

CALCUL DES FRANGES DE DIFFRACTION OBSERVÉES
SUR LES CLICHÉS D'ÉLECTROPHORÈSE OBTENUS
PAR L'APPAREILLAGE DE LONGSWORTH

par

A. DISTÈCHE*

Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences, Université de Liège (Belgique)

Les phénomènes de diffraction que l'on peut observer sur les clichés photographiques obtenus au moyen des appareils d'électrophorèse du type LONGSWORTH-MAC INNES, ont été décrits par LONGSWORTH¹.

La disposition des franges et la présence du couteau sont déjà, à première vue, une indication que le phénomène rentre dans le cas général de la diffraction de la lumière par un écran à bord droit². En réalité, il s'agit d'un cas particulier plus compliqué, car l'écartement des franges varie avec le gradient: elles sont d'autant plus fines et serrées que le gradient est élevé et que sa variation est forte. Néanmoins, l'analogie est suffisante pour que l'on puisse déjà prévoir, comme le fait implicitement LONGSWORTH, que l'ombre géométrique — qui correspond au contour exact des courbes de gradient — est définie, sur les clichés, par le lieu des points où l'intensité lumineuse (I) est égale au quart de l'intensité (I_0) reçue sur la plaque en un point où le couteau ne produit pas d'ombre.

On sait que le repérage du contour exact est très important. La surface délimitée par la courbe de gradient et la ligne de base est proportionnelle à la concentration de la protéine responsable de la limite. La forme de la courbe doit être connue avec précision pour les mesures de diffusion que l'on peut faire avec le même dispositif optique.

On peut faire coïncider le lieu des points d'intensité $\frac{I_0}{4}$ avec la limite ombre-lumière

observée sur la plaque, en choisissant soigneusement les temps de pose et de développement et le matériel photographique. Le repérage du contour se fait alors facilement soit par photométrie, soit par calques et agrandissements. La luminosité de l'appareil dépendant de la nature des extraits protéiniques examinés, il n'est pas toujours facile de réaliser ces conditions de technique photographique et la précision du repérage peut en souffrir. Les franges de diffraction, par contre, sont aisément repérables et il serait possible, si l'on désire une très grande précision (dans le cas de mesures de diffusion par exemple), de construire par points la courbe à partir du lieu d'une frange nette, à condition de connaître l'écartement des franges pour chaque valeur du gradient. La connaissance de ces écartements permettrait aussi de vérifier si la technique photographique est au point. Ces quelques considérations et aussi l'intérêt théorique du phéno-

* Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

Bibliographie p. 154.

mène nous ont conduit à calculer, en utilisant les procédés courants de l'optique physique, la position des franges de diffraction et à vérifier qu'il s'agissait bien d'un cas particulier de la diffraction par un bord droit.

A. THÉORIE

Les divers éléments essentiels d'un appareil du type LONGSWORTH sont représentés sur la Fig. 1. La cellule est éclairée par un faisceau de lumière parallèle monochromatique. La source *S* est une fente horizontale très étroite. Le plus souvent, on utilise une seule grande lentille (Schlierenlinse) placée devant la cellule qui est alors éclairée par un faisceau convergent. Les calculs sont plus simples en lumière parallèle et les résultats seront valables pour un système convergent si la convergence est faible, cas toujours réalisé.

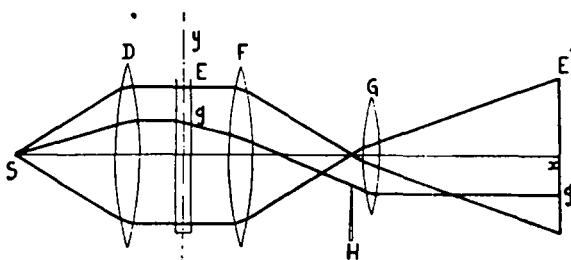


Fig. 1. Schéma du dispositif optique de l'appareillage électrophorétique du type LONGSWORTH

Rappelons que l'image *E'* est limitée par une fente verticale très étroite, placée devant la plaque photographique. Le plan *x y* (plan de la feuille) pourra donc nous servir à définir complètement les différents plans et les surfaces d'ondes que nous aurons à considérer. L'axe *y* définit le plan objet dans la cellule.

La lumière provenant de la cellule est diffractée sur le plan *E'* par l'ouverture délimitée par le bord droit du couteau *H* et les bords de la lentille *G*.

L'évaluation de l'intensité lumineuse sur l'image *E'* peut se faire en remplaçant la source lumineuse réelle par des sources fictives convenablement réparties sur la surface d'onde délimitée par l'ouverture considérée (principe de Huygens). Chaque point de cette source éclaire le plan *E'* et on trouvera l'intensité lumineuse en un point de l'image en faisant la sommation de l'action des sources fictives sur ce point, compte tenu des différences de phases.

