

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2012

Yvan Crittin

*Suivi de réactions
de marquage fluorescent*

Professeur Jean-Manuel Segura

Expert Emmanuel Guignet

Titre / Titel

Suivi de réactions de marquage fluorescent

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Le dosage et l'analyse de protéines — notamment par électrophorèse capillaire — sont très souvent effectués par fluorescence, afin d'atteindre une très haute sensibilité. Pour pouvoir utiliser les méthodes de fluorescence, il faut cependant marquer la protéine d'intérêt par couplage avec un réactif fluorescent. Ces réactions sont souvent effectuées sur les résidus lysines des protéines. Un marquage optimal correspondant à une sensibilité accrue dépend — de manière critique — du degré de marquage de la protéine qui, à son tour, varie avec les conditions de réaction. Malgré leur importance, les réactions de marquage ont été très peu étudiées en détail, ceci est notamment dû à l'absence de techniques d'analyse adéquates.

L'objectif de ce travail de diplôme est de développer de telles techniques permettant le suivi de réactions de marquage. Les buts de ce travail sont les suivants :

- l'établissement d'une méthode permettant le suivi général de réactions de marquage fluorescent par mesure de l'anisotropie de polarisation de fluorescence
- l'établissement d'une méthode permettant le suivi de réactions de marquage fluorescent avec détermination du degré de marquage à l'aide d'une analyse de distribution d'intensité de fluorescence (FIDA)
- si le temps le permet, l'établissement d'une méthode permettant le suivi de réactions de marquage avec détermination du degré de marquage et séparation des différents conjugués fluorescents par électrophorèse capillaire, suivi d'une analyse des propriétés photophysiques des différents conjugués fluorescents.

Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
30.04.2012

Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
31.08.2012

Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de l'école /
Ende der Diplomarbeiten in den Labors der Schule:
13.07.2012

Défense orale / Mündliche Verteidigung:
dès la semaine 35 | ab Woche 35

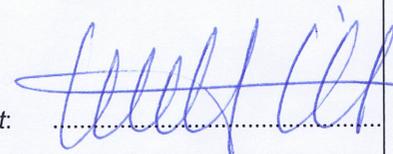
Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
17.08.2012 | 12h00

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

Responsable de la filière
Leiter des Studiengangs:



¹ Etudiant/Student:





Suivi de réactions de marquage fluorescent

Diplômant

Yvan Crittin

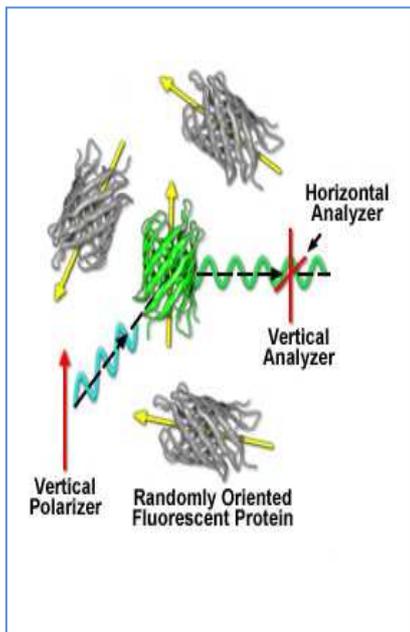
Objectif du projet

Établissement d'une méthode générique permettant le suivi de réactions de marquage fluorescent par mesure de l'anisotropie de polarisation de fluorescence (FPA).

Méthodes | Expériences | Résultats

Le principe de la méthode est basé sur l'augmentation de la masse molaire lorsqu'un fluorophore se fixe sur une protéine, ce qui résulte en une augmentation de l'anisotropie. Les expériences ont été effectuées sur le suivi du marquage du lysozyme de blanc d'œuf. Les mesures ont fourni la cinétique de réaction en fonction des concentrations et des ratios en réactifs, du pH et du solvant. La fluorescéine isothiocyanate (FITC), la fluorescéine succinimidyl ester (CFSE) et la carboxyrhodamine succinimidyl ester (ATTO 565) ont été choisies pour réagir avec les lysines des lysozymes.

Les expériences ont montré qu'un excès de protéines favorise le marquage à la différence d'un excès de marqueurs prédisposant l'hydrolyse. L'influence de celle-ci sur l'anisotropie a été minimisée en travaillant à un pH inférieur à 9 ou à des concentrations en réactifs élevées. Le marquage avec le CFSE, resp. l'ATTO 565, est 2 fois, respectivement 6 fois, plus rapide qu'avec le FITC. Le marquage optimal résulte de l'emploi du CFSE à pH 8.3 avec un excès de protéines. Ce travail démontre l'applicabilité du FPA pour l'optimisation de réactions de marquage.



Travail de diplôme
| édition 2012 |

Filière

Technologies du vivant

Domaine d'application

Chimie analytique

Professeur responsable

Prof. Dr. Jean-Manuel Segura

jmanuel.segura@hevs.ch



TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction	4
1.1 Généralités	4
1.2 Objectifs.....	4
1.3 Unités.....	5
1.4 Abréviations	5
1.5 Partie théorique.....	7
1.5.1 Introduction à la fluorescence	7
1.5.2 Caractéristiques de la fluorescence	7
1.5.3 Influences externes sur la fluorescence	8
1.5.4 Marquage d'une protéine	11
1.5.5 Anisotropie.....	15
2. Matériels et méthodes.....	18
2.1 Réactifs et préparation des solutions	18
2.1.1 Produits	18
2.1.2 Tampons	19
2.1.3 Solutions de marqueurs.....	19
2.1.4 Solutions de protéines	20
2.2 Matériel.....	21
2.3 Descriptifs des appareils analytiques	22
2.3.1 MD.....	22
2.3.2 Setup Hes.....	22
2.4 Méthode d'analyse.....	23
2.4.1 Préparation des dilutions	23
2.4.2 Principe d'analyse.....	23
2.4.3 Analyse sur l'effet de l'hydrolyse.....	23
2.4.4 Répétabilité et reproductivité des mesures	23
3. Résultats et discussions	24
3.1 Réaction de principe	24
3.2 Influence du pH.....	25
3.3 Effet de l'hydrolyse.....	26
3.4 Cinétique de réaction	28
3.5 Influence des concentrations et des ratios	31
3.6 Influences de la nature du solvant.....	32
3.7 Effet de l'agglomération des protéines	34
3.7.1 Essais de réaction avec le cytochrome c	35
3.7.2 Facteur Z sur la taille de l'essai.....	36

3.8	Reaction sur l'appareil Setup Hes	37
3.8.1	Réaction avec le FITC	37
3.8.2	Réaction avec l'ATTO 565	38
4.	Conclusion et perspectives	39
5.	Remerciements.....	40
6.	Bibliographie	40
7.	Annexes	42

1. INTRODUCTION

1.1 GÉNÉRALITÉS

Le lysozyme est connu pour être un protecteur naturel. Que ce soit dans le corps humain ou dans le blanc d'œuf, cette enzyme fonctionne comme un antimicrobien en détruisant la paroi cellulaire de certaines bactéries. En 1921, Alexander Fleming découvrit par hasard les propriétés intéressantes de cette protéine. En effet, il mit en contact un échantillon de muqueuse nasale d'un malade et une culture bactérienne. Celle-ci fut par surprise détruite [1]. Aujourd'hui, l'action du lysozyme sur les bactéries est connue, il hydrolyse les liaisons glycosidiques du peptidoglycane des parois des bactéries. Cependant, son activité antimicrobienne est non spécifique [2].

Dans le domaine médical, il a été observé une diminution de la concentration de lysozyme chez les nourrissons malades d'une dysplasie broncho-pulmonaire, provoquant ainsi des infections sérieuses chez les enfants [3]. Un autre exemple est la candidose oropharngée, une infection touchant le 90% des malades du SIDA. Une étude sur les antimicrobiens non spécifiques a permis d'observer une augmentation de la concentration en lysozyme dans la salive chez les patients VIH positifs. Cette concentration est encore plus importante chez les patients VIH positifs avec une candidose oropharngée [4].

Dans ce contexte, il est primordial de développer des méthodes d'analyse rapides, pratiques et disponibles. Après l'observation en 1845 de la fluorescence du sulfate de quinine par John Herschel, Jean Perrin découvrit la polarisation fluorescente en 1925 [5]. Au court du 20^{ème} siècle, cette méthode n'a cessé d'intéresser le monde chimique et biomoléculaire. En effet, sa sensibilité élevée de détection, son mode non invasif et la difficulté de manipuler des substances radioactives en font un mode d'analyse de choix. De plus, le développement des matériaux et des technologies réduisent de façon significative la taille des appareils. Ce détail n'est pas négligeable pour la commercialisation d'appareils domestiques ou professionnels moins encombrants.

1.2 OBJECTIFS

Ce travail de diplôme réside dans l'étude et l'optimisation de différentes méthodes d'analyse fluorescentes pouvant caractériser une protéine comme le lysozyme. Le principe réactif est l'utilisation d'un marqueur fluorescent capable de se lier à une protéine afin qu'elle devienne détectable. Parmi les objectifs initiaux décrits dans la donnée du travail de diplôme, seul la méthode utilisant l'anisotropie de polarisation de fluorescence a été étudiée. L'indisponibilité du système d'analyse n'a pas permis de travailler sur le mode par distribution d'intensité de fluorescence. En ce qui concerne la méthode par électrophorèse capillaire, un manque de temps en laboratoire a eu raison de son étude.

Concentré sur la cinétique de réaction, le travail en laboratoire a été organisé sur 11 semaines. L'étude d'une analyse de principe et des conditions optimales sur l'appareil conçu au sein de l'école a été effectuée avec deux sources lumineuses durant les semaines n°1 à 5. Pour cela, le FITC et l'ATTO 565 ont été utilisés sur le lysozyme. Pendant la seconde période, de la semaine n°6 à 11, l'appareil Molecular Devices étant disponible, les analyses se sont concentrées sur cet appareil avec les marqueurs CFSE et FITC au moyen d'une unique source LED. La recherche a été fournie, en parallèle, sur l'influence des paramètres extérieurs, comme l'hydrolyse du marqueur et l'agglomération des protéines. Ajouté en annexe A, un protocole développé expérimentalement propose une méthode de réglage de l'appareil conçu par l'école (Setup Hes).



1.3 UNITÉS

Tableau 1.1 : liste des unités citées dans ce rapport

Unité	Signification
h	heure
min	minute
s	seconde
ns	nanoseconde
mmol	10^{-3} mol
ml	10^{-3} litre
μ l	10^{-6} litre
mM	10^{-3} mol/l
μ M	10^{-6} mol/l
pM	10^{-12} mol/l

1.4 ABRÉVIATIONS

Tableau 1.2 : liste des abréviations citées dans ce rapport

Abréviation	Signification
I_{\parallel}	Intensité parallèle de l'émission polarisée
I_{\perp}	Intensité perpendiculaire de l'émission polarisée
v	vitesse de réaction
r	anisotropie
r_0	anisotropie initiale
r_{\max}	anisotropie maximum
Δr	différence d'anisotropie
I_a	intensité absorbée
I_f	intensité fluorescente
I_0	intensité incidente
I_T	intensité totale
I_x	intensité dans le prolongement de la source
I_y	intensité perpendiculaire à la source
I_z	intensité parallèle à la source
k	constante de vitesse de la réaction principale
k_H	constante de vitesse de la réaction d'hydrolyse
k'	constante de vitesse de pseudo-premier ordre
$t_{1/2}$	temps de demi-vie
$r_{1/2}$	anisotropie à la demi-vie
Θ	déplacement angulaire de l'axe z

Φ	rendement quantique
ϕ	déplacement angulaire de l'axe y
ε	coefficient d'extinction
τ	temps de vie d'un fluorophore
FITC	fluorescéine isothiocyanate
FP	fluorescence polarisée
ATTO 565	rhodamine succinimidyl ester
CFSE	fluorescéine succinimidyl ester
MD	appareil Molecular Devices
Setup Hes	appareil Hes-so//Valais
DMSO	diméthylsulfoxyde
H ₂ O	eau déminéralisée
C	concentration molaire [M]
l	trajet optique [cm]
FRET	transfert d'énergie par fluorescence résonante
LED	diode électroluminescente
V	volume hydraté
η	viscosité du solvant
T	température de la solution
t	coefficient de Student
R	constante de Boltzmann

1.5 PARTIE THÉORIQUE

1.5.1 INTRODUCTION A LA FLUORESCENCE

La fluorescence, avec la phosphorescence, appartient au groupe de la photoluminescence provenant de la grande famille de la luminescence. Par la suite d'une excitation lumineuse, une molécule procède à des transitions radiatives et non radiatives d'un niveau d'énergie élevé à un niveau d'énergie inférieur. La fluorescence est une transition radiative, c'est-à-dire que la matière émet un photon. A la différence de la phosphorescence, le rayonnement fluorescent émet beaucoup plus rapidement, seulement quelques ns, après l'extinction de la radiation par une source lumineuse. L'autre grande différence entre les deux photoluminescences est l'état excité singulet pour la fluorescence et l'état excité triplet pour la phosphorescence. Dans le cas de la plupart des molécules, la perte se produit par transfert d'énergie ou de matière aux molécules voisines ou par conversion interne. A noter que la plupart des fluorophores sont composés de molécules aromatiques. Cependant, les molécules voisines en contact ne sont pas toujours capables d'absorber cette grande énergie afin de permettre un retour à l'état électronique fondamental. Dans ces conditions, la molécule initiale peut d'avantage émettre sous forme de rayons lumineux [6].

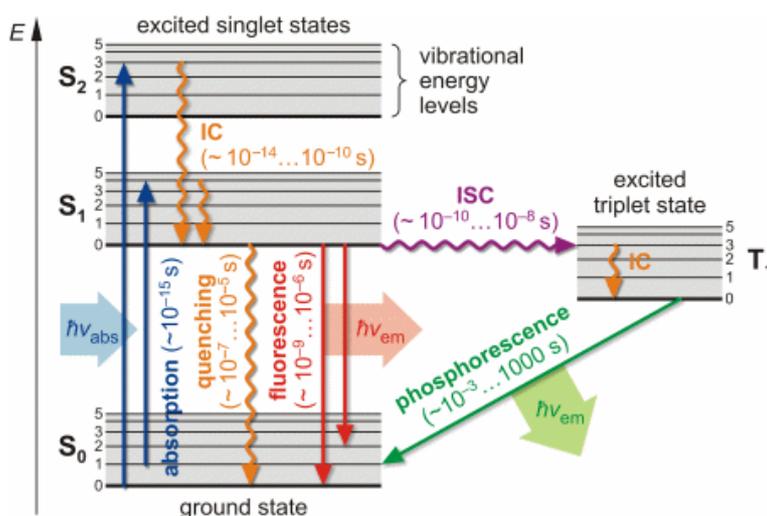


Figure 1.1 : diagramme d'énergie de Jablonski [7]

1.5.2 CARACTERISTIQUES DE LA FLUORESCENCE

1.5.2.1 RENDEMENT QUANTIQUE ET COEFFICIENT D'EXTINCTION

Le rapport du nombre de photons émis par fluorescence et le nombre de photons absorbés par la molécule détermine le rendement quantique (Φ) [8]. En général, cette valeur des fluorophores se situent entre 0.1 et 1.

$$\Phi = \frac{I_f}{I_a} \quad (1.1)$$

Le coefficient d'extinction (ε) exprime le potentiel d'absorption du fluorophore. Plus ε est grand, plus la fluorescence à intensité lumineuse incidente égale est grande. L'intensité de la fluorescence, c'est-à-dire la brillance, est le résultat de la multiplication de Φ et de ε. L'intensité fluorescente est proportionnelle à l'intensité incidente, à la concentration du fluorophore, au trajet optique, au rendement quantique et au coefficient d'extinction [9].

$$I_f = 2.3 \cdot I_0 \cdot C \cdot \epsilon \cdot \Phi \cdot l \quad (1.2)$$

Le tableau suivant présente la brillance des fluorophores utilisés pour le travail de diplôme.

Tableau 1.1 : liste des marqueurs avec leur brillance

Molécule	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]	Φ	Brillance (unité arbitraire)
FITC	70'000	0.9	63'000
NHS	70'000	0.9	63'000
ATTO 565	120'000	0.9	108'000

1.5.2.2 TEMPS DE VIE

Ce temps correspond à la durée à laquelle un fluorophore se maintient à l'état excité. Généralement, ce temps est de quelques ns. La fluorescence est d'autant plus sensible que son temps de vie est court. En effet, cela permet un nombre de transitions plus important pendant son temps de vie. Le temps à l'état excité dépend du pH et du milieu où se trouve la molécule [10]. Les temps de vie du FITC, du NHS et de l'ATTO sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 1.2 : liste des marqueurs avec leur temps de vie

Molécule	τ [ns]
FITC	4
NHS	4
ATTO 565	4

1.5.3 INFLUENCES EXTERNES SUR LA FLUORESCENCE

1.5.3.1 SOLVANT

Un fluorophore a un moment dipolaire plus important à l'état excité qu'à l'état fondamental. Un solvant polaire diminue et stabilise l'énergie de l'état excité de la molécule. Dans ce contexte, un solvant polaire influence la baisse d'énergie. La stabilité de l'état excité correspond à des longueurs d'onde plus élevées. Avec un solvant apolaire comme l'hexane, le déplacement d'énergie est négligeable et la longueur d'onde d'émission plus faible. Les molécules non polaires ont une sensibilité plus faible aux solvants polaires. Pour comparaison, l'absorption n'est pas influencée par la polarité du solvant car le temps d'excitation est trop court (10^{-15} s) [8].

Le solvant peut interagir avec le soluté de façon différente dans l'état fondamental et dans l'état excité. Comme le solvant peut avoir un temps de retard de réarrangement, l'absorption d'énergie se situe dans un environnement où le solvant est à l'état fondamental. Par contre pour l'émission fluorescente, l'environnement est influencé par un état excité du solvant [6].

En règle générale, la fluorescence émet à des longueurs d'onde supérieures à celles du rayon incident. En effet, l'émission rayonnante se produit après avoir perdu une certaine quantité d'énergie dans le solvant. La capacité fluorescente de la molécule dépend, donc, fortement de l'aptitude du solvant à absorber cette énergie vibrationnelle par collision. Cette dissipation explique en grande partie la différence entre les longueurs d'onde dans le visible pour l'émission (vert, orange) et les longueurs d'onde dans la région du bleu et des UV pour l'absorption [6].

