) ..... | 17 |
| II.5.1 | But recherché.....                               | 17 |
| II.5.2 | Matériel et méthode .....                        | 17 |
| II.5.3 | Résultats et discussion .....                    | 18 |
| II.6   | Spectrométrie UV-VIS .....                       | 21 |
| II.6.1 | But recherché.....                               | 21 |
| II.6.2 | Matériel et méthode .....                        | 21 |
| II.6.3 | Résultats et discussion .....                    | 22 |
| II.7   | Contrôles de stabilité .....                     | 25 |
| II.7.1 | pH.....  | 25 |
| II.7.2 | Stabilité de la fluorescence .....               | 26 |
| III.   | Conclusion et perspectives.....                  | 27 |
| IV.    | Bibliographie.....                               | 29 |
| V.     | Annexes .....                                    | 31 |



## I. Introduction

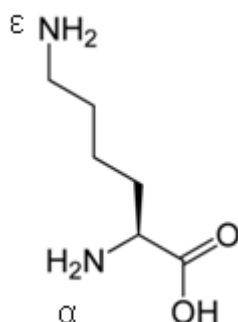
Les protéines contenues dans une matrice biologique (salive, sang, sperme, etc...) sont souvent séparés par des méthodes chromatographiques puis identifiées par spectromètre de masse. (1) Le développement d'une méthode ultrasensible permettant de réduire la quantité de fluide biologique prélevé sur les patients pour des diagnostics médicaux serait extrêmement intéressant. La spectroscopie de corrélation de fluorescence pourrait être une alternative aux appareils analytiques employés aujourd'hui. Cependant, le développement de cette méthode analytique nécessite une étude minutieuse des marquages fluorescents afin de pouvoir établir une base de données précise, reproductible et fiable permettant l'identification d'un grand nombre de protéines dans une large gamme de matrices. (2)

Le marquage fluorescent de protéines est une technique employée permettant entre autres l'observation des mouvements dynamiques ainsi que l'interaction des protéines à l'intérieur des cellules vivantes. (3) (4) Malgré l'étude de certains travaux sur les modifications photo physiques des marquages entre la BSA et la fluorescéine isothiocyanate (FITC) en fonction des différents ratios de concentrations des deux réactifs (5), aucune documentation recherchée ne fait part d'études approfondies concernant l'évolution du marquage fluorescent d'une protéine dans le temps.

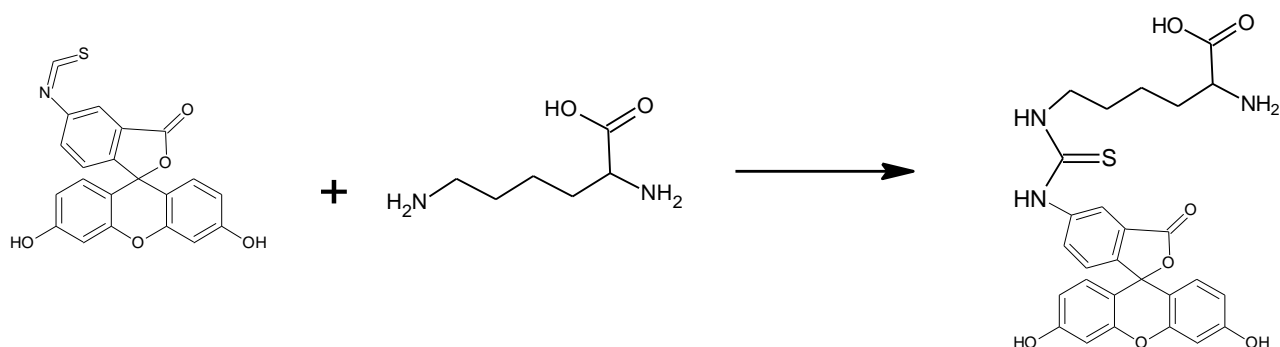
La compréhension de l'évolution de la réaction entre un composé isothiocyanate d'un fluorophore et une protéine en fonction du temps de réaction par le biais d'études des conditions opératoires est le premier pas vers le développement d'une méthode analytique fiable.



Un système modèle, le marquage des résidus lysines du lysozyme par réaction avec le dérivé isothiocyanate du fluorophore fluorescéine (FITC) a été choisi. Le lysozyme employé est extrait à partir de blanc d'œufs, possède un total de 6 acides aminés lysines et son poids moléculaire est de 14.388 kDa. (6) La FITC (389.38 g/mol) (7) se lie avec les amines  $\epsilon$  de la lysine (figure 1) en respectant le schéma réactionnel suivant (figure 2).



**Figure 1** : L-lysine



**Figure 2** : Réaction de marquage de la lysine avec la fonction isothiocyanate de la FITC en milieu aqueux.



## II. Partie expérimentale

### II.1 Organisation

De nombreux résultats analytiques exploitables, mais également une certaine quantité d'expériences infructueuses ont été accumulées durant ce travail. Par souci de pertinence seuls les résultats aboutis ont été mentionnés et expliqués.

Les expériences en laboratoire ont été menées au bâtiment F de la HES-SO de Sion du 2 juin au 15 juillet 2011 (douze semaines) avec un arrêt de deux semaines au mois de juin. L'horaire de travail était libre et il était obligatoire de respecter les jours fériés et les week-ends. Il a été possible de travailler sur tous les appareils analytiques présents dans les divers laboratoires avec l'autorisation des assistants y étant responsable. Le travail pratique a principalement été effectué durant 3 semaines sur HPLC-DAD pour la mise en place d'une méthode analytique permettant un marquage du lysozyme avec la rhodamine B isothiocyanate et sa caractérisation, puis durant 3 semaines sur les observations des paramètres influençant les réactions entre la fonction isothiocyanate de la fluorescéine isothiocyanate avec de la lysine pure en chromatographie sur couche mince, les 4 dernières semaines ont été consacrées à l'étude du marquage dans le temps par séparation en chromatographie d'exclusion de taille et le dosage des fractions marquées par méthode spectroscopique dans le domaine visible.



## II.2 Produits

Toutes les préparations de solutions, respectivement d'échantillons ont été mesurés avec la verrerie standard de laboratoire, les pesées ont été réalisées sur une balance analytique : PM 2000 +/- 0.01 g, Mettler.

L'agitateur Thermomixer Comfort Eppendorf a été employé pour certains essais de mixage longue durée. Tandis que les mentions dans le texte de « vortexage » font référence au sigma vortex Genie 2.

Ci-dessous sont classés par ordre alphabétique les produits qui ont été employés durant ce travail de diplôme.





**Tableau 1** : Récapitulatif de tous les composés employés dans la partie expérimentale, les symboles signifient corrosif (C), toxique (T), nocif (Xn), irritant (Xi), inflammable (F), extrêmement inflammable (F+).

| Substance                                    | Provenance           | Risque               | Sécurité           | Symbole | Pureté      |
|--|----------------------|----------------------|--------------------|---------|-------------|
| acide acétique                               | Sigma-Aldrich A6283  | 10-35                | 23-26-45           | C       | ≥99%        |
| acide borique                                | Sigma B7901          | 60-61                | 53-45              | T       | 99.5%       |
| acide phosphorique                           | Fluka 64957          | 34                   | 26-45              | C       | ≥85%        |
| bleu de coomassie G-250                      | Sigma-Aldrich B0770  | -                    | 22-24/25           | -       | pur         |
| butanol                                      | Fluka 19422          | 10-22-37/38-41-67    | 13-26-37/39-46-7/9 | Xn      | ≥99.9%      |
| carbonate de sodium monohydraté              | Sigma-Aldrich S4132  | 36                   | 26                 | Xi      | ≥99.5%      |
| chlorure de potassium                        | Sigma P5405          | -                    | -                  | -       | ≥99.0%      |
| dihydrogénophosphate de potassium            | Fluka 60216          | -                    | -                  | -       | ≥99.995%    |
| éthanol puriss                               | Fluka 02860          | 11                   | 7-16               | F       | ≥99.8%      |
| Fluorescéine 5(6)-isothiocyanate             | Fluka 46950          | 42                   | 22                 | Xn      | ≥90%        |
| hydrogénocarbonate de sodium                 | Sigma-Aldrich S6014  | -                    | -                  | -       | 99.7-100.3% |
| hydrogénophosphate de sodium                 | Fluka 71629          | -                    | -                  | -       | 99.999%     |
| hydroxyde de sodium                          | Sigma-Aldrich 306576 | 35                   | 26-37/39-45        | C       | 99.99%      |
| L-alanine                                    | Sigma A7627          | -                    | -                  | -       | ≥98%        |
| L-lysine                                     | Aldrich 62840        | -                    | -                  | -       | ≥98.0%      |
| lysozyme lyophilisé, blanc d'œuf             | Sigma-Aldrich L6876  | -                    | 22-24/25           | -       | ≥90%        |
| méthylamine                                  | Fluka 65572          | 12-20-37/38-41       | 16-26-29           | F+,Xn   | ≥99.0%      |
| ninhydrine                                   | Fluka 33437          | 22-36/37/38          | 26                 | Xn      | ≥99%        |
| rhodamine B isothiocyanate (isomères mixtes) | Sigma-Aldrich 283924 | 20/21/22-36/37/38-42 | 22-26-45           | Xn      | 90%         |

Les explications détaillées des phrases de risque (R) et sécurité (S) se trouvent à l'annexe I et II.



## II.3 HPLC-DAD

### II.3.1 But recherché

Créer une méthode permettant la séparation des composés résultant du marquage entre la rhodamine B et le lysozyme. Puis réaliser un rapport des surfaces des composés séparés dans les domaines visible et UV, afin de quantifier leurs teneurs en protéines et composé fluorescent dans le but de réaliser un ratio molaire entre rhodamine B et le lysozyme, permettant une caractérisation du nombre de lysines marquées. NB : la rhodamine B isothiocyanate réagit comme la FITC (figure 2).

### II.3.2 Matériel et méthode

Les préparations suivantes ont été faites :

- solution n°1 : 0,73 mg de rhodamine B isothiocyanate a été pesée et diluée dans un ballon jaugé de 25,0 ml avec de l'eau mili Q.
- tampon n°1 : 803,0 mg d'hydrogénocarbonate de sodium et 50,3 mg de carbonate de sodium monohydraté ont été pesés et dilués dans un ballon jaugé de 100,0 ml avec de l'eau mili Q. Le pH mesuré à 20°C est de 8,8.
- essai de marquage n°1 : 5,17 mg de lysozyme et 2,16 mg de rhodamine B isothiocyanate ont été pesés et dilués avec 1,0 ml de tampon n°1 puis agité à 1000 RPM durant deux heures à température ambiante.
- standard n°1 : 4,06 mg de lysozyme ont été pesé et dilués dans 1,0 ml d'eau mili Q.
- standard n°2 : 10,35 mg de rhodamine B isothiocyanate ont été pesés et dilués dans un ballon jaugé de 5,0 ml avec de l'eau mili Q.

Les analyses réalisées en chromatographies liquide à haute pression ont été effectuées sur un appareil HPLC 1100 Series, Hewlett Packard. Chaque injection de 10,0 µl a été éluée à un débit de 1,0 ml avec un gradient d'acétonitrile – eau mili Q (tableau 2) sur une colonne CC 125/3 nucleosil 100-5 C8 ec. Les divers composés séparés ont été détectés avec un DAD serie 1100 HP à 555 et 280 nm.