Dans le cas qui nous occupe, le problème est compliqué par la présence de lentilles qui interviennent dans l'évaluation des chemins optiques et parce que la répartition de l'intensité sur la source de Huygens n'est pas uniforme à cause des gradients d'indice dans la cellule.

La difficulté due aux lentilles peut être résolue facilement de la façon suivante. Formons l'image de *E'* par rapport à l'ensemble *F, G*; cette nouvelle image *E''* est confondue avec le plan *y z* dans la cellule. Formons également l'image du couteau, que nous supposerons en *y = 0* (voir plus loin), par rapport à la lentille *F*; cette image sera rejetée à l'infini, à gauche ou à droite de la cellule. Tout se passe donc comme si la cellule *E* envoyait de la lumière sur un demi plan à l'infini. La trajectoire des rayons s'obtient en prolongeant les rayons réels, définissant ainsi la répartition à l'infini des sources de Huygens, qui diffusent de la lumière sur chaque point de l'image *E''* confondue avec la cellule *E*.

La difficulté due à la répartition non uniforme de l'intensité lumineuse sur la source de Huygens peut être résolue par un changement de variable qui consiste à définir la position des rayons dans le système *x, y* de la cellule où l'éclairage est constant. La

sommation des actions lumineuses dues aux sources fictives se fera tout le long du faisceau non intercepté par le couteau.

Il ne nous reste plus qu'à définir la surface d'onde due au gradient dans la cellule. Nous admettrons, pour simplifier, que le gradient d'indice dans la cellule est linéaire et de la forme:

$$\frac{dn}{dy} = -2a y \quad (a \text{ étant une constante positive}) \quad (1)$$

D'où on tire:

$$n = n_0 - a y^2 \quad (2)$$

La surface d'onde après passage dans la cellule est définie par:

$$e n + x = e n_0 + E \quad (3)$$

e est le chemin parcouru dans la cellule, soit l'épaisseur de la cellule, les déviations étant petites; x est le chemin dans l'air après le passage de l'onde dans la cellule; E est une constante.

De (2) et (3), on tire:

$$x = e(n_0 - n) + E = e a y^2 + E \quad (4)$$

La vibration élémentaire envoyée par un élément de l'onde Ω (Fig. 2) dans la cellule, sur la source de HUYGENS à l'infini, est de la forme

$c' \cos\left(\omega t - \frac{2\pi r}{\lambda}\right)$ où r est la distance séparant la cellule de la source diffractante. Les autres symboles ont leur signification habituelle. La vibration élémentaire diffractée en un point y_1 de l'image E' sera, en ramenant le tout aux coordonnées de la cellule et en prenant a suffisamment petit:

$$dS = C dy \cos\left(\omega t + \frac{2\pi \delta}{\lambda}\right) \quad (5)$$

δ est la différence de marche entre le rayon issu d'un point d'ordonnée y dans la cellule E et le rayon diffracté en y_1 sur l'image E' .

On a (Fig. 2):

$$\delta = -a(y_1 - y) \quad a \text{ étant petit} \quad (6)$$

La relation (4) nous donne:

$$a \equiv \frac{dx}{dy} = 2eay \quad (7)$$

On trouve, en combinant (6) et (7):

$$\delta = -2eay(y_1 - y) \quad (8)$$

Choisissons un cas particulier et admettons qu'en $y = 0$ il y ait un gradient tel que, pour masquer le pinceau lumineux dévié correspondant, le bord du couteau doive être placé en $y = 0$ également.

Dans ces conditions, l'action totale de la source de HUYGENS sur le point y_1 sera, h étant l'ordonnée du bord extrême de la cellule:

$$S = C \int_{-h}^0 \cos \left[\omega t - \frac{4\pi e a}{\lambda} (y_1 - y) y \right] dy \quad (9)$$

ou en développant:

$$S = C \cos \omega t \int_{-h}^0 \cos A (y_1 - y) y dy + C \sin \omega t \int_{-h}^0 \sin A (y_1 - y) y dy \quad (10)$$