1.5.3.2 TEMPERATURE

En baissant la température, l'intensité fluorescente augmente car le rendement quantique est plus performant [9]. Par ailleurs, la diminution de la température combat l'effet du quenching dynamique de façon significative en freinant les collisions des molécules voisines.

1.5.3.3 PH

L'intensité fluorescente dépend fortement du pH. En milieu acide, la fluorescéine est protonée et possède une charge positive. Son intensité fluorescente est très faible. A pH basique, la molécule est déprotonée et émet une forte intensité [8]. Cette différence de charge a une influence sur les autres processus non radiatifs au détriment du rendement quantique [9].

Le pH influence l'hydrolyse du marqueur. La formation de produits secondaires est favorisée par un milieu fortement basique.

1.5.3.4 LIAISON HYDROGENE

Les hétéroatomes (O ou S) composant les groupes isothiocyanate et succinimidyl ester possédant des doublets libres, ont la capacité de se lier à des protons disponibles dans le solvant. L'hydrolyse dépend fortement de la nature et du pH du solvant. Le marqueur réagit avec l'eau en étant catalysé par les OH⁻. Cette réaction est non négligeable à un pH supérieur à 9. La réaction d'hydrolyse possède un ordre global 2 mais est modifiée en pseudo-ordre 1 du fait de la présence de l'eau toujours en excès. Cette action entraîne la création de produits secondaires et une diminution des capacités de marquage [11]. Pour cette raison, les marqueurs sont stockés en solution avec un solvant étant exempt d'eau, donneur d'hydrogène. Les figures suivantes présentent les réactions pouvant former des produits secondaires.

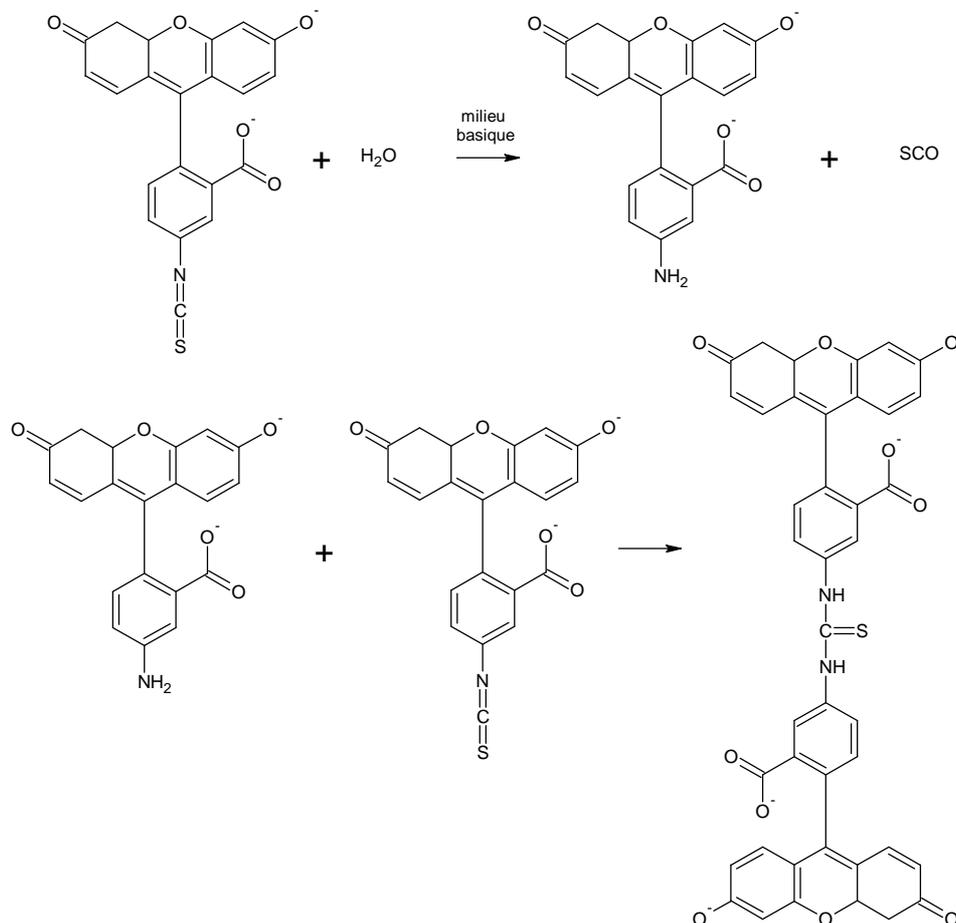


Figure 1.2 : réaction d'hydrolyse en deux étapes sur le FITC formant une difluorescéine thiourée [11]

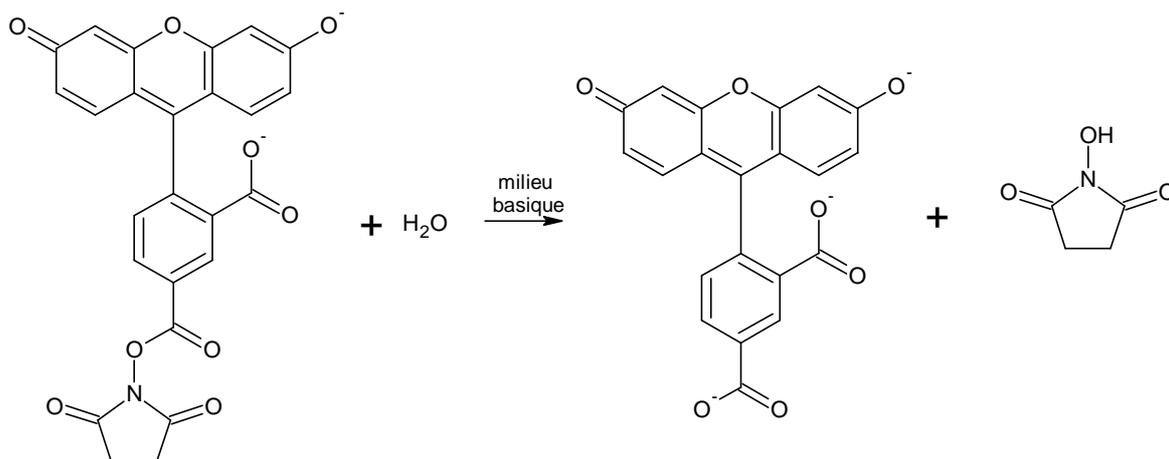


Figure 1.3 : réaction d'hydrolyse sur le CFSE formant un 5-carboxyfluorescéine [11]

1.5.3.5 QUENCHING

L'intensité de fluorescence peut être affaiblie par l'effet du quenching entre le marqueur et une autre molécule (quencher), il se produit un transfert d'énergie ou une transformation lors de la collision des deux molécules. Le résultat du phénomène est un retour à l'état fondamental avec une diminution d'émission lumineuse. L'oxygène, les halogènes et les amines sont connus pour être des quenchers de tous les fluorophores [8].

Lors d'un quenching dynamique, par collision, l'état excité d'un fluorophore est désactivé par le contact avec une autre molécule. Le quenching statique est la formation d'un complexe non fluorescent entre le fluorophore et le quencher [8].

La méthode par transfert d'énergie par fluorescence résonante (FRET) utilise le quenching dynamique en provoquant un transfert d'énergie sur une molécule voisine aussi marquée. Selon la distance entre les deux entités marquées, la couleur d'émission est différente [12].

1.5.4 MARQUAGE D'UNE PROTEINE

1.5.4.1 REACTIFS

Une molécule, avec des propriétés fluorescentes, est additionnée à une autre molécule n'ayant pas ces propriétés lumineuses. De cette façon indirecte, la protéine est détectable par fluorescence. Le marquage permet de quantifier ou qualifier certaines molécules selon le mode choisi (FP, FCS, FRET,...). Les molécules fluorescentes présentées ci-dessous sont celles utilisées dans le travail comme marqueurs.

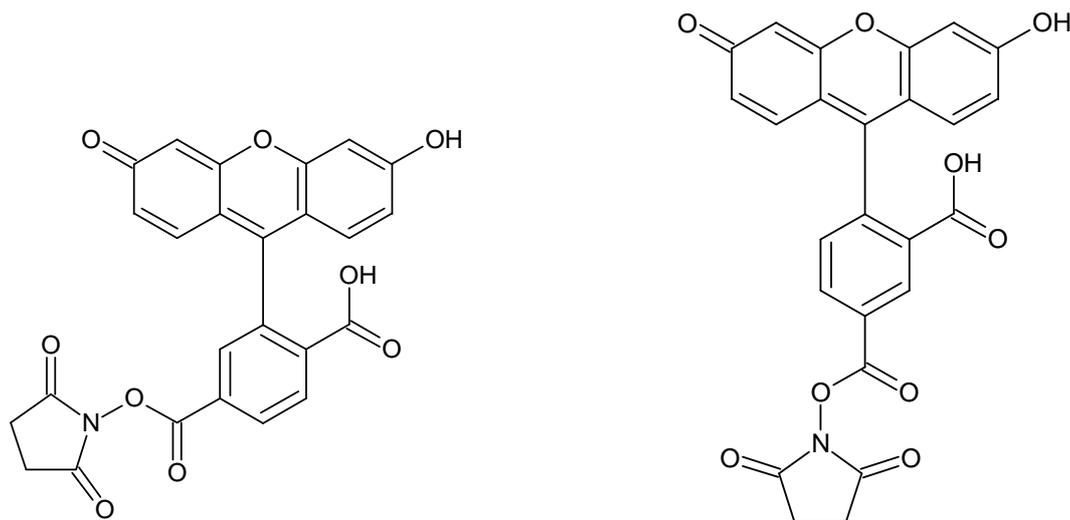


Figure 1.4 : molécules de la 5 (et 6)-carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE)

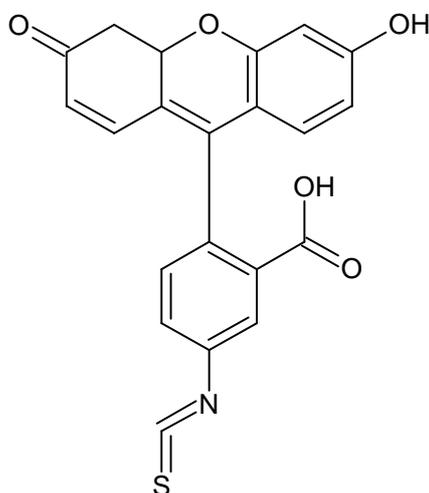


Figure 1.5 : molécule de la carboxyfluorescéine-5-isothiocyanate (FITC)

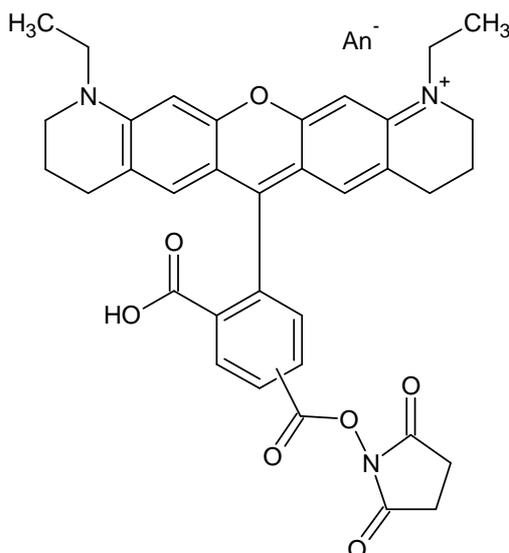


Figure 1.6 : molécule du carboxyrhodamine succinimidyl ester (ATTO 565)

Pour chaque marqueur, la structure de base est identique. La propriété fluorescente est réalisée par la partie aromatique, comme par exemple la fluorescéine. Le groupe fonctionnel, lié à cette partie fluorescente, a la fonction de réagir avec les sites ciblés de la protéine. Selon les besoins du marquage, le groupe fonctionnel est différent. Les groupes succinimidyl ester ou isothiocyanate sont choisis afin réagir avec les amines primaires sur la chaîne latérale de la lysine.

Le lysozyme est une protéine provenant du blanc d'œuf de poulet. Les 19 premiers acides aminés ont la fonction du signal de peptide. La chaîne principale est composée de 129 acides aminés dont 6 lysines et 4 ponts disulfures [13]. La figure suivante représente les différentes configurations présentes le long de la chaîne.

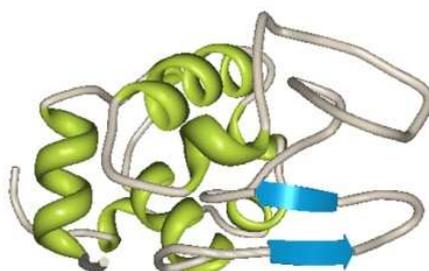


Figure 1.7 : structure du lysozyme du blanc de poulet [14]

MRSLLILVLC FLPLAALG**K**V FGRC**E**LAAAM **K**RHGLDNYRG YSLGNWV**C**AA **K**FESNFNTQA
 TNRNTDGSTD YGILQINSRW W**C**NDGRT**P**GS RNLC**N**IP**C**SA LLSSDITASV **N**CA**K**K**I**VSDG
 NGMNAWVAWR NR**C****K**GT**D**VQA WIRG**C**R**L**

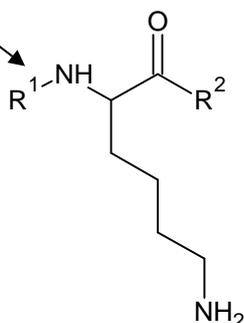


Figure 1.8 : séquence du lysozyme provenant du blanc d'œuf de poulet [13] avec le détail de la lysine

1.5.4.2 AGGLOMERATION DES PROTEINES

L'agglomération est un phénomène connu lors du processus de cristallisation des protéines. Le comportement des molécules dépend du pH, de la température et des concentrations en sel et en protéines. Dans une solution où la force ionique est faible, les protéines interagissent entre elles pour produire des plus grosses molécules [15]. Cette action influence le résultat de l'anisotropie d'une réaction.

En réglant la concentration en NaCl à 500 mM, la force ionique augmente. En ajoutant un surfactant comme le tween 20, la protéine et la micelle forment un complexe [16] pouvant limiter l'agglomération.

1.5.4.3 REACTION

L'azote sur la chaîne latérale de la lysine possède un potentiel réactif intéressant car il est considéré comme étant un bon nucléophile avec son doublet libre. Pour le marqueur, le carbone électrophile de l'isothiocyanate ou du succinimidyl ester a une densité électrique faible du fait du lien par une double liaison à un hétéroatome. Les figures 1.9 et 1.10 présentent le mécanisme employant les deux différents groupes fonctionnels FITC et NHS.

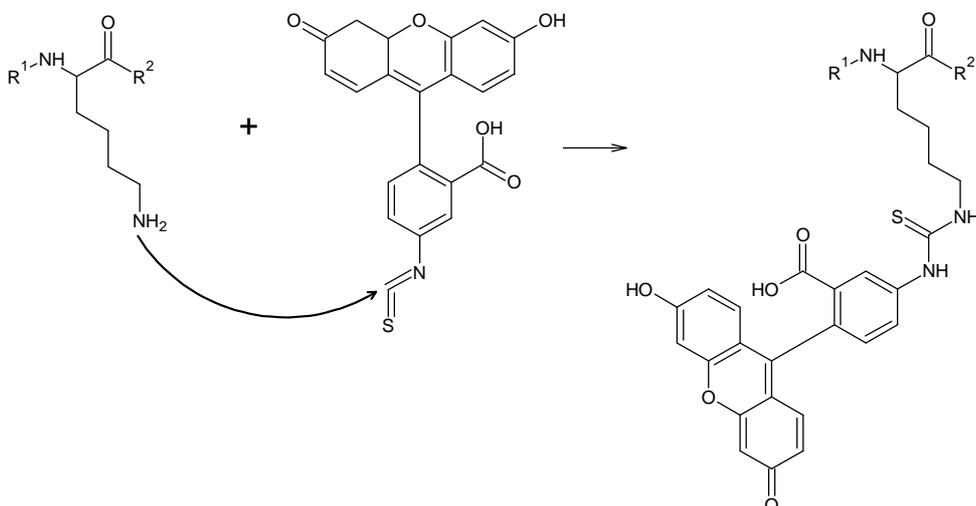


Figure 1.9 : attaque de groupe amino ϵ sur le carbone de l'isothiocyanate (FITC) pour former une liaison thiourée [17]

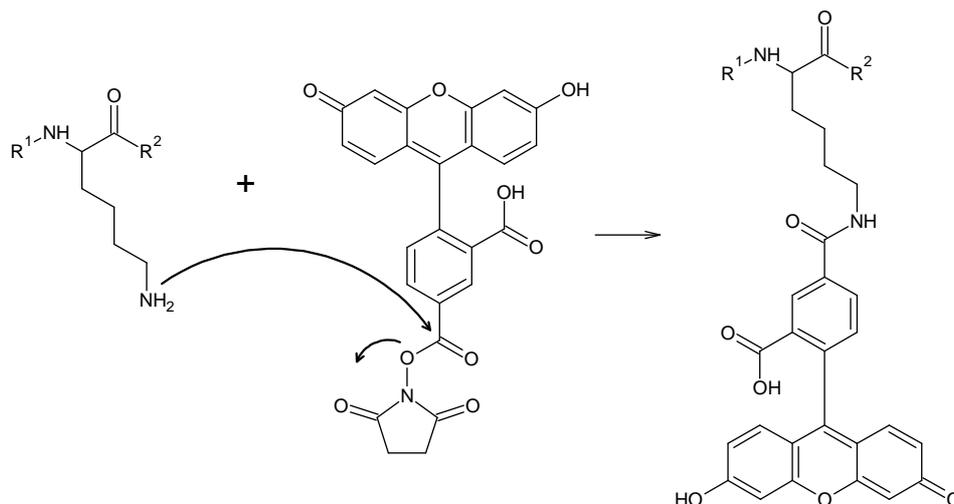


Figure 1.10 : attaque de groupe amino ϵ sur le carbone du succinimidyl ester (CFSE) pour former une liaison carboxamide [17]

1.5.4.4 CINÉTIQUE DE REACTIONS

Le groupe amino sur la chaîne latérale est déprotoné dans un milieu fortement basique car son pK_a se situe à 10.5. Le point isoélectrique à 9.7 de la lysine est calculé avec la moyenne du pK_a cité et celui du groupe amino α à pK_a 9.0 [17]. Le choix du pH de marquage influence la constante de vitesse de la réaction.