**Tableau 2 :** Gradient HPLC de polarité décroissante.

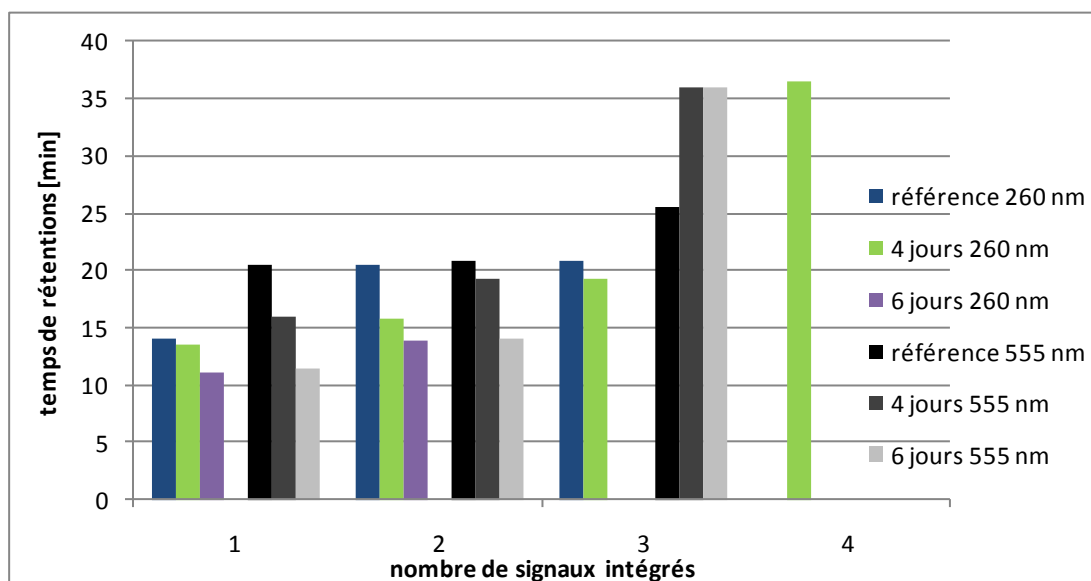
| temps<br>[min] | H <sub>2</sub> O [%] | ACN [%] |
|----------------|----------------------|---------|
| 0              | 80                   | 20      |
| 30             | 30                   | 70      |
| 35             | 15                   | 85      |

### II.3.3 Résultats et discussion

Dans un premier temps, seule de la rhodamine B isothiocyanate a été disponible. Un balayage spectral de 200 à 800 nm de la solution n°1 a été réalisé en spectroscopie UV-VIS afin de déterminer le lambda maximal d'absorption du fluorophore dans le domaine visible, permettant de fixer la longueur d'onde du détecteur DAD de l'HPLC. La longueur d'onde optimale a été mesurée à 555 nm [annexe III].

Un essai de marquage du lysozyme avec la rhodamine B isothiocyanate a été effectué selon un protocole reçu. (8) Le chromatogramme de cet essai [annexe IV] présente 3 pics dans le domaine visible et 3 dans le domaine UV. Cependant le pic sortant à 14,1 minutes n'est détecté qu'à 260 nm, ce qui laisse penser qu'il puisse s'agir du lysozyme non marqué. Il a été supposé que le chevauchement de deux composés détecté à approximativement 20 minutes soit les deux isomères de la rhodamine B isothiocyanate. La substance observée à 25,6 minutes à 555 nm est un marquage réussi de la protéine.

La figure 3 découle directement des injections du marquage n°1 après 0, 4 et 6 jours de réaction à température ambiante à l'abri de la lumière. [annexes V ; VI].



**Figure 3:** Représentation graphique de la diminution des temps de rétentions ainsi que de l'instabilité de la réaction à 260 et 555 nm en fonction du temps sur le marquage n°1.

Sont représentés ci-dessus les résultats des 3 analyses de l'essai de marquage n°1, les colonnes nommées « référence » sont la condensation des données obtenues après l'injection du marquage n°1, le jour même de sa préparation. L'axe des abscisses représente la numérotation des pics dans l'ordre de leur apparition sur le chromatogramme.

Une analyse de l'histogramme permet de mettre en valeur divers paramètres influencés par le temps de réaction :

1. Dans le domaine UV à 260 nm.
  - a) La comparaison de la référence avec l'essai après 4 jours de réaction a démontré une augmentation du nombre de signaux de 3 à 4. Deux jours de réaction supplémentaires et les deux signaux possédant les temps de rétention les plus grands ont disparu.
  - b) Des « cascades » ont été observées sur le graphique pour les pics 1, 2, et 3, démontrant la décroissance des temps de rétention des composés dans le temps.



## 2. Dans le domaine visible à 555nm.

- a) Les temps de rétentions décroissent avec le temps pour les pics 1 et 2, en revanche le temps de rétention du 3<sup>ème</sup> pic a augmenté entre l'injection référence et celle après 4 jours de réaction, mesuré à 36 minutes après 6 jours de réaction.

Ces observations tendent à démontrer que la polarité des diverses molécules présentent dans le mélange a augmenté avec le temps, fait significatif d'une réaction continue. L'instabilité du marquage a été démontrée par l'apparition-disparition de signaux. Cette théorie a pu être illustrée par la comparaison à 6 jours du pic 2 à 555 nm auquel aurait dû correspondre le pic 3 en UV qui n'a pas été détecté.. Cette constatation appuie le fait que le marquage s'est effectué avec des changements de composition dans le temps.

Des essais d'optimisation de séparation ont été faits à divers pH et l'éluant aqueux a été remplacé par le tampon n°1. Durant l'analyse, la pression dans la colonne a brusquement chuté, problème causé par une précipitation du tampon carbonate à une teneur volumique en acétonitrile de 70% dans la phase mobile.

L'injection du standard n°1, a donné un faible signal à 555 nm. La détection dans le domaine visible ainsi que le faible signal obtenu pour le lysozyme sont significatifs d'une absorption de la rhodamine B isothiocyanate sur la colonne, mettant en évidence l'inadaptation de la méthode HPLC avec la colonne utilisée pour le marquage du lysozyme avec la rhodamine B isothiocyanate. Une recherche de colonne adaptée au travail réalisé a démontré des colonnes existantes pouvant donner des résultats convaincants, telle la ProSwift RP-2H de Dionex (9). Cet article ne se trouvant pas au laboratoire, ni aucun autre possédant les même propriétés, il a été décidé de poursuivre l'étude du marquage sur les lysines du lysozyme par chromatographie sur couche mince.



## II.4 CCM

### II.4.1 But recherché

La visualisation de la problématique du marquage évoluant dans le temps a été soulevée grâce aux analyses HPLC, il a été compris que l'objectif initialement voulu était irréalisable dans un laps de temps de deux mois, notamment à cause des problèmes d'absorption du marqueur sur la phase stationnaire. La méthode de chromatographie sur couche mince a été choisie car elle permet d'étudier l'influence des paramètres de température, concentration, pH et temps de réaction de la réaction de marquage de manière qualitative.

NB : Pour la suite des analyses, la rhodamine B isothiocyanate a été remplacée par la fluorescéine isothiocyanate (FITC) aux propriétés de marquages similaires. Ce choix a été motivé par la différence de prix entre ces deux composés, qui se trouve être approximativement 60% moins cher pour la FITC. (10) (11).

### II.4.2 Matériel et méthode

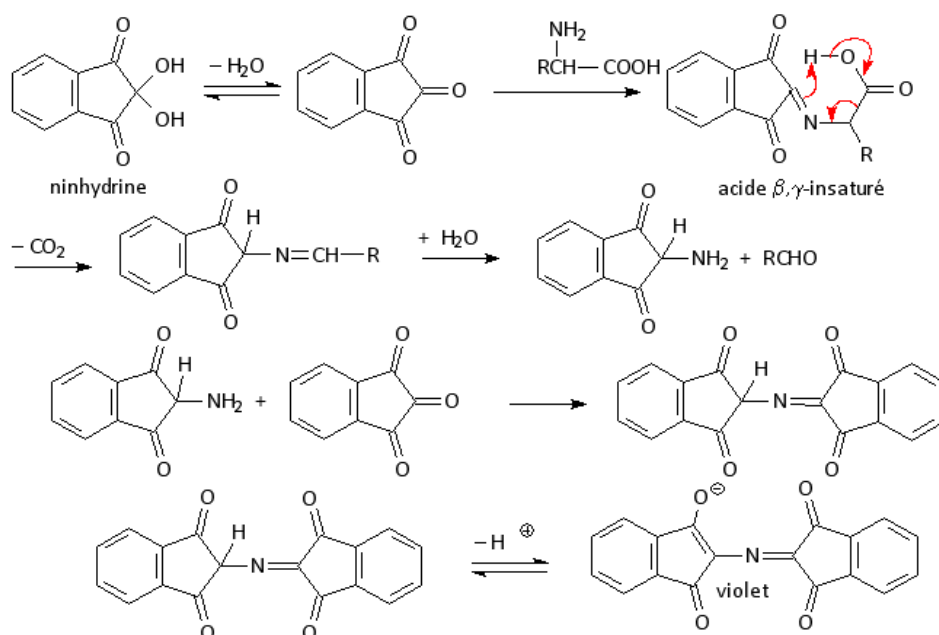
Les préparations suivantes ont été faites :

- solution d'éluion : 10,0 ml d'acide acétique ont été ajoutés à 40,0 ml de butanol dans un erlenmeyer de 100 ml.
- révélateur : 10,0 ml d'acide acétique ont été ajoutés à 40, 0 ml d'éthanol et 100 mg de ninhydrine y ont été solubilisé dans un erlenmeyer de 100 ml.
- standard n°3 : 116 mg de lysine ont été pesé et dilués dans un ballon jaugé de 100,0 ml avec de l'eau déminéralisée.
- tampon n°2 : 1,816 g d'hydrogénocarbonate de sodium et 427 mg de carbonate de sodium monohydraté ont été pesés et dilués dans un ballon jaugé de 250,0 ml avec de l'eau mili Q. le pH mesuré à 20°C est de 10,5.
- tampon n°3 : 1,406 g d'hydrogénocarbonate de sodium et 1,07 g de carbonate de sodium monohydraté ont été pesés et dilués dans un ballon jaugé de 100,0 ml avec de l'eau mili Q. le pH mesuré à 20°C est de 10,0.



- tampon n°4 : 0,835 g d'hydrogénocarbonate de sodium et 5,9 mg de carbonate de sodium monohydraté ont été pesés et dilués dans un ballon jaugé de 100,0 ml avec de l'eau milli Q. Le pH mesuré à 20°C est de 8,3.
- tampon n°5 : 173,9 mg d'hydroxyde de sodium et 623,2 mg d'acide borique ont été pesés et solubilisés dans un ballon jaugé de 200,0 ml avec de l'eau déminéralisée. Le pH mesuré à 20°C est de 9,1.
- standard n°4.1 ; 20,23 mg de FITC ont été pesés et dilués dans 20,0 ml de tampon n°2.
- standard n°4.2 ; 21,50 mg de FITC ont été pesés et dilués dans 20,0 ml de tampon n°3.
- standard n°4.3 ; 19,71 mg de FITC ont été pesés et dilués dans 20,0 ml de tampon n°4.

Des plaques CCM, gel de silice 60 Å ont été employées pour les analyses en chromatographies sur couche mince. Des micropipettes de 4 µl ont été utilisées pour déposer les solutions sur les plaques qui ont été éluées avec la solution d'élution dans une cuve en verre. La révélation (figure 4) des acides aminés, telle la lysine s'est effectuée par trempage de la plaque dans le révélateur et ensuite séché et chauffé au foehn 1600 W durant 5 minutes. Les divers marquages entre la lysine et la FITC ont été révélés aux UV 366 nm.



**Figure 4 :** Schéma réactionnel du révélateur ninhydrine avec un acide aminé.

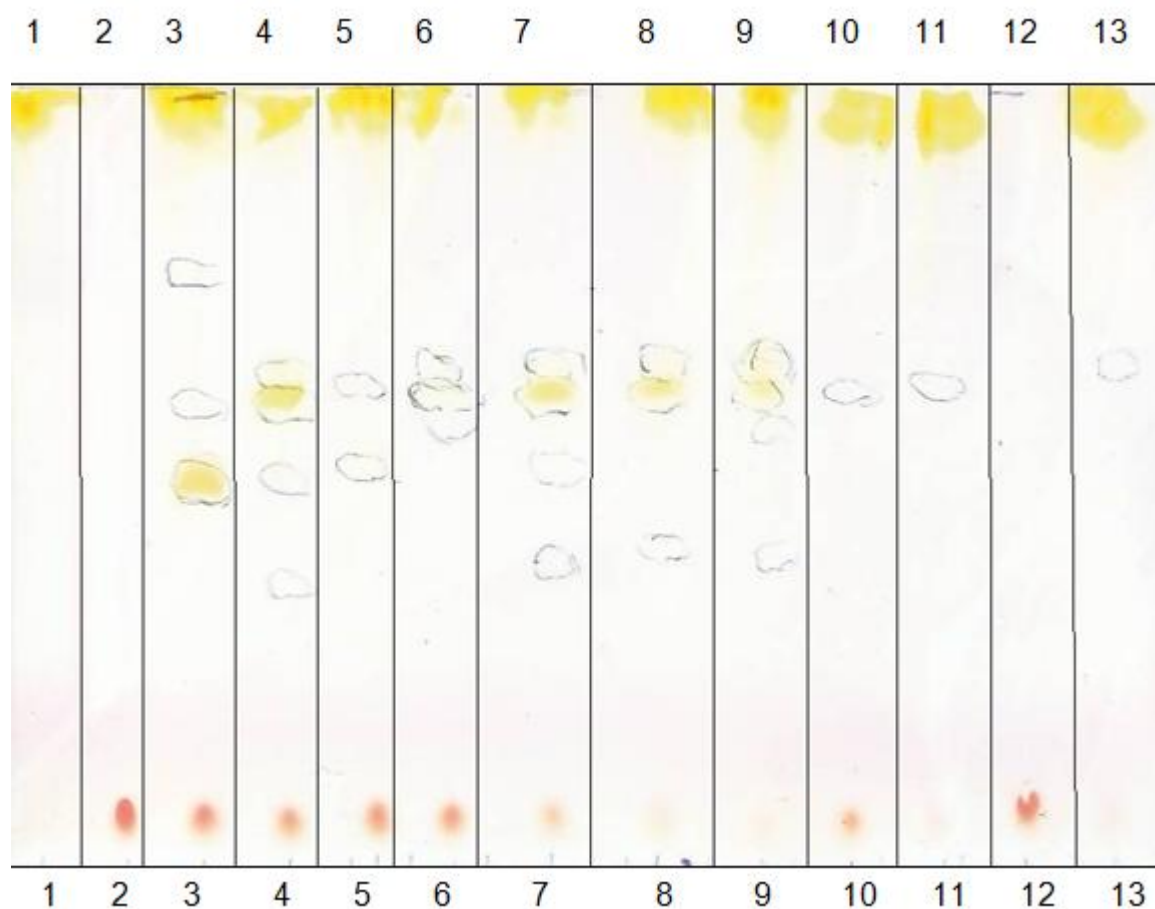
#### II.4.3 Résultats et discussion

Les essais ont portés sur l'étude du pH, le rapport FITC-lysine et la température, les résultats de la plaque CCM (figure 5) sont présentés dans les tableaux 3 et 4.