Dans le cas d'une réaction de marquage, la réaction principale et la réaction d'hydrolyse suivent la loi de vitesse d'ordre global 2. A pH inférieur à 9, l'hydrolyse est minimisée et la vitesse de réaction correspond à l'équation suivante.

$$v = k \cdot [\text{marqueur}] \cdot [\text{lysozyme}] \quad (1.3)$$

A pH supérieur à 9, l'influence de l'hydrolyse est significative et s'ajoute à l'équation mentionnée ci-dessus [11].

$$v = k \cdot [\text{marqueur}] \cdot [\text{lysozyme}] + k_H \cdot [\text{OH}^-] \cdot [\text{marqueur}] \quad (1.4)$$

Malgré une grande sensibilité fluorescente et une limite de détection au niveau de pM [11], les concentrations de travail sont du domaine du μM afin de favoriser la réaction principale (eq. 1.3). D'un pH 7.4 à un pH 11.3, la concentration en hydroxyde varie de 2.5×10^{-7} M à 0.002 M. Le principe est d'obtenir une concentration en réactifs supérieure à celle des OH^- ou de travailler à un pH inférieur à 9.

Les constantes de vitesse sont déterminées à l'aide de deux formules selon le rapport des concentrations entre les deux réactifs. Dans le premier cas, l'utilisation de la méthode d'isolement d'Ostwald facilite la résolution de l'ordre global 2 en pseudo-ordre 1 [6]. La concentration initiale du lysozyme ou d'eau en excès, étant considérée fixe, est intégrée à la constante de vitesse. A souligner que la concentration en lysine est six fois plus grande que la concentration en lysozyme.

$$v = k' \cdot [\text{marqueur}] \quad (1.5)$$

$$k' = k \cdot [\text{lysozyme}]_0 \quad (1.6)$$

$$k'_H = k_H \cdot [\text{eau}]_0 \quad (1.7)$$

La méthode avec le $t_{1/2}$ pour un ordre global 1 est utilisée afin de déterminer les constantes de vitesse.

$$k' = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (1.8)$$

$$k = \frac{k'}{[\text{lysine}]_0} \quad (1.9)$$

Finalement, le suivi de l'anisotropie peut être déterminé par l'équation suivante.

$$[\text{produit}] = [\text{marqueur}] \cdot (1 - \exp(-kt)) \quad (1.10)$$

$$r = (r_{\max} - r_0) \cdot (1 - \exp(-kt)) \quad (1.11)$$

Dans le deuxième cas, les concentrations des réactifs sont identiques. La réaction s'applique comme étant d'un ordre global 2 et d'un ordre 2 par rapport au marqueur [6].

$$v = k \cdot [\text{marqueur}]^2 \quad (1.12)$$

La constante de vitesse est déterminée à l'aide de la méthode avec le $t_{1/2}$.

$$k = \frac{1}{t_{1/2} \cdot [\text{marqueur}]_0} \quad (1.13)$$

1.5.5 ANISOTROPIE

Une source lumineuse est polarisée et alignée sur l'axe z. Un échantillon excité par cette lumière polarisée émet une lumière polarisée. A l'état fondamental, les molécules sont orientées de façon aléatoire. Lorsqu'une lumière polarisée excite un fluorophore immobile et dont son moment dipolaire est orienté sur l'axe z, l'émission a une intensité parallèle maximale à cet axe. Cela veut dire qu'à l'état excité, la totalité des molécules sont orientées sur le vecteur électrique. En réalité, les molécules immobiles dans une solution ont différentes orientations, ce qui diminue l'intensité d'émission alignée sur l'axe z. Des molécules mobiles et orientées dans toutes les directions ont une intensité d'émission encore plus faible [8]. Finalement, les intensités parallèle et perpendiculaire à l'axe z sont mesurées par un détecteur de photons.

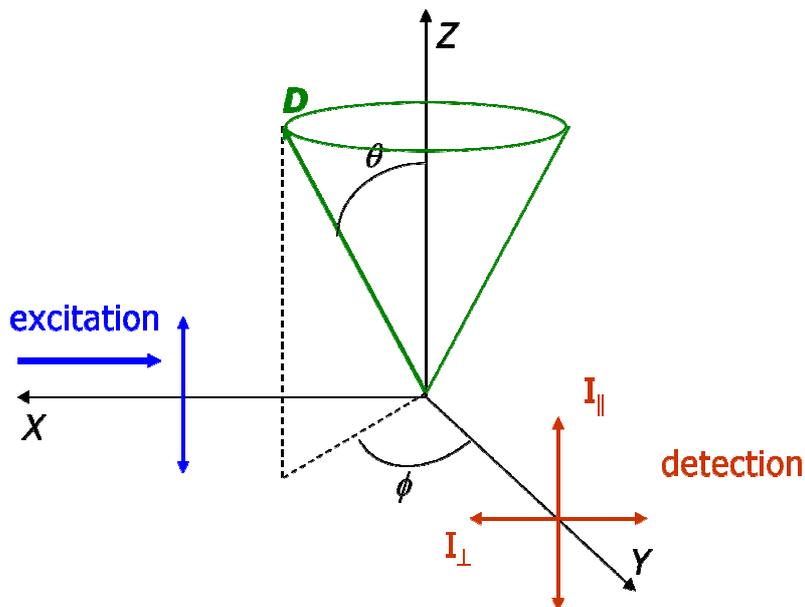


Figure 1.11 : schéma de principe de la fluorescence polarisée (FPA) [18]

L'anisotropie est calculée à partir des intensités des polarisateurs parallèle et perpendiculaire à la lumière d'excitation polarisée. Elle est définie comme étant le ratio entre la composition polarisée et l'intensité totale. Les intensités d'émission correspondent à l'angle moyen (Θ) de la molécule entre l'absorption et l'émission d'un photon. L'intensité totale est composée de l'intensité parallèle (z) et des intensités perpendiculaires (x et y). Les équations suivantes expriment le lien entre r et les intensités [8]. La figure 1.12 schématise toutes les intensités sur les trois axes.

$$I_{\text{total}} = I_x + I_y + I_z = 2I_{\parallel} + 4I_{\perp} \quad (1.14)$$

$$I_{\text{total}} = I_x + I_y + I_z = 2I_{\parallel} + 4I_{\perp} \quad (1.15)$$

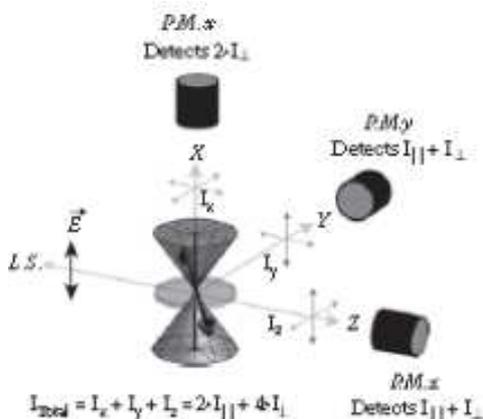


Figure 1.12 : distribution des intensités sur les trois axes [19]

La valeur r peut être exprimée avec les déplacements angulaires (fig. 1.11) entre les moments d'excitation et d'émission dans les équations suivantes [8].

$$I_{\parallel} \approx \cos^2\theta \quad (1.16)$$

$$I_{\perp} = \sin^2\theta \cdot \sin^2\phi \quad (1.17)$$

$$r = \frac{3 \cdot \cos^2\theta - 1}{2} \quad (1.18)$$

En théorie, dans le cas où la lumière est complètement polarisée et les molécules sont immobiles et parfaitement alignées sur l'axe z , l'intensité perpendiculaire est égale à zéro et l'intensité parallèle est égale à 1, ce qui amène à dire que r est maximal avec une valeur de 1. Dans la réalité, les différentes orientations des molécules immobiles imposent une valeur maximale de 0.4 en rapport avec les angles de déplacement. Dans une situation où la molécule est mobile, un angle de 54.7° de l'axe des z provoque un r de 0. Un angle de 0° signifie un r de 0.4 et si θ est supérieur à 54.7° , r est négatif. A la valeur de 90° , r atteint sa limite inférieure de -0.2. En résumé, le domaine de mesure pour r se situe entre -0.2 et 0.4 lorsque l'échantillon est en solution isotropique et l'excitation est provoquée par un unique photon [8].

La vitesse de rotation d'un fluorophore dépend de la viscosité du solvant, du volume de la molécule et de la température [8].

$$r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\eta V} \right)} \quad (1.19)$$

En résumé, les petites molécules dans un solvant peu visqueux ont une grande vitesse de rotation. Dans ces conditions, l'émission est presque dépolarisée et r est proche de zéro. Dans le cas où la molécule est plus grosse, elle a une vitesse de rotation plus lente. Elle absorbe plus ou moins la lumière polarisée selon son niveau d'immobilité et son alignement. Plus la molécule est grosse, plus l'anisotropie de celle-ci tend vers 0.4.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 RÉACTIFS ET PRÉPARATION DES SOLUTIONS

2.1.1 PRODUITS

Les matières premières, figurées dans le tableau-ci-dessous, sont à disposition dans le stock des laboratoires ou commandées par l'école chez le fournisseur.

Tableau 2.1 : liste des réactifs et des solvants utilisés

Produits	Fabricant	N° de produit	Masse molaire [g/mol] / pureté [%]	Formule brute
Lysozyme du blanc d'œuf de poulet	Sigma-Aldrich	L6876-1G	14307	---
Cytochrome c du cœur de poulet	Sigma-Aldrich	C2037-50MG	12327	---
Fluorescéine	Fluka	46960	376.3	C ₂₀ H ₁₀ Na ₂ O ₅
Fluorescéine isothiocyanate isomère I	Sigma-Aldrich	F7250-50MG	389.4	C ₂₁ H ₁₁ NO ₅ S
NHS-fluorescéine	Thermo scientific	46410	473.4	---
ATTO 565 NHS-ester	ATTO-TEC GmbH	AD 565-35	708	---
Glycérol	Sigma-Aldrich	49770-1L	≥ 99.5	C ₃ H ₈ O ₃
Hydrogénocarbonate de sodium	Fluka	71627	≥ 99.5	NaHCO ₃
Carbonate de sodium monohydraté	Riedel-de Haën	13568	---	Na ₂ CO ₃ ·H ₂ O
Acide borique	Fluka	15660	61.83 / >99.5	H ₃ BO ₃
Hydroxyde de sodium en microperles	Cochimy	18100-155	98-100	NaOH
Diméthylsulfoxyde	Acrôs organics	295520010	≥ 99.8	C ₂ H ₆ OS
Chlorure de sodium	Sigma-Aldrich	31434-1KG-R	58.44 / ≥ 99.8	NaCl
Chlorure de potassium	Carlo Erba Reagents	471177	74.55 / 99-100.5	KCl
Hydrogénophosphate de sodium	Fluka	71640	141.96 / ≥99	Na ₂ HPO ₄
Hydrogénophosphate de potassium	Fluka	60230	136.09 / ≥99	KH ₂ PO ₄
Polysorbate 20	Hes-so, 8.11.07	---	1227.54	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆
Solution NaOH 10%	Hes-so	---	10	NaOH

2.1.2 TAMPONS

La plupart des solutions de protéines ont été préparées le jour des analyses. Cependant, il est arrivé que certaines de ses solutions soient réutilisées quatre jours au maximum après leur préparation. Les solutions de marqueurs, étant relativement stables, n'ont pas été renouvelées à chaque fois.

Pour chaque solution, les composés ont été préparés dans un becher, pesés sur une balance technique ou analytique puis dilués dans l'eau déminéralisée. La solution a été transvasée dans un ballon et complétée au trait de jauge avec l'eau déminéralisée. Avec un contrôle au pH mètre, le pH a été ajusté, selon les besoins, avec une solution de NaOH à 10%. Les tampons ont été stockés dans leur ballon initial à température inférieure à 4°C.

Tampons à pH 7.4 (PBS)

8.17 g (0.14 mol) de NaCl, 0.24 g (3.2 mmol) de KCl, 0.28 g (2.0 mmol) de Na₂HPO₄ et 1.39 g (0.01 mol) de KH₂PO₄ ont été pesés et transférés dans un ballon jaugé de 1 litre.

Tampon à pH 8.3 (PBS)

8.17 g (0.14 mol) de NaCl, 0.24 g (3.2 mol) de KCl, 0.28 g (2.0 mol) de Na₂HPO₄ et 1.39 g (0.01 mol) de KH₂PO₄ ont été pesés et transférés dans un ballon jaugé de 1 litre.

Tampon à pH 8.3 (PBS Tween)

29.22 g (0.50 mol) de NaCl, 0.24 g (3.2 mol) de KCl, 0.28 g (2.0 mol) de Na₂HPO₄ et 1.39 g (0.01 mol) de KH₂PO₄ ont été pesés et transférés dans un ballon jaugé de 1 litre. 0.01% (v/v) de solution de Tween 20 ont été ajoutés.

Tampon à pH 9.1

175 mg (4.4 mmol) de NaOH et 623 mg (0.01 mol) de H₃BO₃ ont été transférés dans un ballon jaugé et complétés à 200 ml.

Tampon à pH 11.3

180 mg (4.5 mmol) de NaOH et 623 mg (0.01 mmol) de H₃BO₃ ont été transférés dans un ballon jaugé et complétés à 200 ml.

2.1.3 SOLUTIONS DE MARQUEURS

Les fluorophores à l'état solide ont été immédiatement manipulés dès la sortie de congélateur. La poudre a été transférée dans un ballon jaugé, pesée sur la balance analytique et complétée avec le DMSO au trait de jauge. Ensuite, la solution a été préparée en aliquotes d'environ 1.5 ml puis stockée au congélateur.

Tableau 2.2 : liste de préparation pour chaque solution-mère des marqueurs

N° de solution	Date de préparation	Molécule	Quantité [mg]	Volume [ml]	C [µM]	Solvant
M1	03.05.12	Fluorescéine	36.5	100	970	H ₂ O
M2	15.05.12	FITC	1.3	20	172	H ₂ O
M3	21.05.12	FITC	1.9	20	244	DMSO
M4	24.05.12	FITC	1.8	20	231	DMSO
M5	05.06.12	ATTO 565	0.9	10	126	DMSO
M6	13.06.12	FITC	1.8	20	231	DMSO

M7	15.06.12	FITC	1.8	20	231	DMSO
M8	19.06.12	FITC	2.1	20	270	DMSO
M9	27.06.12	NHS	15.9	10	3.36 x 10 ³	DMSO
M10	05.07.12	FITC	13.2	10	3.39 x 10 ³	DMSO
M11	05.07.12	NHS	16.4	10	3.46 x 10 ³	DMSO

2.1.4 SOLUTIONS DE PROTÉINES

Dans le même principe que les marqueurs, les protéines ont été préparées dans des ballons jaugés et stockées en aliquotes au frigo. La différence réside dans une dilution lente sans mélange brusque afin d'éviter l'apparition de mousse à la surface du liquide.

Tableau 2.3 : liste de préparation pour chaque solution-mère des protéines

N° de solution	Date de préparation	Molécule	Quantité [mg]	Volume [ml]	C [μM]	Tampon
P1	15.05.12	Lysozyme	29.5	10	206	pH 9.1
P2	21.05.12	Lysozyme	30.9	10	216	pH 9.1
P3	24.05.12	Lysozyme	30.2	10	211	pH 9.1
P4	13.06.12	Lysozyme	29.2	10	204	pH 7.4
P5	13.06.12	Lysozyme	28.9	10	202	pH 8.3
P6	13.06.12	Lysozyme	29.8	10	208	pH 9.1
P7	13.06.12	Lysozyme	29.6	10	207	pH 11.3
P8	27.06.12	Lysozyme	55.4	10	387	pH 8.3
P9	03.07.12	Lysozyme	27.5	10	192	pH 8.3
P10	04.07.12	Lysozyme	53.2	10	372	pH 8.3
P11	05.07.12	Lysozyme	48.7	10	340	pH 8.3/ 9.1
P12	09.07.12	Lysozyme	5.0	2	175	pH 8.3/ 9.1
P13	09.07.12	Cytochrome	4.4	2	178	pH 8.3/ 9.1

2.2 MATÉRIEL

Le tableau suivant présente l'inventaire des appareils analytiques et de mesure, des supports d'échantillon et du matériel pour la préparation des dilutions.

Tableau 2.4 : liste des appareils et des fabricants

Appareils	Fabricant	N° d'appareil	Programme
Spectrophotomètre	Molecular Devices	SpectraMax Paradigm®	SoftMax Pro 6.2
pH mètre	Methrohm	827 pH lab	---
Voltmètre	Metra Hit	26M	---
Balance analytique	Mettler	AE 240	---
Vortex	Scientific Industries	Vortex-genie 2	---
Multiplaques	Thermo Scientific	Nunc F96	---
Microscope	Olympus	IX71	---
Laser Helium Néon	Melles Griot	LGX1	---
LED	Thorlabs	---	---
Objectif 40x	Olympus	LCAchN 40xPhP	---
Microtubes	Axygen	MCT-175-C	---
Pipette 20-200 µL	HTL Lab Solutions	DV200	---
Pipette 100-1000 µL	HTL Lab Solutions	DV1000	---
Tips 1-200 µL	Axygen	T-200-Y	---
Tips 200-1000 µL	Ratiolab	2100610	---

2.3 DESCRIPTIFS DES APPAREILS ANALYTIQUES

2.3.1 MD

Les images suivantes présentent les appareils utilisés pendant la période des expériences. Sur l'image 2.1, le spectrophotomètre consiste principalement à une cartouche intégrant la source lumineuse et le détecteur et à un compartiment pour l'insertion des microplaques. L'unique source disponible sur cet appareil est la LED.



Image 2.1 : vue d'ensemble de l'appareil Molecular Devices (MD)

2.3.2 SETUP HES

L'image 2.2 présente le dispositif monté et conçu dans le cadre de l'école. Les sources lumineuses disponibles sont la LED et le laser. L'intensité du rayon est réglée par des filtres OD pour le laser et par un réglage d'intensité pour la LED en amont du microscope.

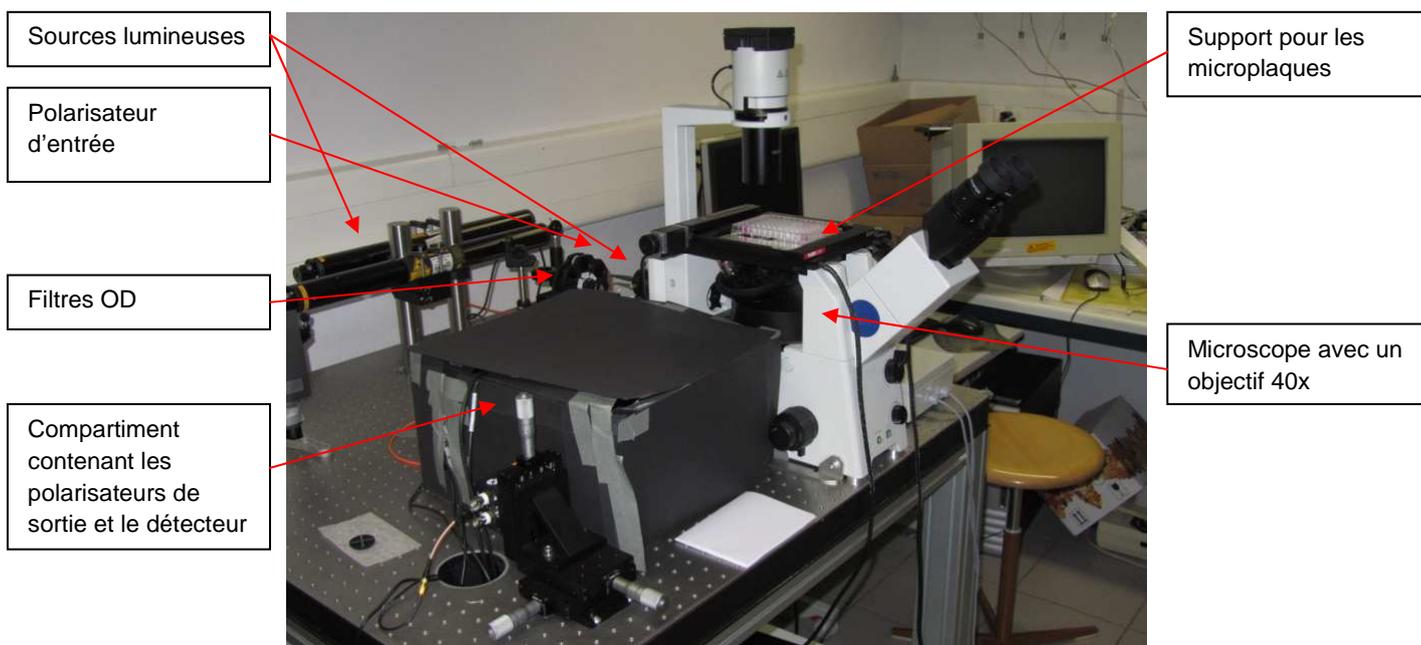


Image 2.2 : vue d'ensemble de l'appareil Setup HES

2.4 METHODE D'ANALYSE

2.4.1 PREPARATION DES DILUTIONS

Les manipulations ont été effectuées avec des gants de laboratoire. Pour chaque préparation, les solutions-mère ont été placées en attente à température ambiante pendant 15 min avant de pouvoir les utiliser. Cela pour décongeler les solutions contenant le DMSO et stabiliser tous les réactifs à la même température. Avant le pipetage, l'échantillon a été vortexé pendant 3 s. A la suite de l'homogénéisation, le liquide a été immédiatement pipeté selon les besoins. Lors de l'emploi des microtubes, ceux-ci ont été ouverts juste avant le transfert puis refermés afin d'éviter toutes contaminations. Dans le but d'être systématique, la dilution a été effectuée en pipétant, en premier, la solution concentrée puis en complétant avec le solvant. Les microtubes ont été placés à température ambiante sur un support désigné à cet effet et couverts par une feuille d'aluminium.

2.4.2 PRINCIPE D'ANALYSE

Le support d'analyse est la microplaque de type 96 puits. Le volume de liquide s'élève à 200 μ l, ce qui permet d'obtenir une surface perpendiculaire au faisceau lumineux et une hauteur de liquide significatives pour régler l'immersion totale de la focale dans la solution. Lors de l'emploi du Setup Hes, le rayon d'excitation atteint l'échantillon en-dessous du support à la différence du MD, où le rayon arrive depuis le dessus. L'origine du rayon impose d'avoir utilisé des microplaques transparentes pour le Setup Hes et des microplaques noires pour le MD. Le protocole de réglage en annexe A fournit les détails pour la préparation de l'appareil Setup Hes.

Pour une analyse type, 100 μ l de la solution de marqueurs ont été pipetés dans le puits. Juste avant de débiter l'analyse, 100 μ l de la solution de lysozymes ont été transférés et mélangés au marqueur dans le puits.

2.4.3 ANALYSE SUR L'EFFET DE L'HYDROLYSE

50 μ l du tampon ont été ajoutés à 50 μ l de la solution de marqueurs dans les six puits désignés pour l'analyse en série. Chaque 10 min, 100 μ l de la solution de protéines ont été ajoutés à un seul puits. Cette opération a été effectuée pour chaque puits afin d'observer l'évolution de r sans et avec la protéine.

2.4.4 REPETABILITE ET REPRODUCTIVITE DES MESURES

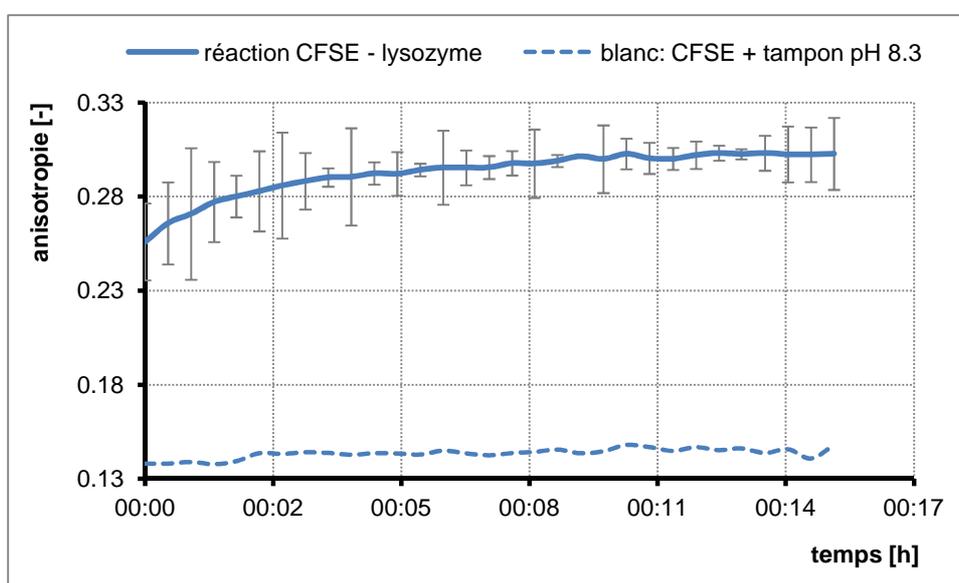
Toutes les manipulations et les préparations ont été effectuées par la même personne. Pour la plupart des essais, la mesure a été répétée une à deux reprises avec, à chaque fois, un échantillon différent. Les échantillons à analyser ont été préparés dans les différents puits avec les mêmes solutions-mère mais avec les mêmes manipulations de dilution. Les expériences se sont basées sur la reproductivité des résultats en modifiant les paramètres comme la nature et le pH du tampon, les concentrations, les ratios et les appareils de mesure.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les expériences sont axées principalement sur les résultats au moyen de l'appareil MD avec les marqueurs CFSE et FITC. Dans la deuxième partie de ce chapitre, une comparaison des essais sur le Setup Hes est traitée avec les marqueurs FITC et ATTO 565. Les concentrations molaires indiquées sur les graphiques et la première valeur des ratios mentionnent les valeurs du marqueur. Les concentrations détaillées dans les légendes correspondent aux concentrations finales après le mélange des réactifs.

3.1 REACTION DE PRINCIPE

Le graphique suivant présente l'anisotropie (r) de la réaction entre le marqueur CFSE et le lysozyme. Le milieu à pH 8.3 correspond au pH de travail proposé par le fournisseur du fluorophore [20].



Graphique 3.1 : anisotropie de réaction entre le CFSE (18 μM) et le lysozyme (88 μM)

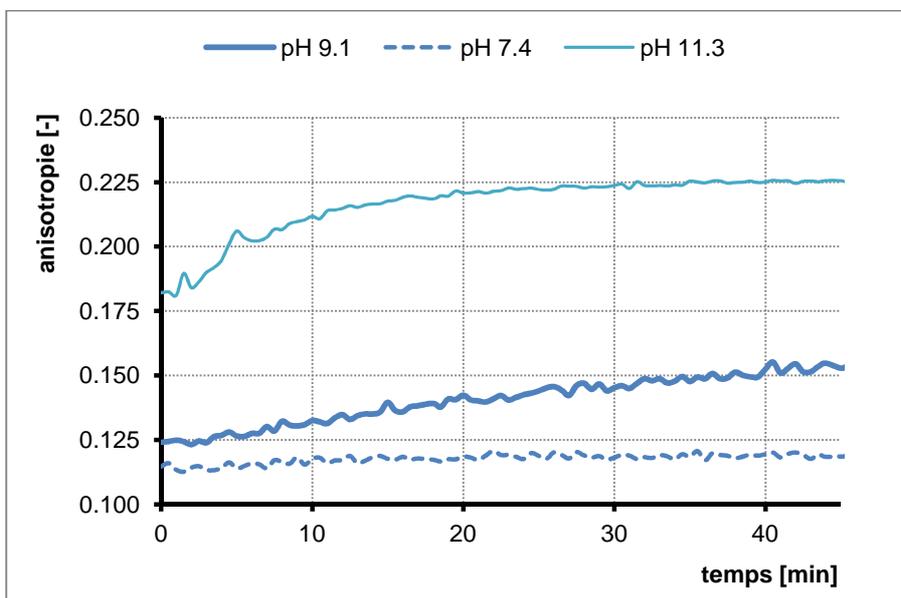
Le r_0 est défini comme étant l'intersection entre la droite du blanc et l'axe y, ce qui donne une valeur de 0.14. Pour le blanc, la mise en contact du marqueur avec le tampon ne provoque pas une différence pour r . La réaction principale entre le marqueur et la protéine provoque une évolution exponentielle de r avec une différence de r (Δr) de 0.17. L'analyse a été effectuée à deux reprises sur la mesure, d'où un intervalle de confiance allant de ± 0.0006 à ± 0.03 .

Dans un cas idéal, ce Δr est créé par l'augmentation de la masse molaire du produit marqué. La grosseur de la molécule finale dépend du nombre de CFSE fixés sur la protéine. Dans la réalité, le r observé est souvent influencé par les différents phénomènes externes exposés dans la partie théorique (cf. 1.5.3 et 1.5.4). L'interprétation de r du marquage s'effectue sur deux périodes principales. La cinétique de réaction est déterminée entre la mise en contact des réactifs et le début de stabilité de r . La seconde période, dite de stabilité, procure des informations sur l'état final du produit et les éventuelles influences externes sur celui-ci. Les sous-chapitres suivants proposent une étude expérimentale composée des résultats et d'une discussion pour chaque thème.



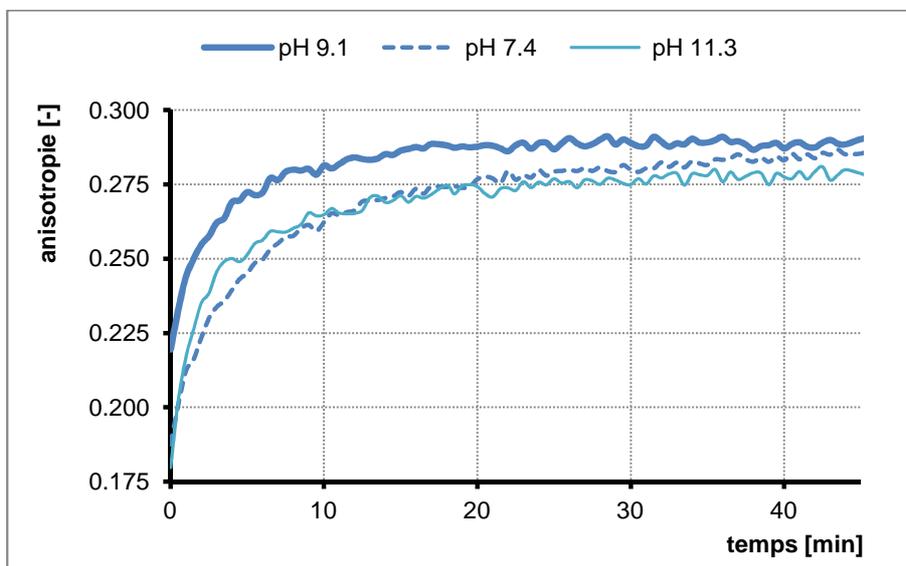
3.2 INFLUENCE DU PH

Le premier phénomène étudié est le pH. Le graphique suivant représente l'évolution de r de la réaction entre le FITC et le tampon en fonction de différents pH.



Graphique 3.2 : réactions entre le FITC ($14 \mu\text{M}$) et l' H_2O du tampon à pH 7.1, à pH 9.1 et à pH 11.3

Pendant la période d'analyse, les valeurs de r évoluent différemment selon le pH. A pH 7.4, r est stable et se maintient à environ 0.12. Dans un milieu plus basique, à pH 9.1, la valeur de r augmente de façon linéaire pour atteindre un r de 0.15. Avec un pH de 11.3, r évolue de façon exponentielle pour se stabiliser à environ 0.23.



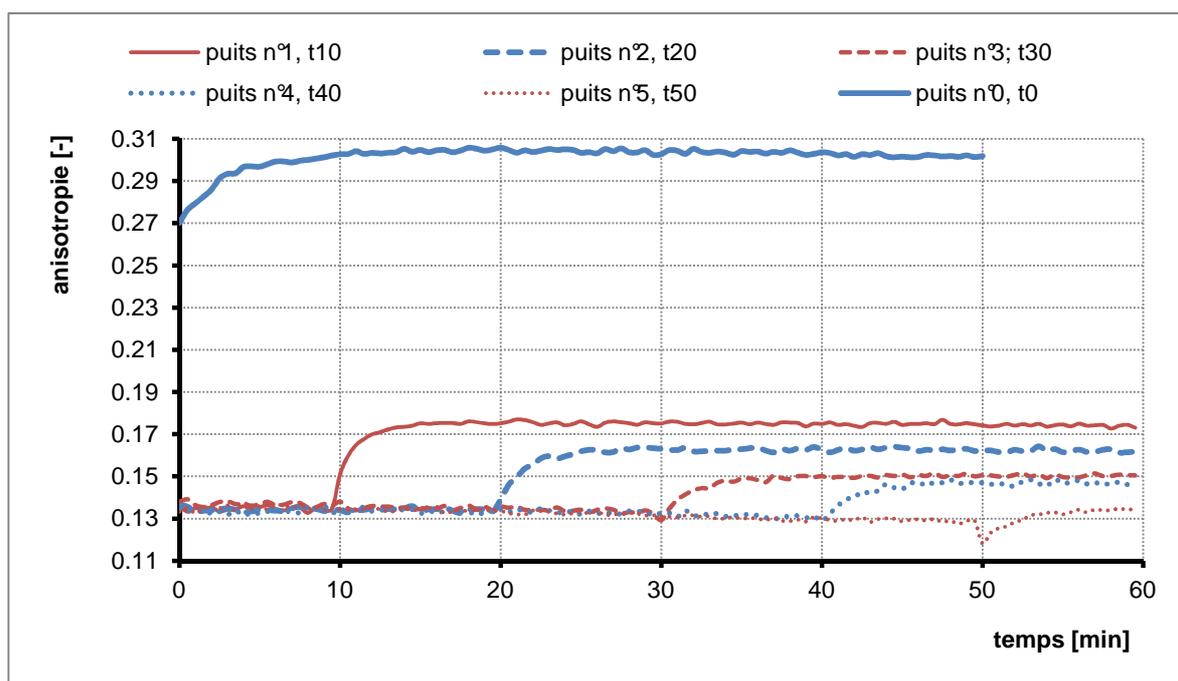
Graphique 3.3 : réactions entre le FITC (14μ) et le lysozyme (1 :8) à pH 7.1, à pH 9.1 et à pH 11.3

En interprétant les pentes de chaque courbe sur le graphique 3.3, le FITC et le lysozyme réagissent plus vite à pH 9.1 et à 11.3 qu'à pH 7.4. Cependant, les réactions à pH 7.4 et à pH 9.1 atteignent une anisotropie maximale (r_{max}) de 0.29, sensiblement plus élevée que la réaction à pH 11.3 avec un r_{max} de 0.28.

Un pH fortement basique favorise l'apparition d'hydrolyse sur le marqueur. Les différences de comportement en fonction du pH peuvent être expliquées par la réaction, catalysée par les OH^- présents, entre le FITC et l'eau du tampon. L'affinité entre le marqueur et l'eau est plus ou moins importante et est présente aussi, à moindre mesure, à un pH proche de 7. En effet, la faible concentration en OH^- à pH 7.4 ne favorise pas la réaction. Par contre, à pH 11.3, les OH^- sont en grande quantité, avec une concentration de 0.002 M, par rapport à la concentration en FITC. Les marqueurs réagissent avec l'eau pour former des difluorescéines thiourées (fig. 1.2). Dans le cas de la réaction principale, l'amine primaire ϵ de la lysine a un pK_a à 10.7 [17] et, est déprotonée à un pH fortement basique. Plus le pH de travail se rapproche de la valeur du pK_a , plus l'amine primaire possède des propriétés nucléophiles (fig. 1.9). Cette remarque corrobore avec l'observation d'une vitesse de marquage plus élevée à pH 9.1 qu'à pH 7.4. Cependant, la vitesse n'est pas plus importante à pH 11.3 car l'hydrolyse des réactifs domine la réaction de marquage. A pH 7.4, l'hydrolyse est négligeable car elle n'est pratiquement pas catalysée par les OH^- . La concentration de $13 \mu\text{M}$ en OH^- , à pH 9.1, est relativement importante pour considérer l'effet de l'hydrolyse sur le résultat.