**Tableau 3 :** Récapitulatif des essais préparés pour la plaque CCM n°1.

| essai n° | Préparation   |
|----------|---|
| 1        | contrôle négatif FITC pH 8,8  |
| 2        | contrôle négatif lysine   |
| 3        | exposition UV 254 nm durant 24 h  |
| 4        | chauffage 37°C 1 heure, tampon carbonate pH 8,3; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 0,3$  |
| 5        | chauffage 37°C 1 heure, tampon carbonate pH 8,8; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 0,3$  |
| 6        | chauffage 37°C 1 heure, tampon carbonate pH 10,0; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 0,3$ |
| 7        | tampon carbonate pH 8,3 vortexage 30 s; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 0,6$           |
| 8        | tampon carbonate pH 8,3 vortexage 30 s; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 1,6$           |
| 9        | tampon carbonate pH 8,3 vortexage 30 s; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 3,2$           |
| 10       | tampon carbonate pH 10,0, vortexage 30 s; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 0,6$         |
| 11       | tampon carbonate pH 10,0, vortexage 30 s; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 1,6$         |
| 12       | contrôle négatif lysine   |
| 13       | tampon carbonate pH 10,0, vortexage 30 s; $n(\text{FITC})/n(\text{lysine}) = 3,2$         |

Le tableau 4 est le regroupement des Rf de la plaque CCM n°1 représentée ci-dessous :



**Figure 5** ; Plaque CCM n°1, les points sont de bas en haut : lysine (points violets), marquages divers (cercles noirs), FITC (points supérieurs jaunes).

**Tableau 4 :** Rf des différents points visibles et révélés par solution de ninhydrine et/ou lampe UV 366 nm, les cellules colorées en violet représentent la lysine, les jaunes clair la FITC et les bleues sont les points dont le marquage est visible à l'œil nu sur la plaque CCM.

| essai n° | points [Rf] |      |      |      |      |     |
|----------|-------------|------|------|------|------|-----|
|          | 1           | 2    | 3    | 4    | 5    | 6   |
| 1        | 1,0         |      |      |      |      |     |
| 2        | 0,1         |      |      |      |      |     |
| 3        | 0,1         | 0,49 | 0,59 | 0,76 | 1,0  |     |
| 4        | 0,1         | 0,37 | 0,50 | 0,59 | 0,63 | 1,0 |
| 5        | 0,1         | 0,51 | 0,60 | 1,0  |      |     |
| 6        | 0,1         | 0,57 | 0,60 | 0,65 | 1,0  |     |
| 7        | 0,1         | 0,40 | 0,51 | 0,60 | 0,6  | 1,0 |
| 8        | 0,1         | 0,43 | 0,60 | 0,65 | 1,0  |     |
| 9        | 0,1         | 0,40 | 0,56 | 0,60 | 0,65 | 1,0 |
| 10       | 0,1         | 0,62 | 0,9  |      |      |     |
| 11       | 0,1         | 0,62 | 0,9  |      |      |     |
| 12       | 0,1         |      |      |      |      |     |
| 13       | 0,1         | 0,63 | 1,0  |      |      |     |

Les observations suivantes ont été faites :

### 1. pH

Les comparaisons entre les essais 7-10 ; 8-11 ; 9-13 démontrent une influence du pH. Les résultats à pH de 8,3 possèdent un marquage jaune (figure 5) tandis qu'à un pH de 10,0 il en est exempt, de plus la quantité de composés détectés aux UV 366 nm est grande pour un pH bas tandis qu'à un pH de 10,0 seul une tâche a été révélée. La comparaison des essais 4-5-6 appuie les observations effectuées précédemment.

### 2. concentration

Les essais 7-8-9 et 10-11-13 mettent en valeur la nécessité d'avoir un excès molaire de FITC afin de faire réagir la totalité de la lysine. La plaque CCM montre une diminution progressive de l'intensité des points violets de lysine jusqu'à une quasi disparition de l'acide aminé avec trois fois l'équivalence molaire de FITC.



### 3. température

Les essais 4 et 7 ont une concentration de lysine ainsi qu'une durée et température de réaction différente, mais présentent des résultats identiques, signifiant qu'un chauffage à 37°C n'est pas nécessaire pour que la réaction fonctionne. En revanche l'essai 10 présente 2 composés de moins révélés à la lampe UV que l'essai 6, ceci étant probablement dû à la plus faible concentration en FITC de l'essai 10.

### 4. UV

L'essai n°3 présente un point orangé, visible avant l'ajout de ninhydrine, significatif d'une présence de FITC, à un Rf de 0,49 alors que les composés colorés des autres essais ont des Rf compris entre 0,59 et 0,60. Il est impossible de dire si la différence d'élution des composés de cet essai provient uniquement du temps de réaction ou si l'effet des UV est également un facteur modifiant le marquage.

### 5. nombre de marquages

Le nombre de marquage par essai est intéressant car il ne devrait pas être supérieur à 3, étant donné que la FITC possède les isomères 5-6 isothiocyanate et que le produit employé est de la L-lysine. Soit 1 marquage avec l'isomère en position 5 et un autre avec celui en position 6. Le dernier marquage pourrait être 2 groupes lysines sur 1 molécule de FITC, dans le cas où le fluorophore posséderait les deux fonctions isothiocyanate. Cependant les essais 4, 7 et 9 montrent 4 marquages. Deux théories sont possibles : soit la FITC réagit également sur l'amine primaire de la lysine, soit la diffusion de la fluorescéine sur la phase stationnaire (visible à 366 nm par des bandes) induit en erreur quant au dénombrement des tâches avec la lampe UV. La première théorie est appuyée par le fait que le révélateur ninhydrine n'a pas mis en évidence les lysines marquées, en effet si seules les fonctions amines ε de l'acide aminé réagissent, la ninhydrine devrait réagir avec la lysine selon la figure 4.

Des tests de réactivité entre l'alanine, acide aminé à 3 carbones (12), et la FITC ont été réalisés dans le but de tester la réactivité entre une amine en position α d'un acide aminé et un groupe isothiocyanate. Des analyses parallèles entre la méthylamine et le marqueur fluorescent ont prouvé la réussite du marquage d'une amine primaire, en revanche aucune réactivité entre l'acide aminé et la FITC n'a été observée. Ce dernier constat permet d'écarter l'hypothèse selon laquelle la FITC réagissait également sur l'amine en position α de la lysine et appuie la théorie d'une diffusion de la FITC sur le gel de silice. Il est probable que l'encombrement stérique provoqué par le marquage des lysines empêche la ninhydrine de réagir avec l'acide aminé.

Le tampon n°5 a été préparé afin de vérifier si le faible marquage de la lysine au pH 8,8 n'était pas dû à l'éloignement du pH du tampon carbonate avec son pKa, limitant son

effet tampon. (13) Les résultats ont montré un marquage réussi, comparable à l'essai n°8. La recherche de littérature a démontré que le tampon borate à un pH de 9,1 était utilisé pour les marquages de la FITC avec le lysozyme (14)

## II.5 Chromatographie d'exclusion de taille (CE)

### II.5.1 But recherché

Déterminer l'évolution du marquage et quantifier le taux de lysines ayant réagit avec la FITC dans le temps.

### II.5.2 Matériel et méthode

Les préparations suivantes ont été faites :

- standard n°5 : 13,4 mg de lysozyme ont été pesés et dilués dans un ballon jaugé de 10,0 ml avec le tampon n°5.
- standard n°6 : 3,5 mg de FITC ont été pesés et dilués dans un ballon jaugé de 10,0 ml avec le tampon n°5.
- marquage final : 500 µl de standard n°6 ont été ajouté au même volume de standard n°5, à ce moment précis le chronomètre a été démarré et le mélange a été vortexé durant 3 secondes, puis l'échantillon a réagit à température ambiante jusqu'à la fin du chronométrage.

Des injections de 470 µl sur une colonne Superdex 200 10/300 GL montée sur un Akta explorer 100, Amersham Pharmacia biotech, GE Healthcare ont été éluées avec le tampon n°5 fraîchement préparé à un débit de 1,0 ml/min et ont permis la séparation des analytes en 45 minutes. Les fractions des composés séparés de 1,5 ml ont été récoltées et conservées à l'abri de la lumière à 4°C.



### II.5.3 Résultats et discussion

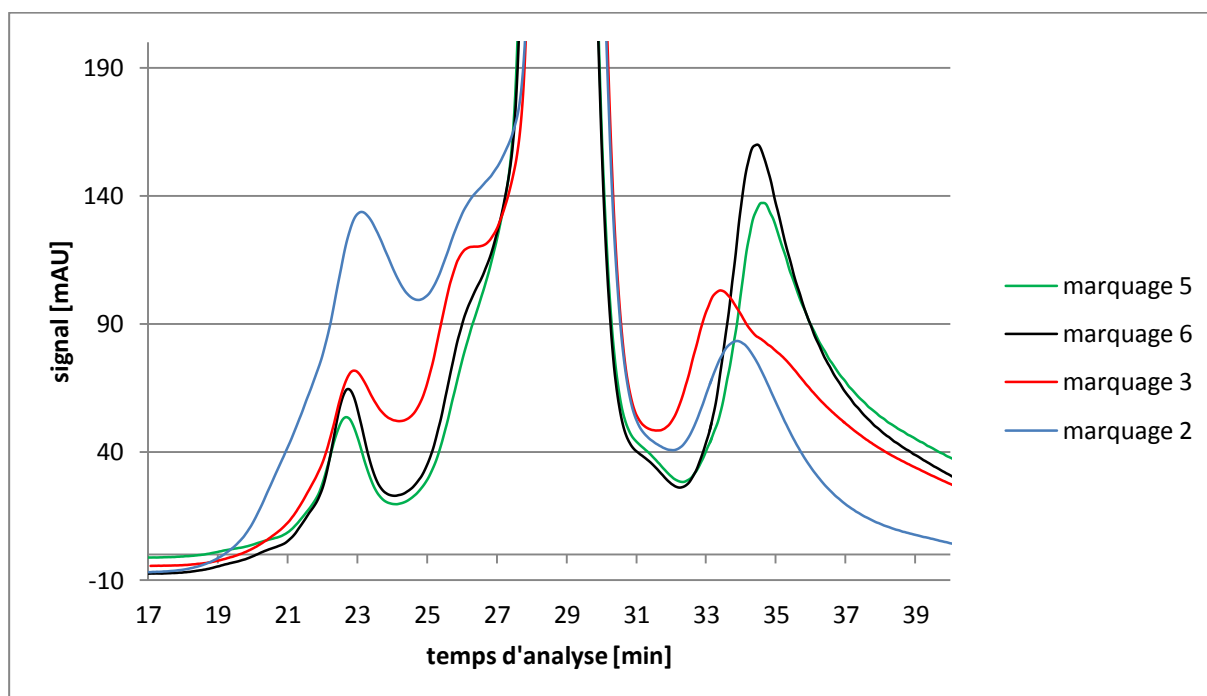
Afin de vérifier la validité de la méthode et d'en optimiser les paramètres, plusieurs injections d'essais de marquages ont été nécessaires. Des solutions standard de lysozyme et FITC ont été analysées, leurs temps de rétention respectifs sont de  $32,4 \pm 0,3$  minutes pour la protéine et  $23,1 \pm 0,1$  ;  $28,7 \pm 0,2$  minutes pour la FITC [annexe VII]. L'étape suivante a été de déterminer les concentrations optimales de lysozyme-FITC pouvant être employés, permettant une analyse quantitative des fractions obtenues après la séparation chromatographique. Le marquage final cité dans la partie II.5.2 a été déterminé comme étant optimal.