3.3 EFFET DE L'HYDROLYSE

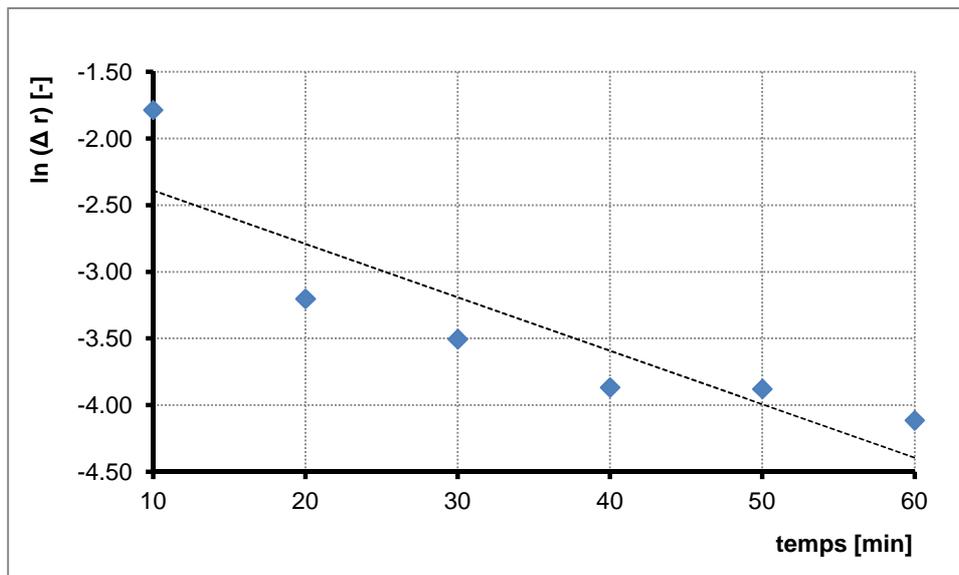
L'hydrolyse est étudiée en parallèle du marquage à l'aide de la molécule CFSE. La méthode au chapitre 2.4.3 est appliquée pour la série d'analyse sur six puits présentée sur le graphique ci-dessous.



Graphique 3.4 : réaction en série entre le CFSE ($85 \mu\text{M}$) et le lysozyme ($186 \mu\text{M}$) à un ratio de 1 :2 à pH 8.3

La principale observation réside dans la diminution de r_{max} sur les 60 min d'analyse. Au puits n°6, le r_{max} atteint une valeur de 0.31. Au puits n°6, le r_{max} a une valeur de 0.14. Pour les puits n°1 à n°5, l'anisotropie de départ (r_0) se situe entre 0.13 et 0.14, correspondant au r du blanc entre le CFSE et le tampon. Cependant, pour le puits n°6, le r_0 , à 0.12, est plus faible. La pente des courbes étant de plus en plus faible, la vitesse de réaction est de plus en plus lente.

L'évolution des Δr est représentée par une courbe de tendance linéaire sur le graphique 3.5.



Graphique 3.5 : logaritme naturel des Δr des réactions sur le graphique 3.4 en fonction du temps

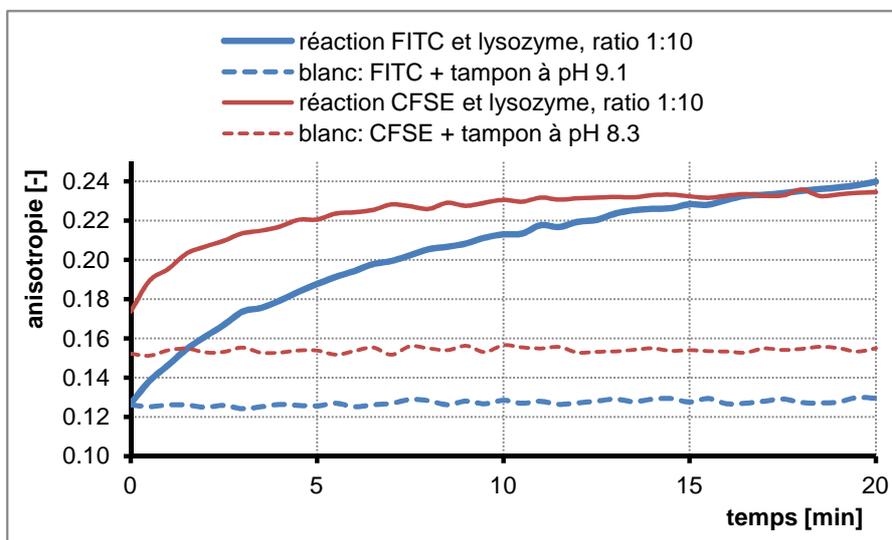
Malgré une faible présence en OH^- , 2 μM , à pH 8.3, l'hydrolyse se produit de façon exponentielle en fonction du temps. La plus grande différence se produit durant les dix premières minutes. Ensuite, la baisse de Δr diminue pour tendre vers 0. L'équation de la courbe de tendance est

$$\begin{aligned}
 y &= -0.0401x - 1.9893 \\
 R^2 &= 0.7785
 \end{aligned}
 \tag{3.1}$$

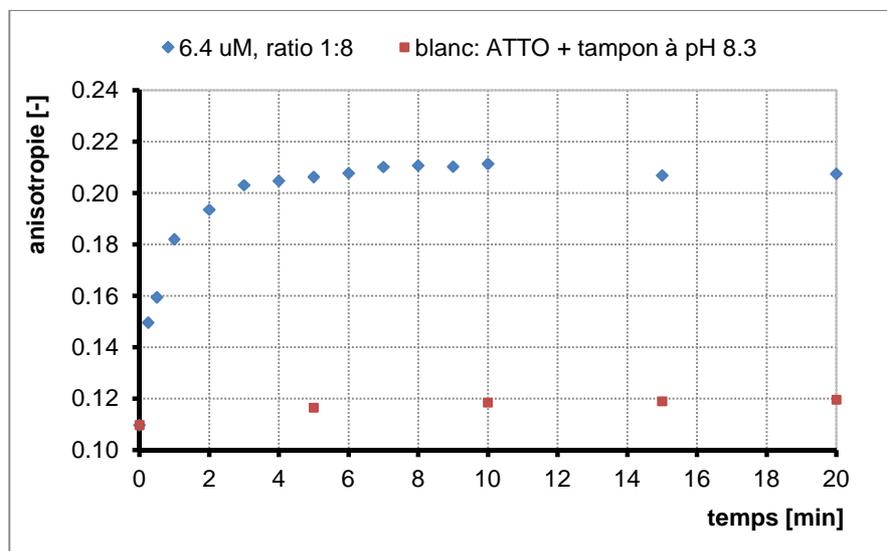
Les marqueurs qui n'ont pas réagi avec le tampon sont disponibles pour marquer le lysozyme. D'autre part, dans le puits n° 6, le fait que r_0 est plus bas que dans les autres puits est la conséquence d'une viscosité plus faible provoquée par la diminution de concentration en DMSO (cf. 3.6). Cette diminution de marquage correspond à une consommation de CFSE par l'hydrolyse. De ce fait, il est possible de déterminer la constante de vitesse de l'hydrolyse (k'_H) en considérant qu'un des réactifs est en excès (l'eau) et que la réaction suit un pseudo-ordre global 1. La valeur 0.04 mol/(s·L) pour k'_H est déterminée par la pente de la courbe de tendance. Cette constante est utile pour les calculs de cinétique dans le chapitre suivant.

3.4 CINETIQUE DE REACTION

Dans cette partie, la cinétique de la réaction est analysée en déterminant la constante de vitesse (k). Le rapport entre la concentration en OH⁻ et les concentrations en réactifs, ainsi que le choix de l'ordre de réaction, permettent de déterminer la constante. Dans cette étude, les constantes de réaction sont comparées entre les trois marqueurs à des domaines de concentration et de ratios proches.



Graphique 3.6 : comparaison de la réaction entre le FITC (1.7 μM) et le lysozyme (17 μM) à pH 9.1 et de la réaction entre le CFSE (1.7 μM) et le lysozyme (17 μM) à pH 8.3



Graphique 3.7 : réaction entre l'ATTO 565 (3.7 μM) et le lysozyme (24 μM) à pH 8.3

L'intérêt d'interpréter les graphiques 3.6 et 3.7 réside dans les différences de pente des courbes, de la stabilité des blancs et du temps de réaction pour chaque cas. La valeur r avec le marqueur ATTO 565 évolue plus rapidement (graph. 3.7) que pour les autres réactifs, ce qui correspond à la vitesse la plus rapide. En comparaison, la réaction avec le FITC est plus lente. Après 20 min d'analyse, seule la réaction avec le FITC ne s'est pas stabilisée (graph. 3.6). Le Δr des droites des blancs est considéré comme stable.

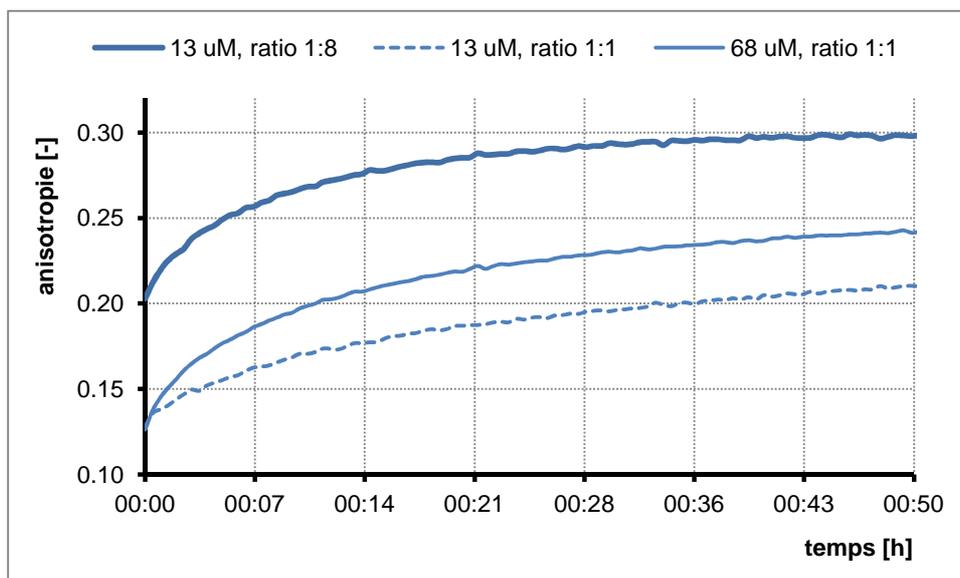
Les constantes de vitesse sont calculées à l'aide de la méthode du $t_{1/2}$ et de la loi du pseudo-ordre 1 (éq. 1.8 et 1.11). En faisant l'hypothèse que l'hydrolyse est négligeable selon la stabilité des blancs (graph. 3.6 et 3.7), les réactions suivent l'équation 1.5. Le tableau suivant présente les résultats des trois réactions.

Tableau 3.1 : constante de réaction entre le marqueur et le lysozyme (graph. 3.6 et 3.7)

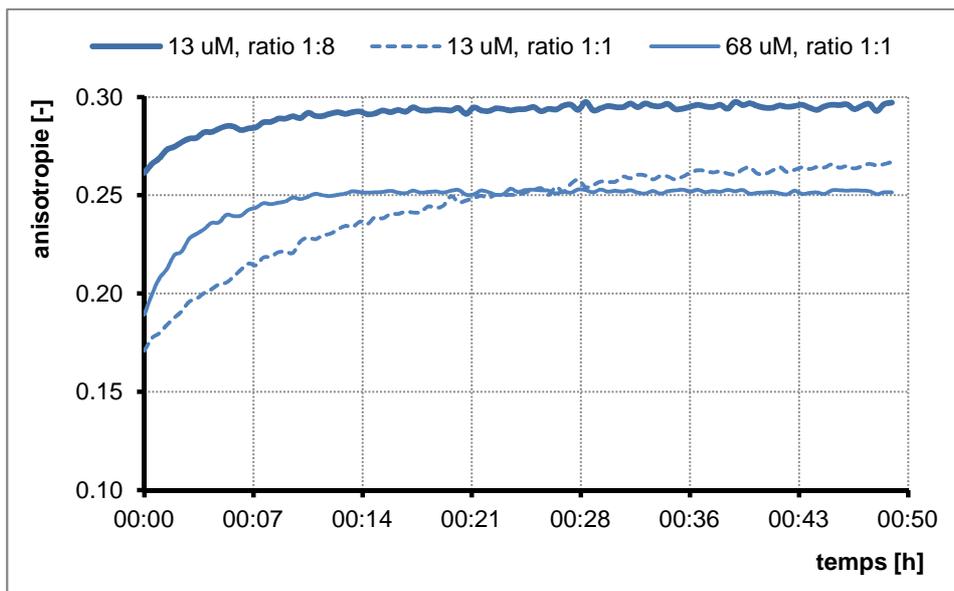
Réaction	$r_{1/2}$ [-]	$t_{1/2}$ [s]	k'_{global} [mol/(s·L)]
ATTO 565	0.16	40	0.017
CFSE	0.19	120	0.006
FITC	0.18	270	0.003

Pour utiliser les équations adaptées, il faut, dans un premier temps, déterminer l'importance de l'hydrolyse dans la réaction. Cela se fait en observant la stabilité du blanc sur le graphique et la concentration en OH^- dans le tampon. Ensuite, l'analyse du rapport en excès de l'un des réactifs principaux apporte une information sur l'ordre global de réaction. La vitesse dépend de la concentration en protéines en contact avec les marqueurs, malgré le fait que la réaction se produit avec les lysines. Avec des concentrations en réactifs pratiquement similaires, les vitesses se différencient par les valeurs de k' pour chaque marqueur. La réaction avec le FITC est la plus lente avec un k' s'élevant à 0.003 mol/(s·L). La vitesse de réaction avec le CFSE est 2 fois plus rapide, celle avec l'ATTO 565 est 6 fois plus rapide que le marquage avec le FITC. Le groupe fonctionnel succinimidyl ester des marqueurs CFSE et ATTO 565 (fig. 1.4 et 1.6) favorise une vitesse de réaction plus rapide que le groupe isothiocyanate du FITC (fig. 1.5). Cette observation peut être expliquée par un carbone plus électrophile au sein du succinimidyl ester.

Un aspect important dans l'étude de la cinétique est l'influence des concentrations et des ratios des réactifs en présence. Dans l'exemple suivant, la réaction avec le FITC à pH 7.4 et à pH 9.1 est choisie pour ses réactions plus lentes et interprétables. En effet, due à sa rapidité de réaction, les données de r sur la partie réactionnelle, pour les réactions avec le CFSE, ne sont pas disponibles avec le système MD.



Graphique 3.8 : anisotropie de réaction entre le FITC et le lysozyme à des concentrations et des ratios différents à pH 7.4



Graphique 3.9 : anisotropie de réaction entre le FITC et le lysozyme à des concentrations et des ratios différents à pH 9.1

Le tableau ci-dessous développe les constantes de vitesse globales des réactions considérées comme ayant un r_{\max} stable observable sur les graphiques 3.8 et 3.9.

Tableau 3.2 : constante de vitesse pour les réactions au pH 7.4 et au pH 9.1 du graphique 4.8 et 4.9

pH	Ratio	C_{marqueur} [μM]	$r_{1/2}$ [-]	ordre	$t_{1/2}$ [s]	k'_{global} [mol/(s·L)]
7.4	1 : 8	13	0.20	1	60	0.012
7.4	1 : 1	13	0.16	1	330	0.002
7.4	1 : 1	68	0.17	1	300	0.002
9.1	1 : 8	13	0.20	1	60	0.012
9.1	1 : 1	13	0.19	1	285	0.002
9.1	1 : 1	68	0.18	1	60	0.012

Pour toutes les concentrations, à pH 7.4, les vitesses de réaction sont plus lentes qu'à pH 9.1. Entre les deux pH pour les réactions à 13 μM au ratio 1 : 8 et à 68 μM au ratio 1 : 1, les Δr sont relativement similaires. A une concentration en FITC de 13 μM et un ratio de 1 : 1, le Δr est 1.5 fois plus important dans un milieu plus basique. Les valeurs de k'_{global} sont 6 fois plus grande avec une concentration en protéines supérieurs à 50 μM .