La prochaine étape a été l'étude de l'évolution des marquages en fonction du temps de réaction, les tests effectués sont présentés dans le tableau suivant.

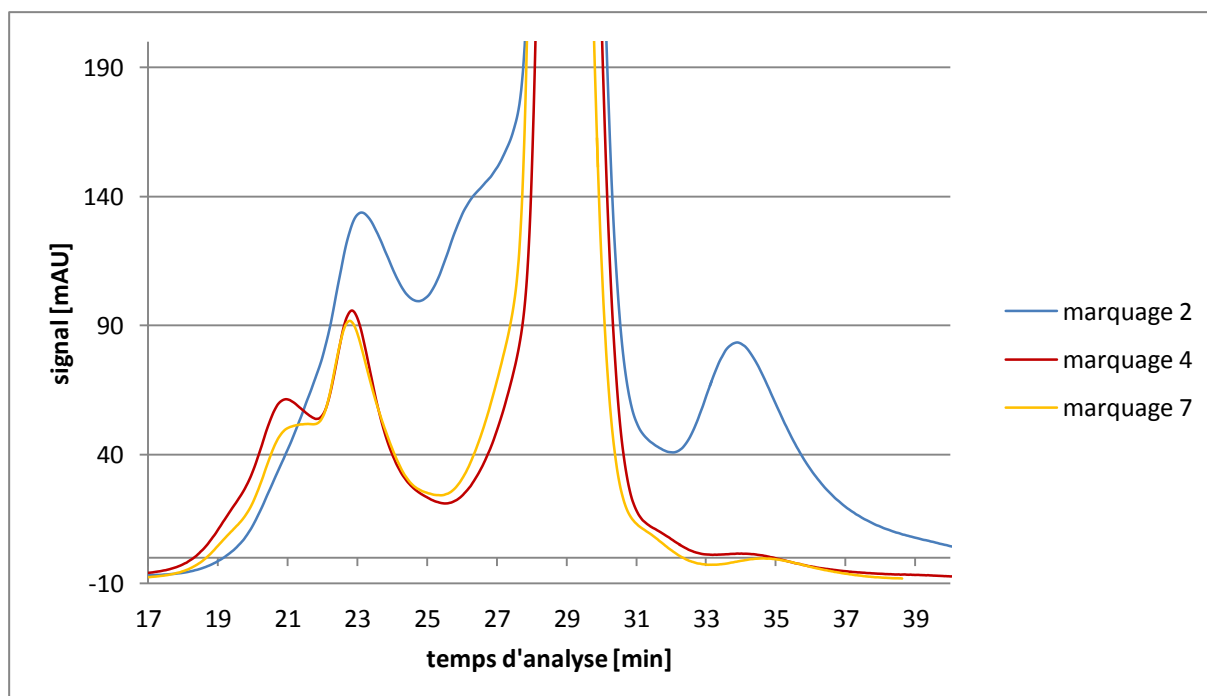
**Tableau 5 :** Différentes injections du marquage final en fonction des temps de réactions.

| marquage n° | temps de réaction [min] | Remarques  |
|-------------|-------------------------|--|
| 1           | -                       | -  |
| 2           | 22m 56s                 |  |
| 3           | 6m 15s                  |  |
| 4           | 1h 38m                  | filtration à 0,45 µm dû à la formation d'un trouble dans la solution |
| 5           | 1m 17s                  |  |
| 6           | 2m 54s                  |  |
| 7           | 1h58m                   | filtration à 0,45 µm dû à la formation d'un trouble dans la solution |

A l'exception du marquage n°1 qui a été écarté à cause d'une erreur de chronométrage, tous les marquages ont été réussis [ex : annexe VIII] et leur superposition permet de visualiser l'évolution de la réaction dans le temps (figures 6 et 7).



**Figure 6 :** Superposition des signaux obtenus à 215 nm après séparation en CE des marquages 5, 6, 3, 2 (dans l'ordre croissant des temps de réaction).



**Figure 7 :** Superposition des signaux obtenus à 215 nm après séparation en CE des marquages 2, 4, 7 (dans l'ordre croissant de temps de réaction).

Les figures 6 et 7 mettent en valeur l'augmentation du poids moléculaire du lysozyme, traduit par une diminution des temps de rétention de la protéine. Le tableau suivant permet une interprétation des graphiques en fonction des temps d'analyses :

**Tableau 6** : Classement chronologique des temps de réactions des marquages.

| marquage n°       | 5        | 6        | 3        | 2         | 4        | 7        |
|-------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| temps de réaction | 1min 17s | 2min 54s | 6min 15s | 22min 56s | 1h 38min | 1h 58min |

Les observations suivantes ont été faites :

1. Le marquage n° 5 après 77 secondes de réaction présente 3 pics, à 23, 29, 35 minutes. Le premier pic ainsi que le pic central correspondent à la FITC, le dernier signal est celui du lysozyme. Des analyses spectrométriques (chapitre II.6.3 tableau 7) ont démontré la présence de lysozyme à 29 minutes sur tous les essais et également un marquage du lysozyme à 35 minutes pour toutes les analyses à l'exception des marquages 4 et 7 qui ont été filtré avant l'injection pour éliminer la formation de trouble de l'échantillon qui s'est révélé être la protéine en question.
2. A approximativement 26 minutes d'analyses un produit absent au marquage 5, commence à se former au marquage 6, totalisant un nombre de lysozyme marqué à 4.
3. Le signal détecté à 215 nm sur le marquage 3 à 33 minutes est un autre lysozyme avec un nombre de lysine marquées différent des marquages 5 et 6. L'intensité du pic à 35 minutes diminue tandis que celui à 26 minutes augmente, totalisant un nombre de 5 pics.
4. Après 22 minutes et 56 secondes de réaction, les pics à 23 et 26 minutes augmentent grandement, tandis que le signal proche des 33 minutes continue de diminuer.



5. Les marquages 4 et 7 ont été filtrés avant l'injection, dû à la précipitation du lysozyme, expliquant la disparition du signal de la protéine. Les deux échantillons présentent un pic à 21 minutes. Ce qui fait un total de 6 signaux différents, coïncident avec le nombre de lysine se trouvant dans le lysozyme, soit au nombre de marquages maximaux possibles (les différentes lysines marquées sur un lysozyme n'ont aucune influence sur les résultats présentés, seul le nombre de marquages compte, vu que la propriété physique analysée est le poids moléculaire).

NB: le changement de matrice entre les marquages et les standards induit une augmentation globale des temps de rétention de quelques secondes.

## II.6 Spectrométrie UV-VIS

### II.6.1 But recherché

Quantifier le lysozyme et la FITC des différentes fractions isolées en chromatographie d'exclusion de taille pour calculer les rapports molaires entre la FITC et le lysozyme, afin de caractériser l'évolution du nombre de lysine marquées dans le temps.

### II.6.2 Matériel et méthode

L'appareil employé est un DAD spectrophotometer 8452A, Hewlett Packard, les solutions ont été analysées dans des cuves en quartz Spectrosil® permettant des analyses spectrométriques dans tout le domaine UV et visible. Avant chaque série d'analyse un blanc a été réalisé. Une droite de calibration de la FITC diluée dans du tampon n°5 a été réalisée en préparant des standards de 0,27 ; 0.54 ; 0.81 ; 1.08 ; 1.35 ; 1.62 ; 3.24 ; 5.4 ; 8.1 mg/l. une autre droite de calibration du lysozyme en employant la méthode de Bradford a été réalisée comme suit :



- Préparation du réactif de bleu de coomassie

20 mg de bleu de coomassie G-250 ont été pesés dans un ballon jaugé de 200,0 ml et solubilisés dans 10,0 ml d'éthanol puriss, puis 20,0 ml d'acide phosphorique 85% ont été rajoutés et le niveau complété à 200,0 ml avec de l'eau déminéralisée. La solution a ensuite été filtrée sur un papier filtre Whatman n°2 puis conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

- Préparation des solutions de lysozyme

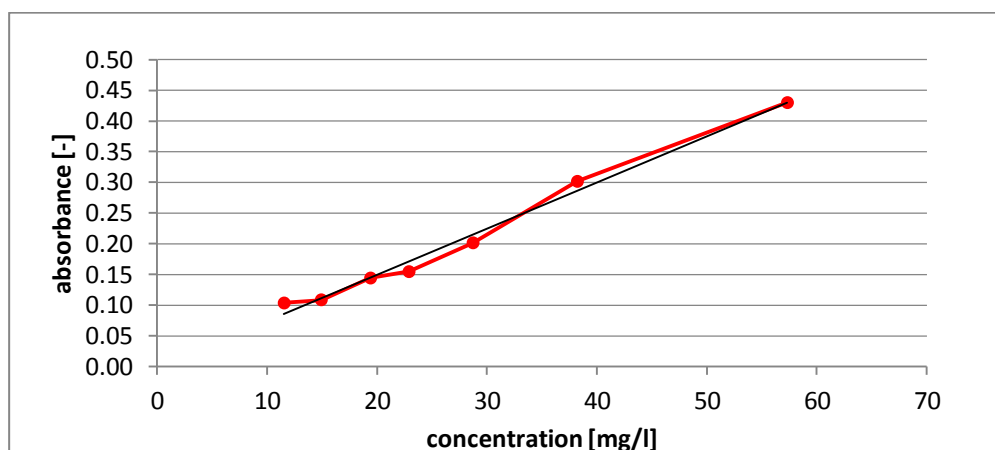
Pour la réalisation de la droite de calibration, des standards à 11,5 ; 14,9 ; 19,4 ; 22,9 ; 28,7 ; 38,2 et 57,3 mg/l ont été préparés dans le tampon n°5

- Droite de calibration du lysozyme

Les mesures spectrales ont été réalisées en chronométrant précisément le temps de réaction entre le réactif bleu de coomassie et les solutions de lysozyme à 10 minutes dès la mise en présence de 400 µl de standard lysozyme avec 600 µl de réactif bleu de coomassie et un vortexage durant 5 secondes. Le blanc est le mélange de 400 µl d'eau et 600 µl de réactif bleu de coomassie et a été soustraits avant le début des analyses.

### II.6.3 Résultats et discussion

La calibration du lysozyme selon Bradford a été réalisée après un temps de réaction chronométré précisément après 10 minutes de réaction. Des essais antérieurs ont démontré que le temps de réaction avec cette méthode était essentiel à la réalisation d'une droite de calibration précise (figure 8).



**Figure 8** : Droite de calibration du lysozyme.

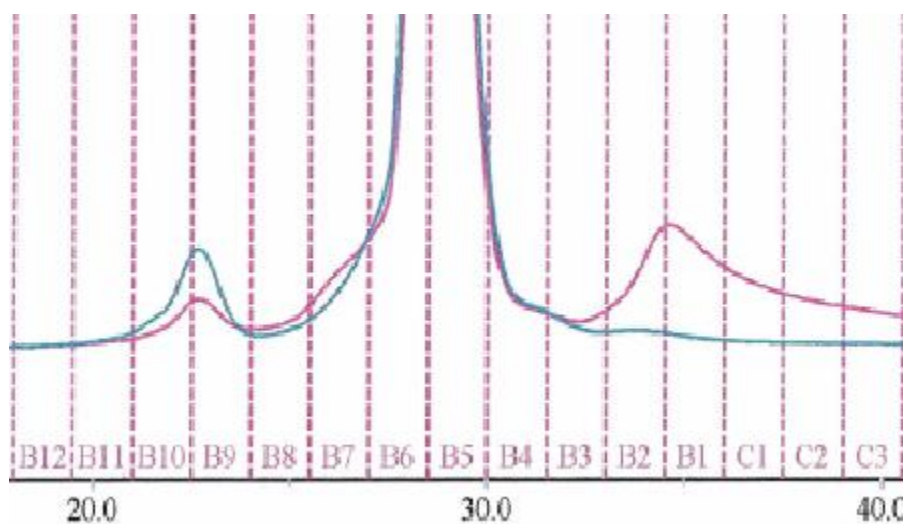
Les équations suivantes sont les modélisations des droites de calibrations du lysozyme, respectivement de la FITC :

-Absorbance à 580 nm [-] = 0,0075 \* concentration lysozyme [mg/l] - 0,001 [R<sup>2</sup> = 0,98]

-Absorbance à 490 nm [-] = 0,1574 \* concentration FITC [mg/l] + 0,013 [R<sup>2</sup> = 1,00]

Les mesures d'absorbances de la FITC et du lysozyme des fractions récoltées dans les marquages 2 à 7 en chromatographie d'exclusion de taille ont donné des spectres permettant la mesure des deux composés sans chevauchement de signal [ex : annexe IX].