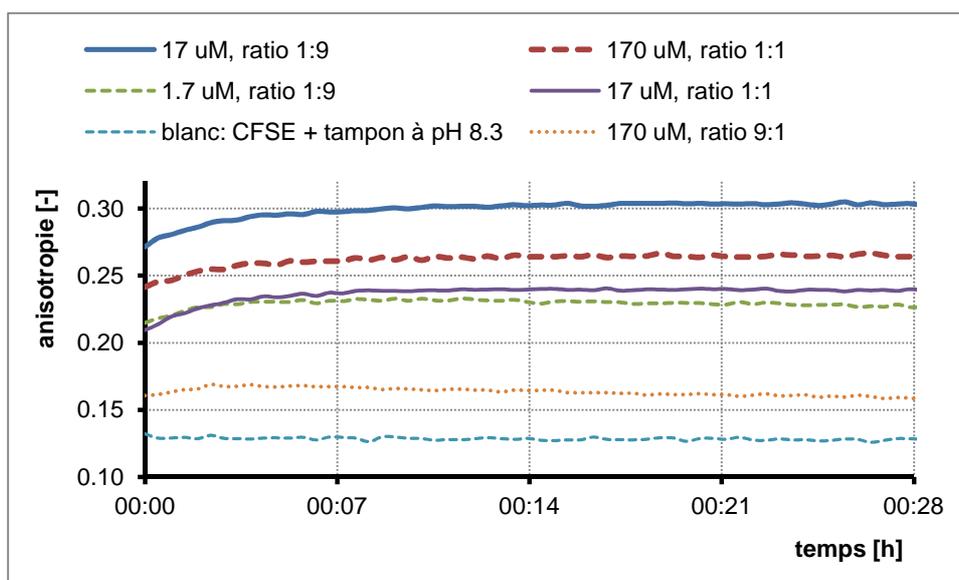
La faible concentration en OH^- à pH 7.4, 0.25 μM , n'a pas d'influence sur la réaction et l'hydrolyse est négligeable. A pH 9.1, la concentration en OH^- est 50 fois plus importante et catalyse la réaction d'hydrolyse. Pour toutes les réactions avec les mêmes réactifs, la constante devrait être identique en fonction de l'environnement et spécialement du pH. Cependant, l'expérience ne confirme pas la dépendance de k' au pH. En considérant les erreurs d'estimation de $t_{1/2}$ et l'influence externe de phénomènes comme la différence de température et l'influence de la présence des protéines sur l'hydrolyse, les différences de k' sont significatives. En outre, la loi de vitesse devrait suivre cette équation pour une réaction de pseudo-ordre 1.

$$v = (k + k'_H) \cdot [\text{marqueur}] \quad (3.2)$$

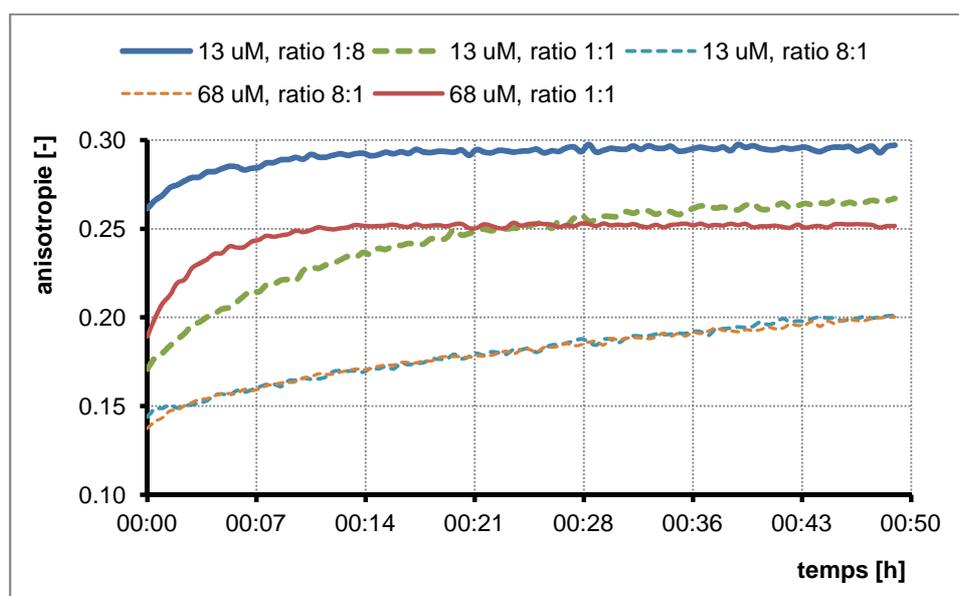
La valeur de k'_{global} , correspondant à la constante de vitesse globale calculée dans le tableau 3.4, devrait être la somme des composantes k' et k'_H . Cette dernière à une valeur de 0.04 mol/(s·L) (cf. 3.3), est supérieure à k'_{global} , ce qui veut dire que la valeur de k' pour le marquage ne peut pas être calculée sur la base du k'_H déterminé. La présence ou non des protéines dans la solution pourrait avoir une influence sur l'hydrolyse du marqueur.

3.5 INFLUENCE DES CONCENTRATIONS ET DES RATIOS

Le graphique 3.10, présentant la réaction avec le CFSE, et le graphique 3.11, présentant la réaction avec le FITC, sont comparés pour étudier l'influence des concentrations et des ratios sur r des réactions.



Graphique 3.10 : anisotropie de réaction entre le CFSE et le lysozyme en fonction des concentrations et des ratios à pH 8.3



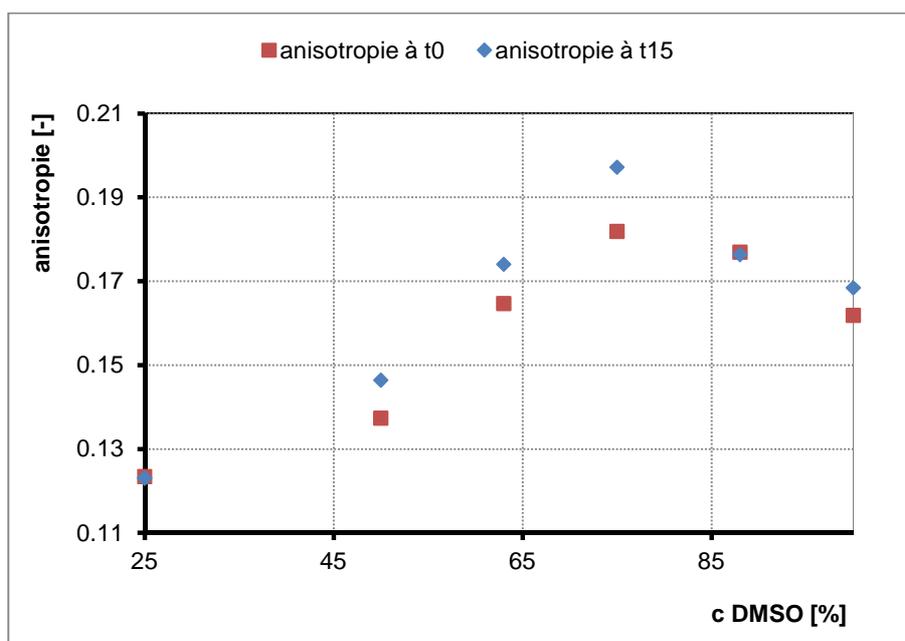
Graphique 3.11 : anisotropie de réaction entre le FITC et le lysozyme en fonction des concentrations et des ratios à pH 9.1

Toutes les réactions avec le CFSE atteignent leur r_{\max} avant 14 min. Le FITC réagit différemment, et seuls les échantillons, avec des concentrations en protéines supérieures à 13 μM et en excès par rapport au FITC, ont un temps de réaction inférieur à 14 min. Les réactions avec un excès en FITC sont plus lentes et se prolongent au-delà de 50 min. Les observations suivantes valent pour les deux marqueurs. La plus grande Δr correspond aux mélanges où la concentration en protéines est la plus importante par rapport à la concentration du marqueur. La réactivité est plus faible avec une proportion de marqueur plus grande. Plus les concentrations sont faibles pour les deux réactifs, plus la vitesse de réaction est lente. En considérant que le r_0 avec le CFSE est observé à environ 0.13 et avec le FITC à 0.11, les réactions amorcent avant le début de la prise de mesure. Dans le graphique 3.10, r a tendance à diminuer pour certaines réactions après avoir atteint le r_{\max} , ce qui n'est pas observé pour le FITC sur le graphique 3.11.

Un excès de protéine favorise la vitesse de marquage et le Δr en fonction du niveau de collision des molécules et de la disponibilité des amines primaires sur la lysine. La réaction est favorisée avec une haute concentration en protéines. Un excès de marqueur provoque un ralentissement de la vitesse de marquage et une diminution de r_{\max} . D'où la dépendance de l'hydrolyse au pH et à la quantité de marqueurs. Cependant, entre le CFSE et le FITC, la réaction d'hydrolyse est favorisée sur le FITC. Cela s'explique par l'utilisation du FITC à un pH supérieur à 9 où l'effet catalytique des OH^- est très important [11]. Malgré que l'entité moléculaire grossisse avec la formation de produits secondaires sous l'effet de l'hydrolyse, la molécule finale est moins grosse qu'une protéine marquée et donc, est moins intense en fonction du nombre de marqueurs sur la molécule.

3.6 INFLUENCES DE LA NATURE DU SOLVANT

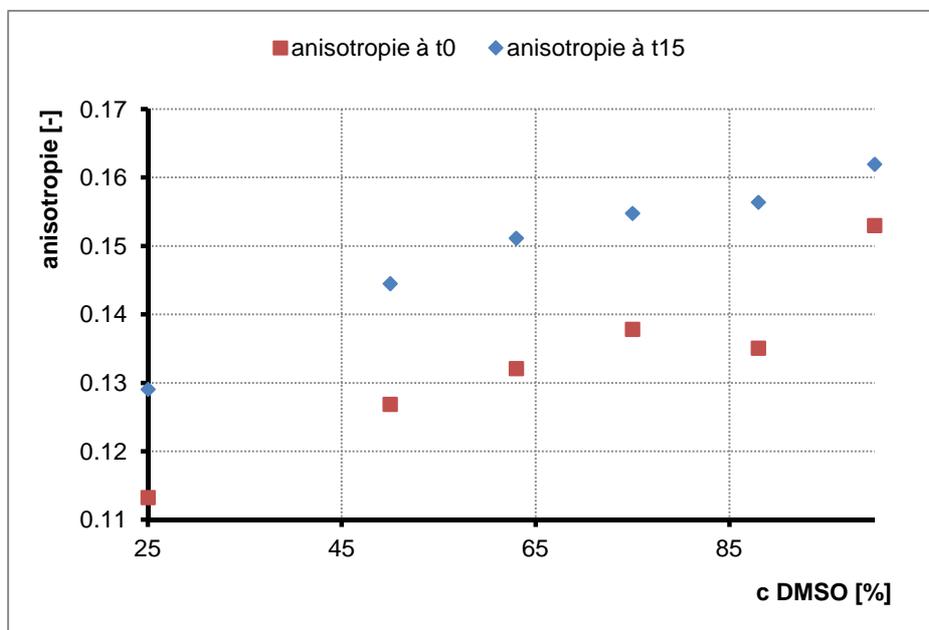
Comme expliqué dans la partie théorique (cf. 1.5.3.1), la nature du solvant influence r . Pour étudier ce phénomène, différentes concentrations en diméthylsulfoxyde (DMSO) sont préparées avec le tampon utilisé pour chaque marqueur. Dans les graphiques suivants 3.12 et 3.13, l'anisotropie est représentée en fonction de la concentration en DMSO.



Graphique 3.12 : anisotropie de réaction entre le CFSE et le tampon à pH 8.3 en fonction de la concentration en DMSO en début d'analyse et après 15 min



Selon le moment de la mesure, r d'une même concentration peut être différent. Pour la plupart des concentrations, il y a un écart de r au moment de la mise en contact des réactifs (t_0) et au moment de la stabilité du mélange (t_{15}). La valeur de r à t_0 est inférieure à la valeur de r à t_{15} entre 25% et 85% de DMSO. Après 15 min de stabilité, r atteint une valeur de 0.20 à 75% de DMSO puis diminue jusqu'à 0.17 à 100% de DMSO.



Graphique 3.13 : anisotropie de réaction entre le FITC et le tampon à pH 9.1 en fonction de la concentration en DMSO en début d'analyse et après 15 min

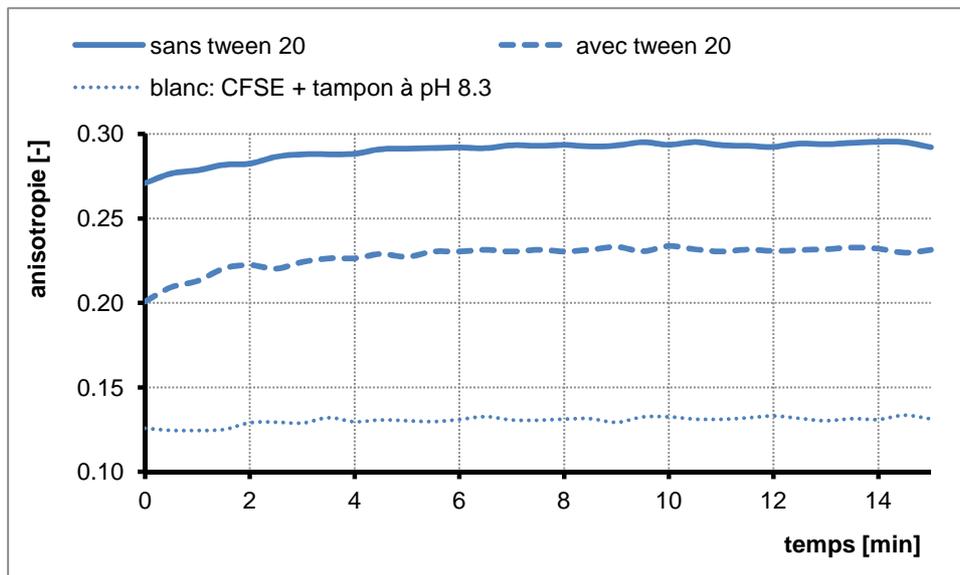
Dans le cas de r en fonction du FITC et du DMSO, r évolue après 15 min de stabilité de 0.13 à 0.16 pour des concentrations allant de 25% à 100% de DMSO. Un maximum est observé à environ 75% de DMSO avec les deux marqueurs, mais plus prononcé avec le CFSE. La concentration en DMSO définit la valeur de r_0 pour toutes les réactions. Pour les analyses types (cf. 3.4.2), la concentration en DMSO s'élève à 50% du volume total. Avec le CFSE mais sans la présence de protéines, cela correspond à t_0 à un r_0 proche de 0.14 et à t_{15} de 0.15. Avec le FITC, ces valeurs sont d'environ 0.13 et 0.14. La concentration en DMSO des essais en série (3.4.3) s'élève à 25%. Les r avec le CFSE sont à t_0 et à t_{15} de l'ordre de 0.12 et les r avec le FITC, à t_0 et à t_{15} , s'élèvent à 0.11 et à 0.13.

La valeur r dépend de la viscosité, celle-ci est deux fois plus importante pour le DMSO (2 cP) que pour l'eau (1 cP). Une augmentation de concentration en DMSO provoque une hausse de la viscosité de la solution. La molécule ayant une vitesse de rotation ralentie influence vers le haut la valeur de r (éq. 1.19). Concernant la réaction avec le CFSE, le fait que la valeur r diminue à partir de 75% de DMSO ne correspond pas à cette théorie. Ce phénomène pourrait être expliqué par la dépolarisation d'émission. La présence importante de DMSO influencerait les intensités d'émission et favoriserait le transfert d'énergie vibrationnel entre les molécules [21].

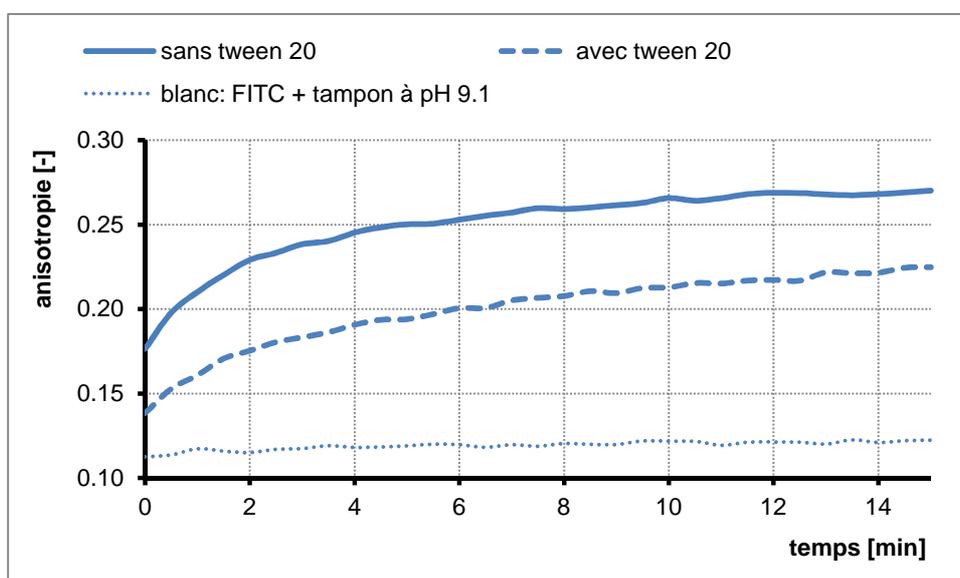


3.7 EFFET DE L'AGGLOMERATION DES PROTEINES

Le dernier phénomène étudié sur le MD est l'influence de l'agglomération des protéines sur l'anisotropie. Sur les graphiques suivants, les réactions avec le CFSE et le FITC sans et avec le tween 20 sont développées et discutées.



Graphique 3.14 : influence du tween 20 (0.01% (v : v)) sur la réaction entre le CFSE (17 μ M) et le lysozyme (170 μ M) au ratio 1 :10 à pH 8.3



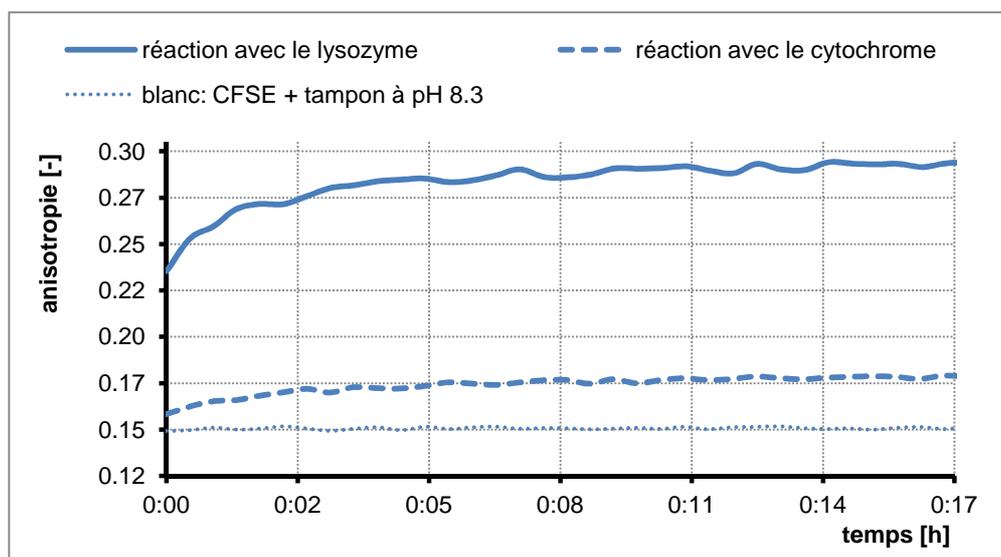
Graphique 3.15 : influence du tween 20 (0.01% (v : v)) sur la réaction entre le FITC (17 μ M) et le lysozyme (170 μ M) au ratio 1 :10 à pH 9.1

Sans surfactant, le Δr est d'environ 0.17 avec le CFSE et de 0.16 avec le FITC. L'ajout du tween 20 provoque une diminution de r_{\max} et amène la valeur de Δr à environ 0.11 pour les deux marquages. La vitesse de réaction est plus rapide sans le tween. Cependant, à r_{\max} , les deux réactions se comportent de façon similaire avec la même évolution.