Les fractions prélevées sur chaque essai de marquage non filtré avant l'injection, à savoir les essais 2, 3, 5 et 6, sont les fractions : B1 ; B2 ; B5 ; B9 et B10. La figure 9 représente les diverses fractions récoltées.



**Figure 9** : Agrandissement du chromatogramme du marquage n°5.

En revanche les essais de marquages 4 et 7 ne possèdent pas de signaux aux fractions B1 et B2, mais une fraction B11. Les fractions récoltées pour ces essais sont donc B5 ; B9 ; B10 et B11.

Les équations ci-dessus ont permis la quantification des deux réactifs de marquage et de ce fait il a été possible de calculer le rapport molaire FITC-lysozyme. (tableau 7)



**Tableau 7** : Rapports molaires FITC-lysozyme de toutes les fractions analysées

|                      |           | fractions |      |      |       |      |      |
|----------------------|-----------|-----------|------|------|-------|------|------|
|                      |           | B1        | B2   | B5   | B9    | B10  | B11  |
| temps de<br>réaction | 1min 17s  | 0,38      | 0,77 | 2,42 | 10,13 | 1,61 | -    |
|                      | 2min 54s  | 0,62      | 0,69 | 1,97 | 2,72  | 0,49 | -    |
|                      | 6min 15s  | 0,81      | 0,77 | 1,69 | 3,05  | 0,68 | -    |
|                      | 22min 56s | 0,39      | 0,36 | 1,3  | 2,43  | 1,28 | -    |
|                      | 1h 38min  | -         | -    | -    | 4,31  | 0,92 | 0,88 |
|                      | 1h 58min  | -         | -    | -    | 4,27  | 0,66 | 0,19 |

Ces résultats doivent être pris avec recul, car la FITC quantifiée en spectrométrie VIS n'est pas uniquement celle présente dans le marquage, les signaux se trouvant approximativement aux fractions B5, B9 et B10 coïncident avec les signaux du standard FITC, donnant des rapports FITC-lysozyme surestimés, d'ailleurs, à l'exception de la fraction B10 au temps de réaction le plus court, les fractions B5 et B9 présentent les rapports de marquages les plus élevés, appuyant cette théorie. Au contraire, les signaux B1 et B2 coïncident avec le pic du lysozyme seul, sous-estimant probablement les rapports de marquages obtenus.

La fraction B9 après 1 minute 17 secondes d'analyse est la confirmation de la surestimation de la teneur en FITC, étant donné que la quantité maximale de marquage est de 6 moles de fluorescéines, correspondant à la quantité molaire de lysines se trouvant dans une mole de lysozyme.

Les résultats obtenus ont mis en évidence la non-existence d'une linéarité d'évolution quelconque dans le temps du nombre de marquage fluorescent.

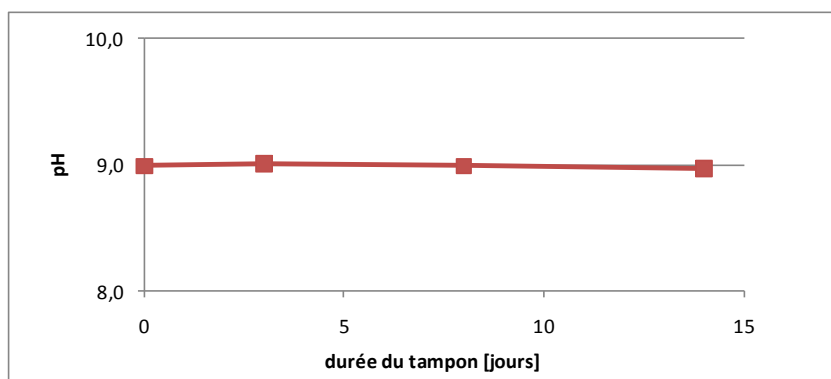


## II.7 Contrôles de stabilité

### II.7.1 pH

La stabilité du tampon borate dans le temps a été effectuée avec une solution fraîchement préparée selon le mode opératoire suivant :

- tampon borate à pH 9,0 : 87,3 mg d'hydroxyde de sodium a été pesé et ajouté à 321,7 mg d'acide borique puis dilué dans 100,0 ml d'eau déminéralisée

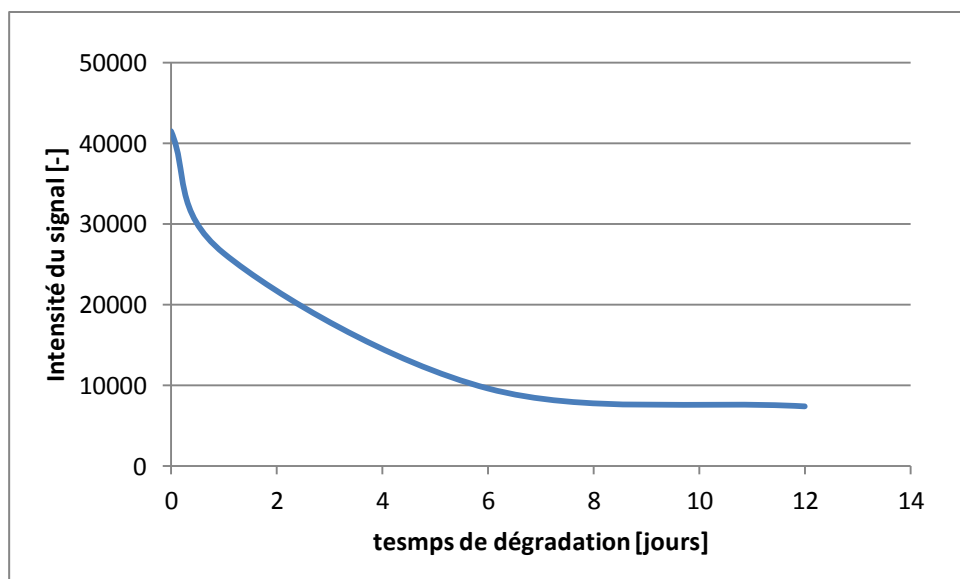


**Figure 10** ; Représentation de la stabilité du tampon borate durant deux semaines.

Les calculs basés sur les résultats ci-dessus montrent une stabilité de tampon  $>0.05$  unité de pH à un pH de 9,0. Ce tampon est donc considéré comme étant stable en restant exposé à température ambiante et non protégé des UV et les analyses s'y référant sont jugées fiables.

## II.7.2 Stabilité de la fluorescence

Une solution de 10,58 mg de FITC a été solubilisée dans un ballon jaugé de 25,0 ml avec le tampon n°5. La longueur d'onde d'excitation a été fixée à 495 nm et celle d'émission à 526 nm sur un spectrofluorimètre Tecan Infinite 200 PRO. La solution pour le test de stabilité a été entreposée sur une paillasse à l'exposition de la lumière à température ambiante (20°C) durant près de deux semaines. Les analyses d'émission fluorimétriques ont été effectuées à une température comprise entre 27 et 29 °C. Une dégradation exponentielle du fluorophore est observée (figure 11).



**Figure 11** : Dégradation de la fluorescence de la FITC dans le temps.

Il a été considéré qu'une solution fraîche de FITC devait être réalisée avant chaque série d'analyses pour les marquages quantitatifs afin de garantir des résultats optimaux.



### III. Conclusion et perspectives

Les étapes opératoires suivies ont permis une évolution continue vers l'atteinte de l'objectif qu'est la caractérisation du marquage. La première partie a été la confrontation avec une nouvelle méthode analytique, représentée par le marquage fluorescent d'une protéine. Il a d'abord fallu comprendre les deux réactifs séparément avant de pouvoir étudier les produits de leur réaction. L'erreur a été de tenter une analyse directe des produits de réactions en HPLC, l'étendue de la complexité des réactions de marquages n'était pas encore bien comprise, cette faute aura néanmoins permis de mettre en évidence la grande variabilité des produits de la réaction entre un isothiocyanate d'un fluorophore et les groupes lysines d'une protéine.

L'étude menée en chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence la quantité molaire de FITC supérieur d'environ 3 fois celle de lysine nécessaire à une réaction complète et quasiment instantanée de cette dernière. Ainsi que le fait qu'une température de 37°C n'influence pas la réaction entre l'acide aminé et la fluorescéine isothiocyanate. La transposition des résultats obtenus en CCM avec la lysine et le fluorophore ont permis le développement d'une méthode de marquage réussie entre le lysozyme et la FITC.

Les chromatogrammes en chromatographie d'exclusion de taille montrent clairement le déplacement des fractions marquées dans le sens de l'augmentation du poids moléculaire, preuve d'une croissance du nombre de lysines marquées dans le lysozyme. Un fractionnement chaque 0,5 ml des composés séparés en CE aurait permis une augmentation de la sélectivité des signaux.

Bien que les méthodes de quantifications du lysozyme et de la FITC développées en spectrométrie visible soient fonctionnelles. Il subsiste un défaut majeur empêchant la quantification précise des rapports molaires de FITC-lysozyme : la présence de FITC n'ayant pas réagit avec la protéine. Pour éliminer ce problème il faut que les marquages séparés et détectés en CE ne se confondent pas avec les pics de FITC. Plusieurs alternatives sont possibles :

1. Une dialyse de la solution de marquage.
2. Une filtration sur une colonne possédant un cut-off compris entre 1000 et 10000 suivi d'une centrifugation.



3. Arrêter la réaction avec un excès d'une grosse protéine contenant un grand nombre de groupes lysines, comme la BSA, afin de diminuer les temps de rétentions des deux signaux de FITC (saturés en BSA) et libérer la zone du chromatogramme où sont détectés les différents marquages du lysozyme.

4. Réaliser une extraction liquide-liquide à l'aide d'une microémulsion, des essais ont démontrés l'efficacité de cette méthode pour le lysozyme. (15)

Si une des solutions au problème cité précédemment s'avérait être réalisable, la caractérisation quantitative des marquages dans le temps pourrait être concrétisée avec la méthode développée en spectrométrie visible. L'étape suivante serait de tester la reproductibilité de la méthode de marquage et de confirmer l'existence ou non d'une corrélation entre le taux de marquage et le temps. Permettant la création d'une équation empirique pouvant prévoir l'évolution du marquage jusqu'à un temps infini.

Si les temps de marquages peuvent être défini et stoppés précisément, et que le marquage est spécifique pour chaque protéine dans avec un fluorophore défini, alors une base de données pourrait être réalisée en spectroscopie de corrélation de fluorescence en utilisant les différents signaux des protéines marquées mesurés à des temps de réaction variables, ouvrant une nouvelle ère d'analyses dans le domaine du diagnostique médical.

Sion, le 19 août 2011

Jason Lachat



## IV. Bibliographie

- [1] Innova Proteomics: Identification des protéines (03 04 2011).  
<http://www.innova-proteomics.com/identificationde/index.html>.
- [2] Poujol Christel et Spencer Brown, Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie, Institut des Sciences du Végétal, (2009).
- [3] Souvik Chattopadhyay et Rajavel Srinivasan et Dawn S. Y. Yeo et al., Site-specific covalent labeling of proteins inside live cells using small molecule probes, Bioorganic & Medicinal Chemistry 17 (2008).
- [4] Mikiyoshi Takano et Yuka Koyama et Hiromi Nishikawa et al., Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine, (2004).
- [5] Graham Hungerford et Johan Benesch et Rui L et al., Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (2006).
- [6] UniProt : P00698 (LYSC\_CHICK)(18 05 2011).  
<http://www.uniprot.org/uniprot/P00698>.
- [7] Sigma-Aldrich: Fluorescein 5(6)-isothiocyanate .(07 08 2011).  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=fr&N4=46950|FLUKA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=fr&N4=46950|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC).
- [8] Segura Jean-Manuel, protocole de marquage, (juin 2011).
- [9] Dionex: ProSwift RP Protein Column (07 08 2011).  
<http://www.dionex.com/en-us/products/columns/bio/protein/proswift-rp/lp-73380.html>.
- [10] Sigma-Aldrich: Rhodamine B isothiocyanate (11 08 2011).  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO%7CBRAND\\_KEY&N4=283924%7CALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=283924%7CALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC).
- [11] Sigma-Aldrich: Fluorescein 5(6)-isothiocyanate(11 08 2011).  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=fr&N4=46950|FLUKA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC&cm\\_sp=Customer\\_Favorites-\\_-Detail\\_Page-\\_-Text-46950](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=fr&N4=46950|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&cm_sp=Customer_Favorites-_-Detail_Page-_-Text-46950).
- [12] Sigma-Aldrich: L-Alanine (11 08 2011).  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=All&N3=mode+matchpartialmax&N4=alanine&D7=0&D10=alanine&N1=S\\_ID&ST=RS&N25=0&F=PR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=All&N3=mode+matchpartialmax&N4=alanine&D7=0&D10=alanine&N1=S_ID&ST=RS&N25=0&F=PR).



[13] Sigma-Aldrich: Buffer Reference Center (11 08 2011).  
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html#sodiumcarbonate>.

[14] Mikiyama Takano et Yuka Koyama et Hiromi Nishikawa et al., Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine, European Journal of Pharmacology 502, (2004).

[15] Hentsch, Marc, Séparation de protéines par extraction liquide-liquide à l'aide d'une microémulsion, (1994).





## V. Annexes

- I. Phrases de risques (R)
- II. Phrases de sécurité (S)
- III Spectre UV-VIS: rhodamine B isothiocyanate (3,7 mg/l)
- IV chromatogramme HPLC: marquage n°3 « référence »
- V chromatogramme HPLC: marquage n°3 après 4 jours de réaction
- VI chromatogramme HPLC: marquage n°3 après 6 jours de réaction
- VII chromatogramme CE: standard FITC 350 mg/l
- VIII chromatogramme CE : marquage final n°3
- IX spectre UV-VIS : détection de FITC et de lysozyme simultanée

# I

|            |   |            |  |
|------------|---|------------|--|
| <b>R1</b>  | Explosif à l'état sec   | <b>R33</b> | Danger d'effets cumulatifs   |
| <b>R2</b>  | Risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition.       | <b>R34</b> | Provoque des brûlures  |
| <b>R3</b>  | Grand risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition. | <b>R35</b> | Provoque de graves brûlures  |
| <b>R4</b>  | Forme des composés métalliques très sensibles.  | <b>R36</b> | Irritant pour les yeux   |
| <b>R5</b>  | Danger d'explosion sous l'action de la chaleur.   | <b>R37</b> | Irritant pour les voies respiratoires  |
| <b>R6</b>  | Danger d'explosion en contact ou sans contact avec l'air.                                 | <b>R38</b> | Irritant pour la peau  |
| <b>R7</b>  | Peut provoquer un incendie.   | <b>R39</b> | Danger d'effets irréversibles très graves                                      |
| <b>R8</b>  | Favorise l'inflammation des matières combustibles.  | <b>R40</b> | Effet cancérigène suspecté - preuves insuffisantes                             |
| <b>R9</b>  | Peut exploser en mélange avec des matières combustibles.                                  | <b>R41</b> | Risque de lésions oculaires graves   |
| <b>R10</b> | Inflammable   | <b>R42</b> | Peut entraîner une sensibilisation par inhalation                              |
| <b>R11</b> | Facilement inflammable  | <b>R43</b> | Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau                    |
| <b>R12</b> | Extrêmement inflammable   | <b>R44</b> | Risque d'explosion si chauffé en ambiance confinée                             |
| <b>R13</b> | Gaz liquéfié extrêmement inflammable  | <b>R45</b> | Peut causer le cancer  |
| <b>R14</b> | Réagit violemment au contact de l'eau   | <b>R46</b> | Peut causer des altérations génétiques héréditaires                            |
| <b>R15</b> | Au contact de l'eau dégage des gaz extrêmement inflammables                               | <b>R47</b> | Peut causer des malformations congénitales                                     |
| <b>R16</b> | Peut exploser en mélange avec des substances comburantes                                  | <b>R48</b> | Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée             |
| <b>R17</b> | Spontanément inflammable à l'air  | <b>R49</b> | Peut causer le cancer par inhalation   |
| <b>R18</b> | Lors de l'utilisation, formation possible de mélange vapeur/air inflammable/explosif      | <b>R50</b> | Très toxique pour les organismes aquatiques                                    |
| <b>R19</b> | Peut former des peroxydes explosifs   | <b>R51</b> | Toxique pour les organismes aquatiques   |
| <b>R20</b> | Nocif par inhalation  | <b>R52</b> | Nocif pour les organismes aquatiques   |
| <b>R21</b> | Nocif par contact avec la peau  | <b>R53</b> | Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique |
| <b>R22</b> | Nocif en cas d'ingestion  | <b>R54</b> | Toxique pour la flore  |
| <b>R23</b> | Toxique par inhalation  | <b>R55</b> | Toxique pour la faune  |
| <b>R24</b> | Toxique par contact avec la peau  | <b>R56</b> | Toxique pour les organismes du sol   |
| <b>R25</b> | Toxique en cas d'ingestion  | <b>R57</b> | Toxique pour les abeilles  |
| <b>R26</b> | Très toxique par inhalation   | <b>R58</b> | Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement           |
| <b>R27</b> | Très toxique par contact avec la peau   | <b>R59</b> | Dangereux pour la couche d'ozone   |
| <b>R28</b> | Très toxique en cas d'ingestion   | <b>R60</b> | Peut altérer la fertilité  |
| <b>R29</b> | Au contact de l'eau dégage des gaz toxiques   | <b>R61</b> | Risques pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant                   |
| <b>R30</b> | Peut devenir facilement inflammable pendant l'utilisation                                 | <b>R62</b> | Risque possible d'altération de la fertilité                                   |
| <b>R31</b> | Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique  | <b>R63</b> | Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant           |
| <b>R32</b> | Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique   | <b>R64</b> | Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel                        |
|            |   | <b>R65</b> | Nocif, peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion.             |
|            |   | <b>R66</b> | L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau        |
|            |   | <b>R67</b> | L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges.                 |
|            |   | <b>R68</b> | Possibilité d'effets irréversibles   |

## II

|            |  |            |  |
|------------|--|------------|--|
| <b>S1</b>  | Conserver sous clé   | <b>S30</b> | Ne jamais verser de l'eau dans ce produit  |
| <b>S2</b>  | Conserver hors de la portée des enfants  | <b>S33</b> | Eviter l'accumulation des charges électrostatiques   |
| <b>S3</b>  | Conserver dans un endroit frais  | <b>S35</b> | Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage   |
| <b>S4</b>  | Conserver à l'écart de tout local d'habitation   | <b>S36</b> | Porter un vêtement de protection approprié   |
| <b>S5</b>  | Conserver sous ... (liquide approprié à spécifier par le fabricant)  | <b>S37</b> | Porter des gants appropriés  |
| <b>S6</b>  | Conserver sous ... (gaz inerte à spécifier par le fabricant)   | <b>S38</b> | En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire approprié  |
| <b>S7</b>  | Conserver le récipient bien fermé  | <b>S39</b> | Porter un appareil de protection des yeux / du visage  |
| <b>S8</b>  | Conserver le récipient à l'abri de l'humidité  | <b>S40</b> | Pour nettoyer le sol ou les objets souillés par ce produit, utiliser (à préciser par le fabricant)   |
| <b>S9</b>  | Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé  | <b>S41</b> | En cas d'incendie et/ou d'explosion, ne pas respirer les fumées  |
| <b>S12</b> | Ne pas fermer hermétiquement le récipient  | <b>S42</b> | Pendant les fumigations / pulvérisations, porter un appareil respiratoire approprié (termes appropriés à indiquer par le fabricant)                  |
| <b>S13</b> | Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux  | <b>S43</b> | En cas d'incendie, utiliser ... (moyens d'extinction à préciser par le fabricant. Si l'eau augmente les risques, ajouter "Ne jamais utiliser d'eau") |
| <b>S14</b> | Conserver à l'écart des ... (matières incompatibles à indiquer par le fabricant)   | <b>S45</b> | En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)   |
| <b>S15</b> | Conserver à l'écart de la chaleur  | <b>S46</b> | En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette   |
| <b>S16</b> | Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles - Ne pas fumer  | <b>S47</b> | Conserver à une température ne dépassant pas ... °C (à préciser par le fabricant)  |
| <b>S17</b> | Tenir à l'écart des matières combustibles  | <b>S48</b> | Maintenir humide avec ... (moyen approprié à préciser par le fabricant)  |
| <b>S18</b> | Manipuler et ouvrir le récipient avec prudence   | <b>S49</b> | Conserver uniquement dans le récipient d'origine   |
| <b>S19</b> |  | <b>S50</b> | Ne pas mélanger avec ... (à spécifier par le fabricant)  |
| <b>S20</b> | Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation  | <b>S51</b> | Utiliser seulement dans des zones bien ventilées   |
| <b>S21</b> | Ne pas fumer pendant l'utilisation   | <b>S52</b> | Ne pas utiliser sur de grandes surfaces dans les locaux habités  |
| <b>S22</b> | Ne pas respirer les poussières   | <b>S53</b> | Eviter l'exposition - se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation   |
| <b>S23</b> | Ne pas respirer les gaz / vapeurs / fumées / aérosols (termes appropriés à indiquer par le fabricant)                    | <b>S56</b> | Eliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte de déchets dangereux ou spéciaux   |
| <b>S24</b> | Eviter le contact avec la peau   | <b>S57</b> | Utiliser un récipient approprié pour éviter toute contamination du milieu ambiant  |
| <b>S25</b> | Eviter le contact avec les yeux  | <b>S59</b> | Consulter le fabricant / fournisseur pour des informations relatives à la récupération / au recyclage  |
| <b>S26</b> | En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste            | <b>S60</b> | Eliminer le produit et le récipient comme un déchet dangereux  |
| <b>S27</b> | Enlever immédiatement out vêtement souillé ou éclaboussé   | <b>S61</b> | Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales / la fiche de données de sécurité   |
| <b>S28</b> | Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec (produits appropriés à indiquer par le fabricant) | <b>S62</b> | En cas d'ingestion, ne pas faire vomir : consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette                                |
| <b>S29</b> | Ne pas jeter les résidus à l'égout   | <b>S63</b> | En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos  |
|            |  | <b>S64</b> | En cas d'ingestion, rincer la bouche avec de l'eau (seulement si la personne est consciente).  |

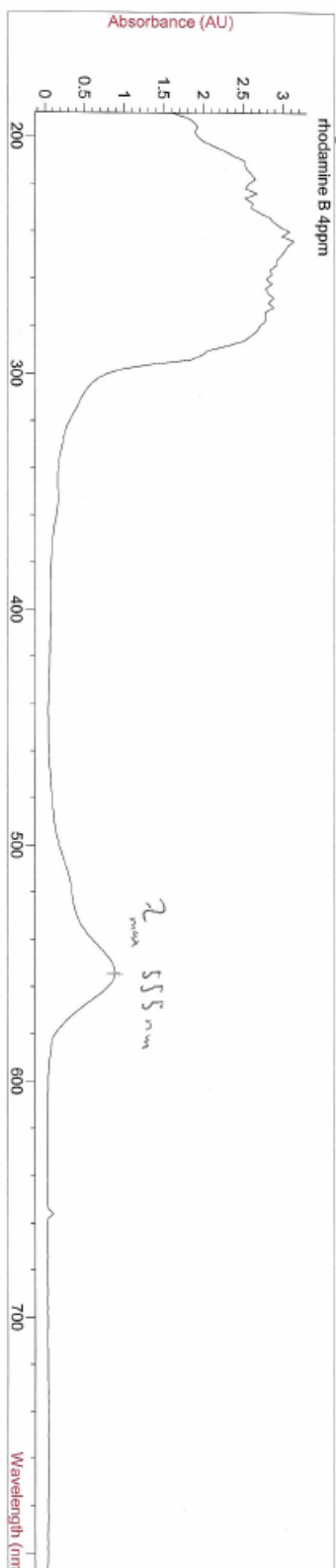
# III

## Spectrum/Peak Report

Date 06.05.2011 Time 10:42:52 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : <untitled>

### Overlaid Spectra:



# Name  
 1 rhodamine B 4ppm

Report generated by : manager

Signature: .....