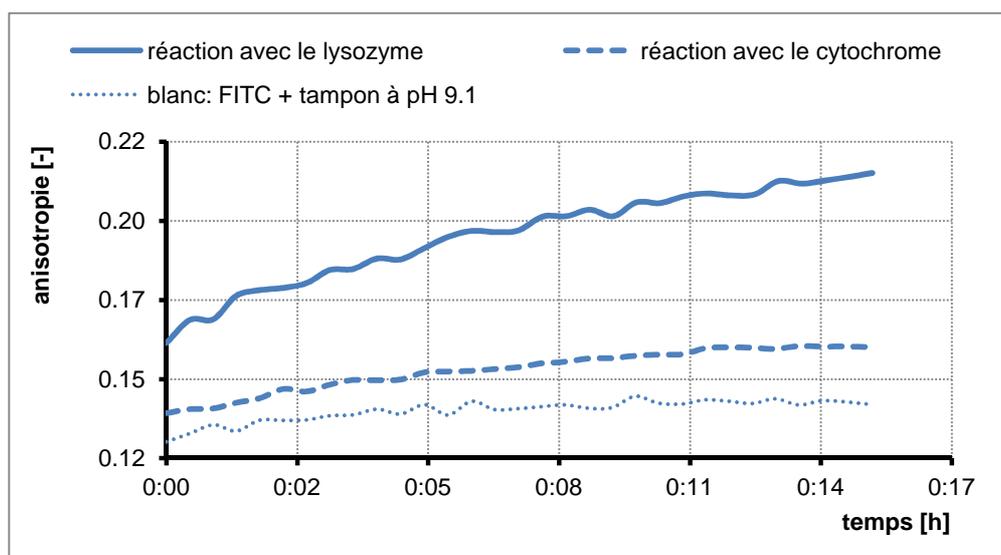
En limitant l'agglomération des lysozymes avec l'ajout du tween 20, les molécules disponibles pour le marquage ont une taille plus petite. Comme r dépend de la vitesse de rotation via la taille finale de la molécule marquée, il est logique d'observer un r_{\max} plus faible. Cependant, la quantité de tween 20 ne donne aucune garantie sur le niveau d'inhibition de l'agglomération. De plus, le surfactant pourrait former une barrière micellaire entre les marqueurs et les lysines.

3.7.1 ESSAIS DE REACTION AVEC LE CYTOCHROME C

Les essais suivants proposent une comparaison en substituant le lysozyme par le cytochrome.



Graphique 3.16 : réactions du CFSE (8.5 μM) avec le lysozyme (88 μM) et le cytochrome (90 μM) au ratio 1 :10 à pH 8.3



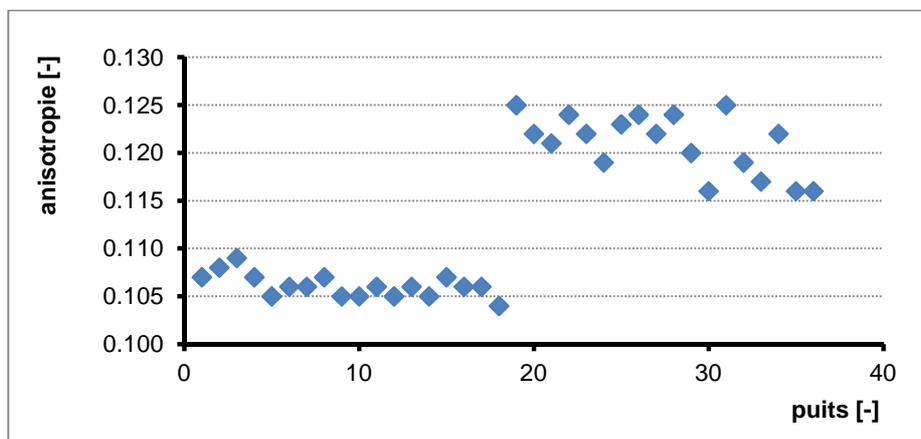
Graphique 3.17 : réactions du FITC (8.5 μM) avec le lysozyme (44 μM) et le cytochrome (45 μM) au ratio 1 :5 à pH 9.1

La valeur de r_{max} de la réaction du CFSE avec le cytochrome est 80% plus faible que la valeur avec le lysozyme. La réaction entre le FITC et le cytochrome a un r_{max} 70% plus faible que la réaction avec le lysozyme. Cependant, la vitesse de réaction avec le cytochrome est plus lente que la vitesse produite avec le lysozyme et, l'évolution des r , pour chaque marqueur, suit la même direction et la même pente entre les deux protéines.

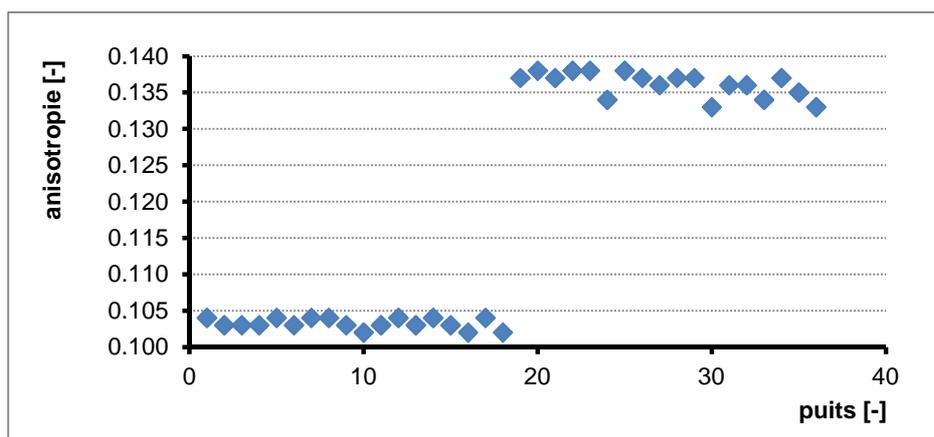
Le cytochrome c du cœur de bœuf, utilisé dans ce travail, a une masse moléculaire de 12327 Da Sa chaîne est composée de 104 acides aminés donc 18 lysines [22]. La taille de cette protéine est proche de celle du lysozyme et le nombre de lysine est 3 fois plus important que celles disponibles dans le lysozyme. La différence d'anisotropie pourrait être interprétée en déterminant les influences de son auto-fluorescence, de sa configuration stérique, de ses capacités à s'agglomérer ou de la présence d'un complexe au centre de la protéine.

3.7.2 FACTEUR Z SUR LA TAILLE DE L'ESSAI

Dans le cadre d'une série importante d'analyses sur un appareil et dans les mêmes conditions, il est intéressant de déterminer ce facteur de déviation sur les réponses en fonction des moyennes et des écarts-type des résultats. Deux séries de blancs (négatifs) et de marquages (positifs) à t_0 min et à $t_{50 \text{ min}}$ sont visualisées sur les graphiques suivants.



Graphique 3.18 : puits n°1 à 18 : anisotropies sur 1 point entre le CFSE et le tampon, puits n°19 à 36 : anisotropies sur 1 point entre le CFSE et le lysozyme à $t_0 \text{ min}$



Graphique 3.19 : puits n°1 à 18 : anisotropies sur 1 point entre le CFSE et le tampon, puits n°19 à 36 : anisotropies sur 1 point entre le CFSE et le lysozyme à $t_{50 \text{ min}}$

$$\text{facteur } Z = 1 - \frac{3 \cdot (\sigma_{\text{positif}} + \sigma_{\text{négatif}})}{|\bar{x}_{\text{positif}} - \bar{x}_{\text{négatif}}|} \quad (3.3)$$

Tableau 3.3 : valeurs de Z en fonction du temps sur une série de blancs et une série de marquage

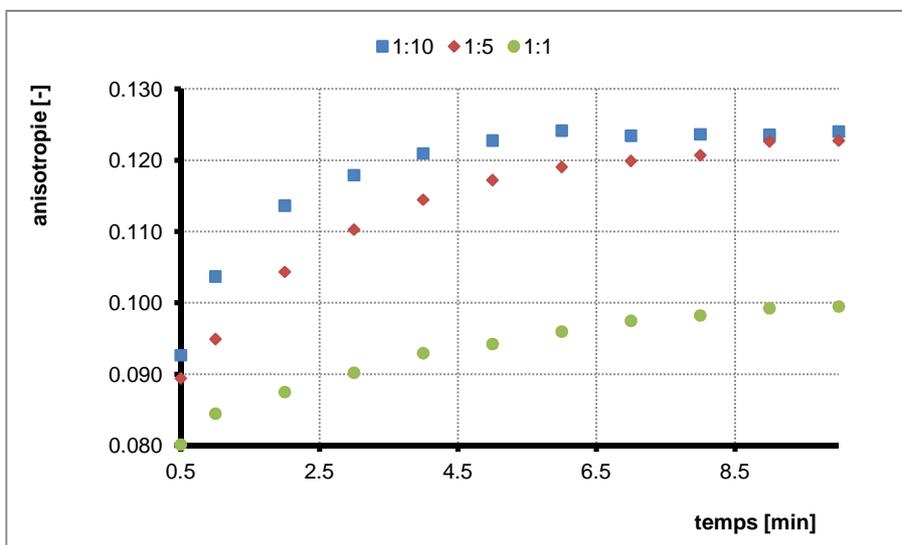
Temps [min]	$\bar{x}_{\text{négatif}}$ [-]	$\sigma_{\text{négatif}}$ [-]	\bar{x}_{positif} [-]	σ_{positif} [-]	Facteur Z [-]
0	0.106	0.00123	0.121	0.00313	0.12
50	0.103	0.000732	0.136	0.00169	0.78

Sur l'appareil MD et dans les conditions mentionnées, le facteur Z en début d'analyse s'élève à 0.12. Cette valeur signifie que le test à ce temps est marginal avec une importante déviation entre les essais. Après 50 min, le facteur Z augmente à 0.78, ce qui correspond à un meilleur test et une diminution des déviations pour les séries négative et positive.

3.8 REACTION SUR L'APPAREIL SETUP HES

3.8.1 REACTION AVEC LE FITC

Différents essais ont été effectués sur l'appareil Setup Hes avec les marqueurs FITC et ATTO 565. La source lumineuse pour le premier est la LED et le laser à 543 nm pour le second.



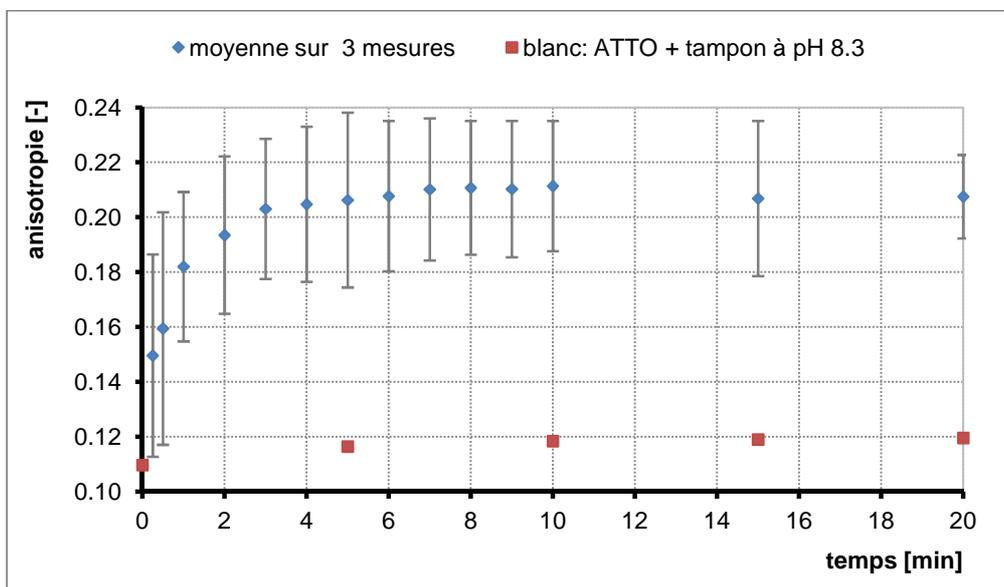
Graphique 3.20 : réaction entre le FITC (12 µM) et le lysozyme à pH 9.1 à différents ratios sur l'appareil Setup Hes

Les Δr pour les ratios 1 :10, 1 :5 et 1 :1 sont respectivement 0.04, 0.04 et 0.02. Les valeurs de r_{\max} se situent entre 0.10 et 0.12. La réaction avec un ratio de 1 :10 possède une vitesse plus rapide que les deux autres réactions. Le ratio 1 :1 engendre une réaction lente. Les marquages aux ratios 1 :10 et 1 :5 atteignent leur r_{\max} à environ 7 à 8 min après le début de la réaction. Par contre, le marquage à un ratio de 1 :1 ne se stabilise pas durant les dix minutes d'analyse.

Les observations mentionnées pour les expériences sur l'appareil MD se reproduisent dans le travail avec le Setup Hes. En effet, un important excès de protéines améliore le marquage. Des quantités équivalentes en réactifs favorisent l'hydrolyse. En outre, une concentration de 13 µM en OH⁻ proche de la concentration en marqueurs catalyse fortement l'hydrolyse. La différence entre les résultats des appareils se situe dans l'intensité du signal. Au vu du résultat de r pour une réaction avec le FITC à un ratio de 1 :10 (graph. 3.3) sur le MD, le Δr dans les mêmes conditions sur le Setup Hes, est 75% plus faible. La baisse d'intensité du signal peut d'être la conséquence d'une dégradation des protéines dans le tampon, d'un alignement non optimal des polarisateurs de sortie, provoquant donc une baisse d'intensité, ou d'un manque de sensibilité du rayon d'émission.

3.8.2 REACTION AVEC L'ATTO 565

L'essai avec le marqueur ATTO 565 est réalisé sur une répétition à trois reprises de la mesure d'échantillon. Le graphique ci-dessous présente les moyennes et les intervalles de confiance.



Graphique 3.21 : réaction entre l'ATTO 565 (3.7 μM) et le lysozyme (24 μM) au ratio 1 :6 à pH 8.3

La valeur de Δr s'élève à 0.09 et la vitesse de marquage est significative (tab. 3.1). L'intervalle de confiance est déterminé entre ± 0.01 et ± 0.04 selon les écarts-type et les moyennes de chaque mesure.

La déviation exprimée par les intervalles de confiance est plus importante sur l'appareil Setup Hes que sur celui du MD (cf. 3.1). Cette observation doit prendre en compte que le marqueur n'est pas le même et que les conditions sont différentes. Sur l'appareil MD, l'essai à deux répétitions, donc avec une valeur de t égale à 12.7, obtient une précision plus significative que l'essai à trois répétitions sur le Setup Hes avec un t de 4.3. Ce qui veut dire que le MD est plus précis que l'appareil Setup Hes. Le choix de l'ATTO 565 permet de discuter sur la sensibilité du laser par rapport à la LED. En effet, en comparant ce résultat avec ceux du FITC (cf. 3.8.1), il est intéressant d'observer qu'à ratio plus ou moins similaire, 1 :5 et 1 :6, et à des concentrations plus faibles, l'analyse au moyen du laser et avec l'ATTO 565 produit un plus important Δr . Le laser augmente la sensibilité du signal par rapport à la source LED.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'interprétation de l'anisotropie d'une réaction entre un marqueur et une protéine demande un certain recul, afin de considérer tous les facteurs influençant le résultat. Cette méthode d'analyse est non sélective concernant la nature de la molécule. Par contre, elle est adaptée pour suivre la cinétique de réaction et le changement de taille d'une molécule. A l'état actuel, il n'est pas possible de connaître le nombre de marqueurs ayant réagi avec la lysine. La méthode ne permet pas de garantir la réaction des six lysines par lysozyme. L'anisotropie visualisée peut être le résultat de différents phénomènes comme la réaction ciblée, l'intervention de produits secondaires, l'agglomération de protéine ou l'hydrolyse du marqueur. Il est difficile de pouvoir quantifier chaque interaction sur la fluorescence polarisée.

Cependant ce travail a permis d'observer et de qualifier différentes influences externes et conditions de réactions. Premièrement, l'excès de protéine avec des concentrations en réactifs supérieures à celle en OH^- favorise le marquage au détriment de l'hydrolyse. Un pH de travail inférieur à 9 réduit la concentration en OH^- et l'influence de l'eau sur les marqueurs. Le milieu doit être, malgré tout, assez basique, afin d'augmenter la nucléophilie de l'amine primaire de la lysine. La disponibilité de la protéine peut être optimisée en affaiblissant l'agglomération des molécules. La polarité et la viscosité du solvant ont un impact important sur l'intensité fluorescente et l'anisotropie de la molécule. La présence de protéines dans la solution pourrait influencer le degré d'hydrolyse des marqueurs.

La fluorescence polarisée est intéressante pour l'étude de la cinétique de réaction. Cette propriété est, finalement, un facteur prépondérant dans la recherche perpétuelle de méthode fonctionnant toujours plus rapidement, mais avec précision et robustesse. La sélection d'un marqueur pouvant réagir rapidement et de façon répétée doit être accompagnée de plusieurs observations. L'expérience a démontré, malgré les perturbations citées, que le CFSE était un bon choix de marqueur lors de l'utilisation de la source LED. Sans que tous les phénomènes et les influences externes soient maîtrisés, il n'est pas possible de confirmer l'exclusivité de la cinétique au marquage de la protéine.

Dans les futurs travaux, un effort pourrait être entrepris pour répondre à différentes questions. Est-ce que l'hydrolyse possède le même impact sur le marqueur sans et avec la protéine dans la solution ? Quelles sont les différences significatives de l'hydrolyse en modifiant les concentrations et le pH ? Quelles sont les conséquences directes sur l'anisotropie lors de l'ajout d'un surfactant ? Est-ce qu'il est possible, en optimisant la méthode, de la rendre sélective afin de déterminer une configuration de protéine ? Comment peut-on optimiser le choix des matériaux afin d'éviter la perte de réactifs ou la diminution d'intensité ? L'emploi du laser n'est-il pas plus intéressant par rapport à la sensibilité du rayon ? Pourrait-on travailler à des concentrations proches de la limite de détection de la fluorescence sans être péjoré par l'hydrolyse ? Peut-on protéger chimiquement le marqueur de l'hydrolyse ? Voilà bien des questions prouvant de la capacité de cette méthode à développer un outil performant pour le marquage à des fins médicales ou scientifiques.

5. REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien scientifique, la disponibilité et les conseils du Professeur Jean-Manuel Segura et de Monsieur Julien Héritier. Un remerciement particulier est exprimé envers Madame Géraldine Delasoie-Crittin pour sa patience et son soutien.

6. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Biological Magnetic Resonance Data Bank: lysozyme
<http://www.bmrb.wisc.edu/featuredSys/Lysozyme/lysozyme1.html> (06.08.2012)
- [2] Boesman-Finkelstein M., Finkelstein R., Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immunoglobulin A from human milk, *Elsevier Biomedical Press*, p.1, (1982)
- [3] Revenis M., Kaliner M., Lactoferrin and lysozyme deficiency in airway secretions: Association with the development of bronchopulmonary dysplasia, *The Journal of Pediatrics*, vol 121, p. 262, (1992)
- [4] Laibe S. et al., Augmentation des synthèses locales de la lactoferrine et du lysozyme chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine avec candidose oropharyngée : rôle de l'immunité muqueuse innée ?, *Journal de Mycologie médicale*, vol. 15, p. 70 et 72, (2005)
- [5] A Short History of Fluorescence, The Fluorescence Foundation
<http://www.fluorescence-foundation.org/lectures/madrid2010/lecture1.pdf> (06.08.2012)
- [6] Atkins P., De Paula J., Chimie physique, *De Boeck* (2008, 8^{ème} éd.)
- [7] Université de Leipzig : Introduction-Fluorescence Microscopy
<http://www.uni-leipzig.de/~pwm/web/?section=introduction&page=fluorescence>
(31.07.2012)
- [8] Lakowicz J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, *Kluwer Academic/ Plenum Publishers* (1999, 2^{ème} éd.)
- [9] Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie, CNRS (2009)
http://www.ifr87.cnrs-gif.fr/pbc/formation/pdf2009/BROWN_FluorochromesCHAPITRE.pdf (06.08.2012)
- [10] Principe physique de la fluorescence,
<http://www.snv.jussieu.fr/~wboudier/ens/cours/cours-mec-fluorescence.pdf> (06.08.2012)
- [11] Lau S. et al., Nanomolar derivatizations with 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester for fluorescence detection in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 809, 205-208 (1998)
- [12] Segura J.-M., Techniques de fluorescence avancées : Applications en bioanalytique, *HES-SO Valais*, 26-27 (2011)
- [13] Uniprot : P00698 Lysc_chick, <http://www.uniprot.org/uniprot/P00698> (06.08.2012)

- [14] Amresco : 0663 lysozyme, egg white
<http://www.amresco-inc.com/LYSOZYME-EGG-WHITE-0663.cmsx> (06.08.2012)
- [15] Price W. et al., Time Dependence of Aggregation in Crystallizing Lysosyme Solutions Probed Using NMR Self-Diffusion Measurements, *Biophysical Journal*, 80, 1585 (2001)
- [16] Bernath F., Vieth W., Lysozyme activity in the presence of nonionic detergent micelles, *John Wiley & Sons* (1972), 737
- [17] Vollhardt P, Schore N., Traité de chimie organique, *De Boeck* (2009, 5^{ème} éd.)
- [18] Université de Prague : Fluorescence Polarization
www.jh-inst.cas.cz/~fluorescence/.../UFCH_fluorence_polarization (13.08.2012)
- [19] Time-Resolved Fluorescence Anisotropy
http://web1.johnshopkins.edu/csl/academics/ionchannels/CourseNotes/coursenotes2011/Vogel_Anisotropy.pdf (06.08.2012)
- [20] Fiche technique : Instructions NHS-fluorescein n°46406-46410, Thermo scientific (2011)
- [21] Weber G., Polarization of the fluorescence of solutions dans *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*, John Wiley et Sons (1966, 3^{ème} éd.), p. 217 à 240
- [22] Uniprot : P62894 Cyc_bovin, <http://www.uniprot.org/uniprot/P62894> (06.08.2012)

7. ANNEXES

- A Protocole de réglage et de mise en route de l'appareil Setup Hes
- B Vue d'ensemble des concentrations, des ratios et des pH pour chaque essai
- C Vue d'ensemble des anisotropies, des $t_{1/2}$ et des constantes de vitesse pour chaque essai
- D Valeurs des anisotropies pour la détermination du facteur Z

Sion, le 17 août 2012

Yvan Crittin

Annexe A : Protocole de réglage et de mise en route de l'appareil Setup Hes

1. Fermer le shutter et enclencher la source lumineuse, les robots des polarisateurs et le détecteur;



Image A.1 : interrupteurs principaux des sources lumineuses, des robots des polarisateurs et du détecteur

2. Installer l'objectif 40x ;
3. Installer le support pour un échantillon et ajuster la position de l'objectif à l'axe du support;
4. Placer le miroir pour la réflexion totale avec la face dorée face à l'objectif ;
5. Régler la caissette en position 4 correspondant à la transmittance totale ;
6. Régler la focale en obtenant la meilleure netteté à l'aide des jumelles et de la lampe supérieure du microscope ;



Image A.2 : vue d'ensemble de l'appareil Setup Hes avec le support de microplaque

7. Tourner la manette frontale afin de diriger le rayon vers le détecteur et lever le miroir réflecteur en mode FP;

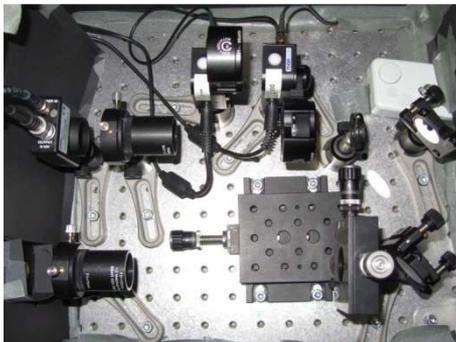


Image A.3 : vue aérienne du compartiment des polarisateurs de sortie et du détecteur

8. Selon le choix de la source lumineuse, abaisser la loupe et la source LED pour le laser ou lever la lampe pour le mode LED en amont du microscope;

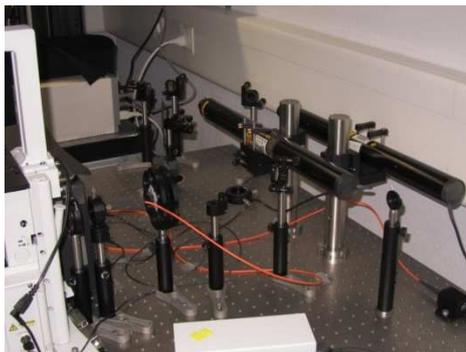


Image A.4 : vue d'ensemble des sources lumineuses, des filtres OD et du polarisateur d'entrée

9. Installer le carton et le drap noir sur le compartiment du détecteur, éteindre la lumière de la salle fermer la porte à clé et brancher le câble au détecteur ;
10. Ouvrir le shutter et contrôler avec un papier blanc l'absence de lumière intense aux jumelles;
11. Régler les OD pour le laser ou l'intensité de la LED de façon à obtenir un signal dans le domaine de mesure du détecteur ;
12. Régler le polarisateur parallèle à son intensité maximale et le polarisateur perpendiculaire à son intensité minimale ;
13. Fermer le shutter et régler la caissette sur la position n°1 pour le laser ou sur la position n°3 pour la LED ;
14. Tourner la manette frontale afin de diriger le rayon vers les jumelles;
15. Désinstaller le miroir, fixer le support avec la microplaque;
16. Transférer 200 μ l d'une solution du marqueur à concentration élevée (200 μ M) dans le port échantillon ;
17. Placer l'objectif à l'axe du puits concerné, ouvrir le shutter, contrôler l'intensité lumineuse aux jumelles et baisser l'objectif au maximum ;
18. Régler la netteté en surface inférieure du liquide et immerger la focale dans l'échantillon en tournant la manette de l'objectif vers soi de 30°;
19. Tourner la manette frontale afin de diriger le rayon vers le détecteur
20. Régler les OD pour le laser ou l'intensité de la LED de façon à obtenir un signal dans le domaine de mesure du détecteur ;
21. Vérifier les intensités maximale et minimale des polarisateurs et si besoin, ajuster à la main les angles des polarisateurs ;
22. Fermer le shutter

- ☞ **Contrôler aux jumelles l'absence totale de réflexion du rayon dans la paume de la main ou à l'aide d'un papier !**
- ☞ **Vérifier l'absence de métaux comme des bagues pouvant réfléchir le rayon du laser !**

Annexe B : Vue d'ensemble des concentrations, des ratios et des pH pour chaque essai

Graphique	Appareil	Répétition	Marqueur	Protéine	Ratio	c marqueur init. [μM]	c protéine init. [μM]	c marqueur [μM]	c protéine [μM]	pH [-]	c OH- [μM]
3.1	MD	2	CFSE	lysozyme	1:5	35	175	17.5	87.5	8.3	2.0
	MD	1	CFSE		blanc	35		17.5		8.3	2.0
3.2	MD	1	FITC		blanc	27		13.5		7.4	0.3
	MD	1	FITC		blanc	27		13.5		9.1	12.6
	MD	1	FITC		blanc	27		13.5		11.3	1995.3
3.3	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	27	204	13.5	102	7.4	0.3
	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	27	208	13.5	104	9.1	12.6
	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	27	207	13.5	103.5	11.3	1995.3
3.4	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	170	372	85	186	8.3	2.0
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	170	372	85	186	8.3	2.0
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	170	372	85	186	8.3	2.0
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	170	372	85	186	8.3	2.0
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	170	372	85	186	8.3	2.0
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	170	372	85	186	8.3	2.0
3.6	MD	1	CFSE	lysozyme	1:10	3.4	34	1.7	17	8.3	2.0
	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	3.4	34	1.7	17	9.1	12.6
	MD	1	CFSE		blanc	3.4		1.7		8.3	2.0
	MD	1	FITC		blanc	3.4		1.7		9.1	12.6
3.7 et 3.21	Setup Hes	3	ATTO	lysozyme	1:6	7.4	48	3.7	24	8.3	2.0
	Setup Hes	1	ATTO		blanc	7.4		3.7		8.3	2.0
3.8	MD	2	FITC	lysozyme	1:8	27	208	13.5	104	7.4	0.3
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	27	20.8	13.5	10.4	7.4	0.3
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	27	3.4	13.5	1.7	7.4	0.3
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	136	20.8	68	10.4	7.4	0.3
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	136	104	68	52	7.4	0.3
3.9 et 3.11	MD	2	FITC	lysozyme	1:8	27	208	13.5	104	9.1	12.6
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	27	20.8	13.5	10.4	9.1	12.6
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	27	3.4	13.5	1.7	9.1	12.6
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	136	20.8	68	10.4	9.1	12.6
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	136	104	68	52	9.1	12.6
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	136	104	68	52	9.1	12.6
3.10	MD	2	CFSE	lysozyme	1:11	34	387	17	193.5	8.3	2.0
	MD	2	CFSE	lysozyme	1:1	340	387	170	193.5	8.3	2.0
	MD	2	CFSE	lysozyme	1:11	3.4	38.7	1.7	19.35	8.3	2.0
	MD	2	CFSE	lysozyme	1:1	34	38.7	17	19.35	8.3	2.0
	MD	2	CFSE	lysozyme	9:1	340	38.7	170	19.35	8.3	2.0
	MD	2	CFSE		blanc	340		170		8.3	2.0
3.14	MD	1	CFSE	lysozyme	1:10	34	340	17	170	8.3	2.0
	MD	1	CFSE	lys + tween	1:10	34	340	17	170	8.3	2.0
	MD	1	CFSE		blanc	34		17		8.3	2.0
3.15	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	34	340	17	170	9.1	12.6
	MD	1	FITC	lys + tween	1:10	34	340	17	170	9.1	12.6
	MD	1	FITC		blanc	34		17		9.1	12.6
3.16	MD	1	CFSE	lysozyme	1:10	17	175	8.5	87.5	8.3	2.0
	MD	1	CFSE	cytochrome	1:10	17	178	8.5	89	8.3	2.0
	MD	1	CFSE		blanc	17		8.5		8.3	2.0
3.17	MD	1	FITC	lysozyme	blanc	17	88	8.5	44	9.1	12.6
	MD	1	FITC	cytochrome	blanc	17	89	8.5	44.5	9.1	12.6
	MD	1	FITC		blanc	17		8.5		9.1	12.6
3.20	Setup Hes	1	FITC	lysozyme	1:10	24	240	12	120	9.1	12.6
	Setup Hes	1	FITC	lysozyme	1:5	24	120	12	60	9.1	12.6
	Setup Hes	1	FITC	lysozyme	1:1	24	24	12	12	9.1	12.6

Annexe C : Vue d'ensemble des anisotropies, des $t_{1/2}$ et des constantes de vitesse pour chaque essai

Graphique	Appareil	Répétition	Marqueur	Protéine	Ratio	r_0 [-]	r_{max} [-]	Δr [-]	$r_{1/2}$ [-]
3.1	MD	2	CFSE	lysozyme	1:5	0.138	0.303	0.165	0.221
	MD	1	CFSE		blanc	0.138	0.148	0.010	0.143
3.2	MD	1	FITC		blanc	0.115	0.119	0.004	0.117
	MD	1	FITC		blanc	0.115	0.153	0.038	0.134
	MD	1	FITC		blanc	0.115	0.226	0.111	0.171
3.3	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	0.115	0.285	0.170	0.200
	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	0.115	0.290	0.175	0.203
	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	0.115	0.279	0.164	0.197
3.4	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	0.135	0.305	0.170	0.220
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	0.134	0.176	0.042	0.155
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	0.134	0.163	0.029	0.149
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	0.130	0.150	0.020	0.140
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	0.130	0.147	0.017	0.139
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:2	0.118	0.135	0.017	0.127
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:10	0.151	0.234	0.083	0.193
3.6	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	0.125	0.240	0.115	0.183
	MD	1	CFSE		blanc	0.151	0.155	0.004	0.153
	MD	1	FITC		blanc	0.125	0.130	0.005	0.128
	MD	1	FITC		blanc	0.125	0.130	0.005	0.128
3.7 et 3.21	Setup Hes	3	ATTO	lysozyme	1:6	0.116	0.208	0.092	0.162
	Setup Hes	1	ATTO		blanc	0.116	0.119	0.003	0.118
4.8	MD	2	FITC	lysozyme	1:8	0.105	0.299	0.194	0.202
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	0.105	0.210	0.105	0.158
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	0.105	0.149	0.044	0.127
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	0.105	0.149	0.044	0.127
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	0.105	0.241	0.136	0.173
3.9 et 3.11	MD	2	FITC	lysozyme	1:8	0.105	0.297	0.192	0.201
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	0.105	0.267	0.162	0.186
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	0.105	0.200	0.095	0.153
	MD	2	FITC	lysozyme	8:1	0.105	0.200	0.095	0.153
	MD	2	FITC	lysozyme	1:1	0.105	0.252	0.147	0.179
3.10	MD	2	CFSE	lysozyme	1:11	0.129	0.304	0.175	0.217
	MD	2	CFSE	lysozyme	1:1	0.129	0.264	0.135	0.197
	MD	2	CFSE	lysozyme	1:11	0.129	0.228	0.099	0.179
	MD	2	CFSE	lysozyme	1:1	0.129	0.240	0.111	0.185
	MD	2	CFSE	lysozyme	9:1	0.129	0.159	0.030	0.144
3.14	MD	2	CFSE		blanc	0.129	0.129	0.000	0.129
	MD	1	CFSE	lysozyme	1:10	0.126	0.292	0.166	0.209
	MD	1	CFSE	lys + tween	1:10	0.126	0.231	0.105	0.179
	MD	1	CFSE		blanc	0.126	0.131	0.005	0.129
3.15	MD	1	FITC	lysozyme	1:10	0.114	0.270	0.156	0.192
	MD	1	FITC	lys + tween	1:10	0.114	0.225	0.111	0.170
	MD	1	FITC		blanc	0.114	0.122	0.008	0.118
3.16	MD	1	CFSE	lysozyme	1:10	0.145	0.286	0.141	0.216
	MD	1	CFSE	cytochrome	1:10	0.145	0.172	0.027	0.159
	MD	1	CFSE		blanc	0.145	0.145	0.000	0.145
3.17	MD	1	FITC	lysozyme	blanc	0.128	0.210	0.082	0.169
	MD	1	FITC	cytochrome	blanc	0.128	0.155	0.027	0.142
	MD	1	FITC		blanc	0.128	0.137	0.009	0.133
3.20	Setup Hes	1	FITC	lysozyme	1:10	0.080	0.124	0.044	0.102
	Setup Hes	1	FITC	lysozyme	1:5	0.080	0.123	0.043	0.102
	Setup Hes	1	FITC	lysozyme	1:1	0.080	0.100	0.020	0.090

Annexe D : Valeurs des anisotropies pour la détermination du facteur Z

Réaction CFSE + tampon		
N° puits	t _{0 min}	t _{50 min}
1	0.107	0.104
2	0.108	0.103
3	0.109	0.103
4	0.107	0.103
5	0.105	0.104
6	0.106	0.103
7	0.106	0.104
8	0.107	0.104
9	0.105	0.103
10	0.105	0.102
11	0.106	0.103
12	0.105	0.104
13	0.106	0.103
14	0.105	0.104
15	0.107	0.103
16	0.106	0.102
17	0.106	0.104
18	0.104	0.102

Réaction CFSE + tampon + lysozyme		
N° puits	t _{0 min}	t _{50 min}
19	0.125	0.137
20	0.122	0.138
21	0.121	0.137
22	0.124	0.138
23	0.122	0.138
24	0.119	0.134
25	0.123	0.138
26	0.124	0.137
27	0.122	0.136
28	0.124	0.137
29	0.12	0.137
30	0.116	0.133
31	0.125	0.136
32	0.119	0.136
33	0.117	0.134
34	0.122	0.137
35	0.116	0.135
36	0.116	0.133