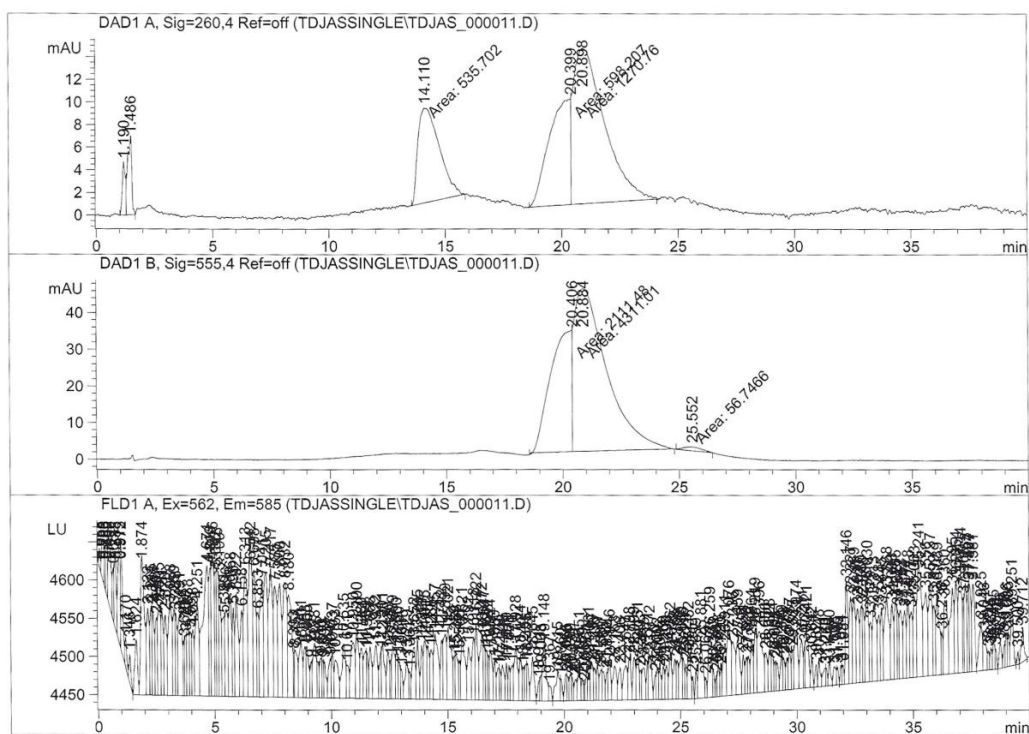
\*\*\* End Spectrum/Peak Report \*\*\*

## IV

Data File D:\CHEM32\1\DATA\TDJASSINGLE\TDJAS\_000011.D  
Sample Name: marquage n°3

```
=====
Acq. Operator   : jas
Acq. Instrument : 1100 CA670
Injection Date  : 12.05.2011 02:23:41
Location       : Vial 6
Inj Volume     : 10 µl

Acq. Method    : D:\CHEM32\1\METHODS\TDJAS.M
Last changed   : 12.05.2011 02:01:07 by jas
                (modified after loading)
Analysis Method: D:\CHEM32\1\METHODS\TDJAS.M
Last changed   : 18.05.2011 01:45:20 by jas
                (modified after loading)
Method Info    : TD Jason Lachat- méthode séparation lysozyme
=====
```



Data File D:\CHEM32\1\DATA\TDJASSINGLE\TDJAS\_000011.D  
Sample Name: marquage n°3

| Peak #   | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area %  |
|----------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1        | 1.190         | BV   | 0.1283      | 41.46738     | 4.63836      | 1.6378  |
| 2        | 1.486         | VV   | 0.1710      | 85.73338     | 6.80407      | 3.3862  |
| 3        | 14.110        | MM   | 1.0639      | 535.70245    | 8.39203      | 21.1584 |
| 4        | 20.399        | MF   | 1.0653      | 598.20667    | 9.35861      | 23.6271 |
| 5        | 20.898        | FM   | 1.5393      | 1270.75757   | 13.75875     | 50.1905 |
| Totals : |               |      |             | 2531.86745   | 42.95182     |         |

Signal 2: DAD1 B, Sig=555,4 Ref=off

| Peak #   | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area %  |
|----------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1        | 20.406        | MF   | 1.0548      | 2111.48242   | 33.36333     | 32.5885 |
| 2        | 20.884        | FM   | 1.6161      | 4311.00537   | 44.45906     | 66.5357 |
| 3        | 25.552        | MM   | 0.8888      | 56.74661     | 1.06408      | 0.8758  |
| Totals : |               |      |             | 6479.23441   | 78.88647     |         |

Signal 3: FLD1 A, Ex=562, Em=585

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area LU *s | Height [LU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|------------|-------------|--------|
| 1      | 0.068         | BV   | 0.0705      | 114.70503  | 25.13462    | 0.0764 |
| 2      | 0.203         | VV   | 0.0982      | 341.50122  | 52.04433    | 0.2275 |
| 3      | 0.286         | VV   | 0.0520      | 203.42830  | 54.69906    | 0.1355 |
| 4      | 0.369         | VV   | 0.0729      | 346.83960  | 67.50605    | 0.2311 |
| 5      | 0.468         | VV   | 0.1473      | 773.97284  | 80.12686    | 0.5156 |
| 6      | 0.659         | VV   | 0.0651      | 313.43613  | 70.13637    | 0.2088 |
| 7      | 0.738         | VV   | 0.0856      | 595.24097  | 101.58689   | 0.3965 |
| 8      | 0.915         | VV   | 0.1059      | 967.20331  | 137.29321   | 0.6443 |
| 9      | 0.972         | VV   | 0.1037      | 866.19580  | 139.20421   | 0.5770 |
| 10     | 1.170         | VV   | 0.0805      | 222.60722  | 39.72428    | 0.1483 |
| 11     | 1.346         | VV   | 0.0830      | 214.84526  | 38.12447    | 0.1431 |
| 12     | 1.624         | VV   | 0.1273      | 616.40558  | 72.47626    | 0.4106 |
| 13     | 1.874         | VV   | 0.1775      | 2092.76001 | 181.86200   | 1.3942 |
| 14     | 2.122         | VV   | 0.1118      | 878.64929  | 113.59817   | 0.5853 |
| 15     | 2.265         | VV   | 0.0828      | 676.66364  | 116.62025   | 0.4508 |
| 16     | 2.322         | VV   | 0.0873      | 684.20831  | 114.00190   | 0.4558 |
| 17     | 2.490         | VV   | 0.0856      | 612.16974  | 101.26212   | 0.4078 |
| 18     | 2.595         | VV   | 0.1309      | 1042.42700 | 118.24324   | 0.6945 |
| 19     | 2.731         | VV   | 0.0919      | 707.16760  | 110.55495   | 0.4711 |
| 20     | 2.870         | VV   | 0.1083      | 805.48981  | 105.70620   | 0.5366 |
| 21     | 3.088         | VV   | 0.1672      | 1330.72729 | 117.08702   | 0.8865 |
| 22     | 3.250         | VV   | 0.0964      | 800.10223  | 114.85278   | 0.5330 |
| 23     | 3.328         | VV   | 0.0775      | 596.20764  | 107.72379   | 0.3972 |
| 24     | 3.491         | VV   | 0.1616      | 1296.67334 | 106.40310   | 0.8638 |
| 25     | 3.681         | VV   | 0.0567      | 285.58472  | 72.65285    | 0.1903 |
| 26     | 3.751         | VV   | 0.0682      | 378.45789  | 79.93193    | 0.2521 |
| 27     | 3.838         | VV   | 0.0902      | 627.84833  | 97.52629    | 0.4183 |
| 28     | 3.957         | VV   | 0.0872      | 504.42374  | 84.10937    | 0.3360 |
| 29     | 4.058         | VV   | 0.0842      | 515.27545  | 87.02924    | 0.3433 |
| 30     | 4.251         | VV   | 0.1514      | 1339.72327 | 122.49933   | 0.8925 |
| 31     | 4.674         | VV   | 0.2137      | 2866.11060 | 170.21536   | 1.9094 |
| 32     | 4.813         | VV   | 0.0855      | 1012.72955 | 167.81375   | 0.6747 |

1100 CA670 19.05.2011 10:22:08 jas

Page 2 of 6



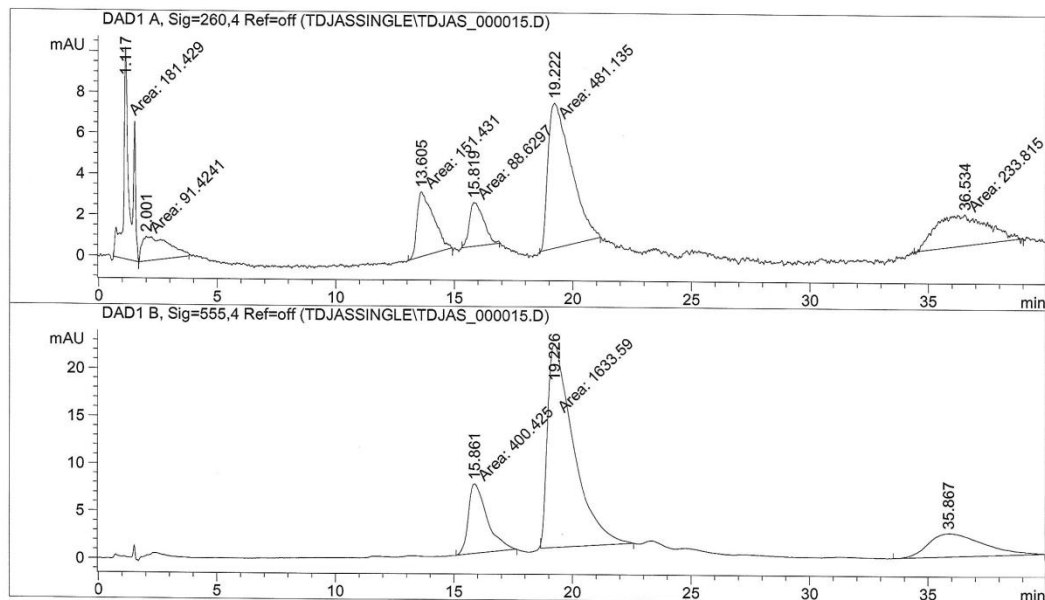
# V

Data File D:\CHEM32\1\DATA\TDJASSINGLE\TDJAS\_000015.D  
Sample Name: marquage essai n°3

```
=====
Acq. Operator   : jas
Acq. Instrument : 1100 CA670
Injection Date  : 16.05.2011 11:34:19
Location       : Vial 6
Inj Volume     : 10 µl

Acq. Method    : D:\CHEM32\1\METHODS\TDJAS.M
Last changed   : 16.05.2011 11:33:04 by jas
Analysis Method: D:\CHEM32\1\METHODS\TDJAS.M
Last changed   : 18.05.2011 01:45:20 by jas
                (modified after loading)
Method Info    : TD Jason Lachat- méthode séparation lysozyme
```

Sample Info : changement des paramètres du FLD



## Area Percent Report

```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=260,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area %  |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1      | 1.117         | MM   | 0.2909      | 181.42921    | 10.39406     | 14.7760 |
| 2      | 2.001         | MM   | 1.2498      | 91.42408     | 1.21916      | 7.4458  |
| 3      | 13.605        | MM   | 0.7961      | 151.43100    | 3.17039      | 12.3329 |
| 4      | 15.819        | MM   | 0.6877      | 88.62968     | 2.14811      | 7.2182  |
| 5      | 19.222        | MM   | 1.1274      | 481.13510    | 7.11296      | 39.1847 |

1100 CA670 19.05.2011 10:28:10 jas

Page 1 of 2



Data File D:\CHEM32\1\DATA\TDJASSINGLE\TDJAS\_000015.D  
 Sample Name: marquage essai n°3

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area %  |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 6      | 36.534        | MM   | 2.5629      | 233.81496    | 1.52051      | 19.0424 |

Totals : 1227.86403 25.56520

Signal 2: DAD1 B, Sig=555,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area %  |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1      | 15.861        | MM   | 0.9124      | 400.42499    | 7.31430      | 16.4748 |
| 2      | 19.226        | MM   | 1.2686      | 1633.58521   | 21.46246     | 67.2109 |
| 3      | 35.867        | BBA  | 1.8952      | 396.52686    | 2.47223      | 16.3144 |

Totals : 2430.53705 31.24900

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*

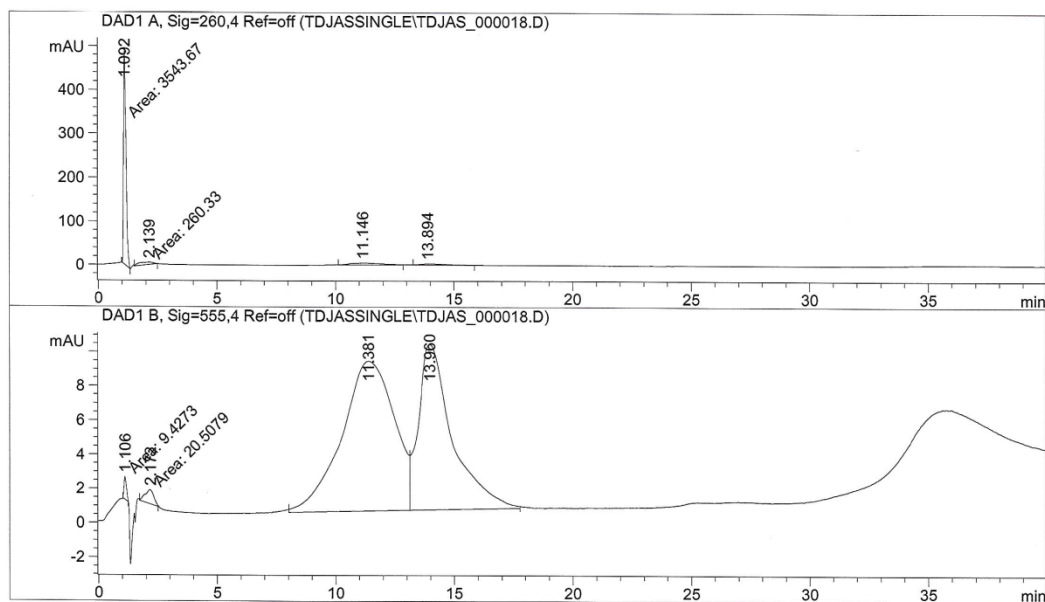
## VI

Data File D:\CHEM32\1\DATA\TDJASSINGLE\TDJAS\_000018.D  
Sample Name: marquage n°3

```
=====
Acq. Operator   : jas
Acq. Instrument : 1100 CA670
Injection Date  : 18.05.2011 09:03:39
Location       : Vial 6
Inj Volume     : 10 µl

Acq. Method    : D:\CHEM32\1\METHODS\TDJAS.M
Last changed   : 18.05.2011 09:00:14 by jas
                (modified after loading)
Analysis Method: D:\CHEM32\1\METHODS\TDJAS.M
Last changed   : 18.05.2011 01:45:20 by jas
                (modified after loading)
Method Info    : TD Jason Lachat- méthode séparation lysozyme
```

Sample Info : vérification de la stabilité de l'échantillon



### Area Percent Report

```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=260,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area %  |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1      | 1.092         | MM   | 0.1205      | 3543.66992   | 490.10779    | 79.0514 |
| 2      | 2.139         | MM   | 0.7769      | 260.32953    | 5.58467      | 5.8074  |
| 3      | 11.146        | BB   | 1.2377      | 435.08316    | 4.18215      | 9.7057  |

1100 CA670 19.05.2011 10:33:57 jas

Page 1 of 2

Data File D:\CHEM32\1\DATA\TDJASSINGLE\TDJAS\_000018.D  
 Sample Name: marquage n°3

| Peak #   | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|----------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|--------|
| 4        | 13.894        | BB   | 1.0181      | 243.65666    | 2.90630      | 5.4354 |
| Totals : |               |      |             | 4482.73927   | 502.78091    |        |

Signal 2: DAD1 B, Sig=555,4 Ref=off

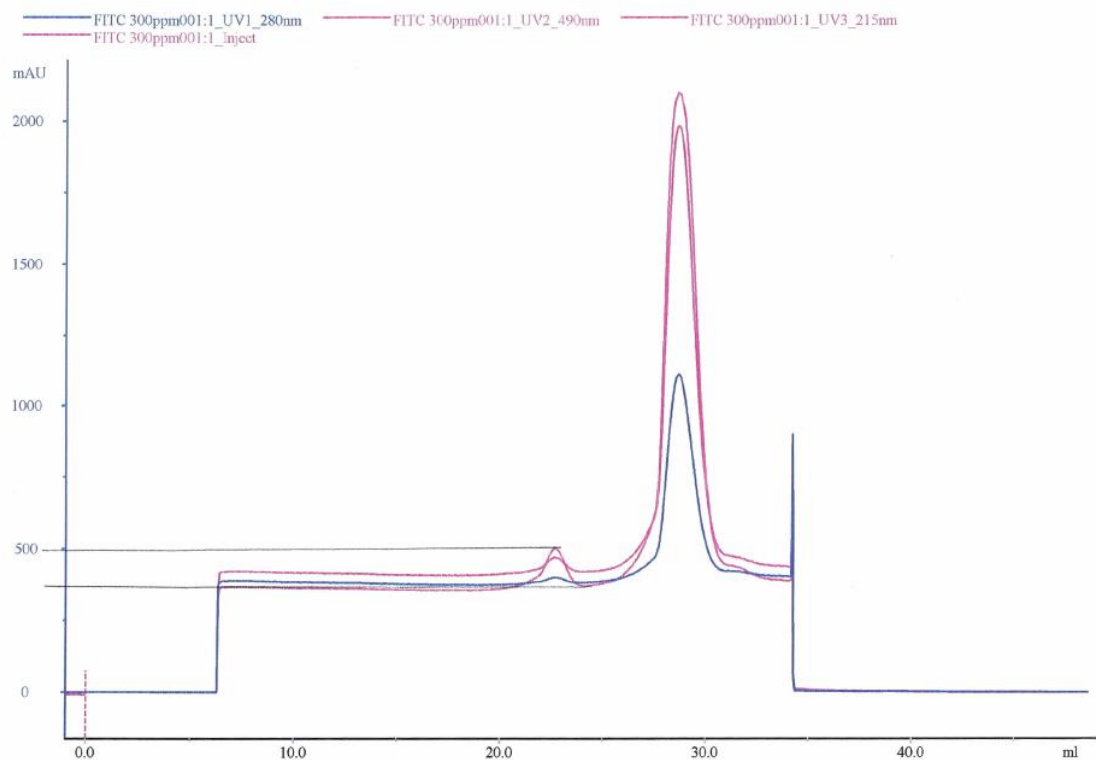
| Peak #   | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area %  |
|----------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|
| 1        | 1.106         | MM   | 0.1180      | 9.42730      | 1.33149      | 0.4043  |
| 2        | 2.172         | MM   | 0.4150      | 20.50786     | 8.23625e-1   | 0.8795  |
| 3        | 11.381        | BV   | 2.0548      | 1344.20435   | 8.75696      | 57.6493 |
| 4        | 13.960        | VB   | 1.4016      | 957.55292    | 9.68407      | 41.0669 |
| Totals : |               |      |             | 2331.69242   | 20.59615     |         |

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*

## VII

UNICORN 4.11 (Build 211)

Result file: c:\...\Default\Rémy (Dur)\Projets\TD Jason Lachat\FITC 300ppm001

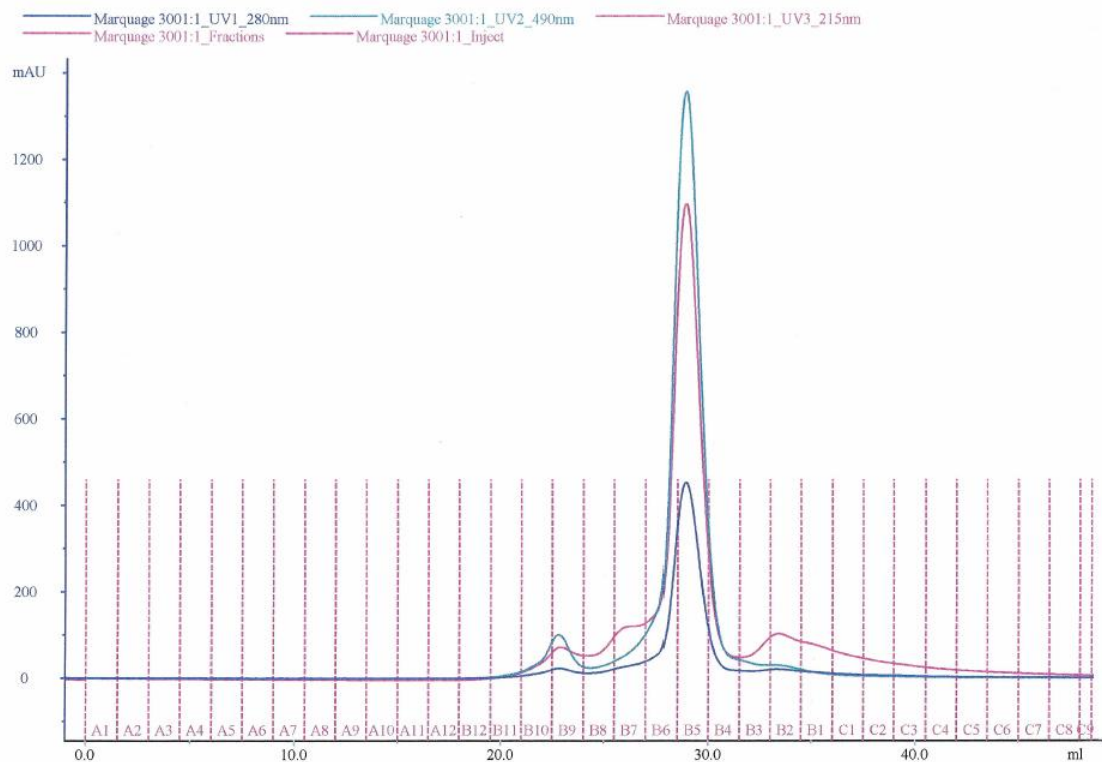


NB : problèmes d'élution de 0 à 8 minutes et à 34 minutes, aucune influence sur le résultat.

## VIII

UNICORN 4.11 (Build 211)

Result file: c:\...\Default\Rény (Dur)\Projets\TD Jason Lachat\Marquage 3001



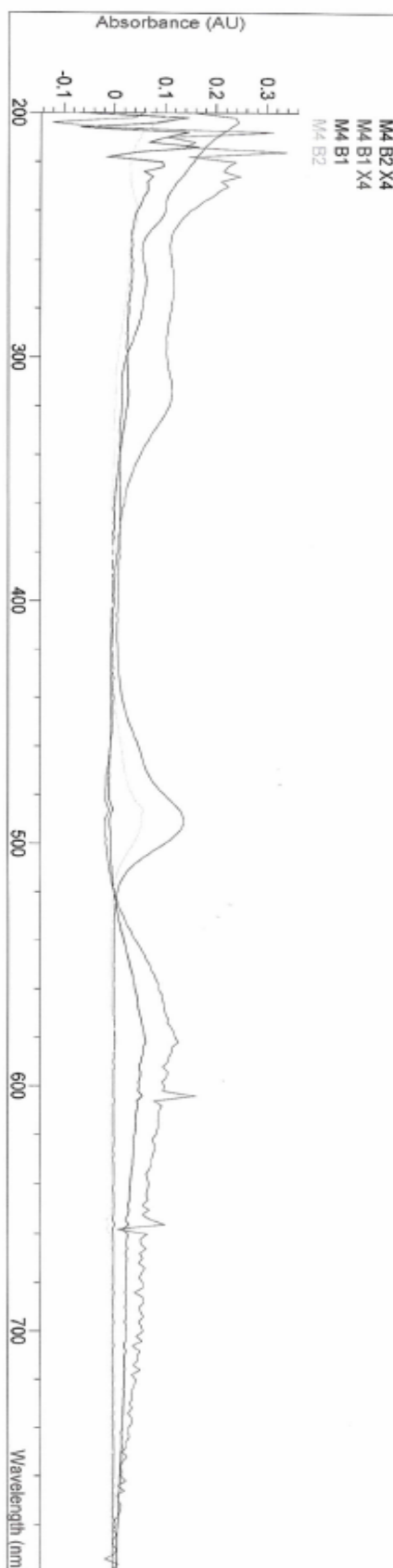
# IX

## Fixed Wavelength Report

Date 12.07.2011 Time 11:33:03 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

### Overlaid Spectra:



| # | Name     | Abs<490nm> | Abs<580nm> | # | Name  | Abs<490nm> | Abs<580nm> |
|---|----------|------------|------------|---|-------|------------|------------|
| 1 | M4 B2 X4 | -8.5907E-3 | 6.0837E-2  | 3 | M4 B1 | 0.13757    | 1.8005E-3  |
| 2 | M4 B1 X4 | -1.6968E-2 | 0.12151    | 4 | M4 B2 | 5.3329E-2  | 4.4861E-3  |

Report generated by : F103

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*