On voit que S est de la forme $E \cos \omega t + F \sin \omega t$ et l'intensité au point y_1 sera donnée par:

$$I = C^2 (E^2 + F^2) \quad (11)$$

On peut écrire successivement*:

$$\begin{aligned} E &= \int_{-h}^0 \cos A (y_1 - y) y dy = \int_{-h}^0 \cos \left[A \left(y - \frac{y_1}{2} \right)^2 - \frac{A y_1^2}{4} \right] dy \\ &= \cos \frac{A y_1^2}{4} \int_{-(h + \frac{y_1}{2})}^{-\frac{y_1}{2}} \cos A u^2 du + \sin \frac{A y_1^2}{4} \int_{-(h + \frac{y_1}{2})}^{-\frac{y_1}{2}} \sin A u^2 du \end{aligned} \quad (12)$$

$$F = \cos \frac{A y_1^2}{4} \int_{-(h + \frac{y_1}{2})}^{-\frac{y_1}{2}} \sin A u^2 du - \sin \frac{A y_1^2}{4} \int_{-(h + \frac{y_1}{2})}^{-\frac{y_1}{2}} \cos A u^2 du \quad (13)$$

En posant $\int \sin A u^2 du = \theta$ et $\int \cos A u^2 du = \varphi$, on trouve:

$$I = C^2 (\theta^2 + \varphi^2) \quad (14)$$

Les intégrales θ et φ se ramènent aux intégrales de Fresnel

$\eta = \int_0^v \sin \frac{\pi}{2} v^2 dv$ et $\xi = \int_0^v \cos \frac{\pi}{2} v^2 dv$ en posant $A u^2 = \frac{\pi}{2} v^2$. Il vient, en tenant compte de ce que $\sqrt{\frac{2A}{\pi}} \left(h + \frac{y_1}{2} \right)$ est grand et de la nature particulière des fonctions η et ξ^2 :

$$\begin{aligned} I &= \frac{\pi C^2}{2A} \left[\left(\int_{-\infty}^{-\sqrt{\frac{A}{2\pi}} y_1} \sin \frac{\pi}{2} v^2 dv \right)^2 + \left(\int_{-\infty}^{-\sqrt{\frac{A}{2\pi}} y_1} \cos \frac{\pi}{2} v^2 dv \right)^2 \right] \\ &= \frac{I_0}{2} [(\eta_{y_1} - \eta_{-\infty})^2 + (\xi_{y_1} - \xi_{-\infty})^2] \quad (y_1 < 0) \end{aligned} \quad (15)$$

* La solution de cette intégrale nous a été aimablement communiquée par Monsieur J. TIRS, Aspirant au F.N.R.S.

Si l'on supprime le couteau, les limites d'intégration deviennent $-\infty$ et $+\infty$ et la somme des termes entre crochets dans (15) devient égale à 2. L'intensité I en y , étant alors égale à I_0 , le coefficient $\frac{\pi C^2}{2A}$ doit donc être de la forme $\frac{I_0}{2}$.

L'expression (15) est complètement analogue à celle obtenue dans le cas général de la diffraction par un écran à bord droit. On peut montrer aisément en utilisant une spirale de CORNU² que:

1. l'ombre géométrique correspond à une intensité $\frac{I_0}{4}$;

2. le second membre de (15) est maximum ou minimum respectivement pour des valeurs de v_k et v'_k données par les formules:

$$v_k = \sqrt{4k - 2.5} = \sqrt{\frac{A}{2\pi}} y_k \text{ et } v'_k = \sqrt{4k - 0.5} = \sqrt{\frac{A}{2\pi}} y'_k \quad k = 1, 2, 3, \dots \quad (16)$$

Les ordonnées y_k pour lesquelles on observera un maximum d'intensité sont:

$$y_1 = \frac{1.22}{\sqrt{\frac{A}{2\pi}}}, y_2 = \frac{2.34}{\sqrt{\frac{A}{2\pi}}}, y_3 = \frac{3.08}{\sqrt{\frac{A}{2\pi}}}, \dots y_k = \frac{\sqrt{4k - 2.5}}{\sqrt{\frac{A}{2\pi}}} \quad (17)$$

Les ordonnées pour lesquelles on observera un minimum d'intensité sont:

$$y'_1 = \frac{1.87}{\sqrt{\frac{A}{\pi^2}}}, y'_2 = \frac{2.74}{\sqrt{\frac{A}{2\pi}}}, y'_3 = \frac{3.40}{\sqrt{\frac{A}{2\pi}}}, \dots y'_k = \frac{\sqrt{4k - 0.5}}{\sqrt{\frac{A}{2\pi}}} \quad (18)$$

On voit immédiatement que l'écartement des franges dépend de A , c.à.d. du gradient, et qu'elles sont d'autant plus serrées que le gradient est plus élevé.

Il nous reste maintenant à calculer numériquement les écartements et par conséquent à déterminer la valeur de $\sqrt{\frac{A}{2\pi}}$.

On sait que le gradient d'indice définissant une frontière de migration est en réalité de la forme³:

$$n'(\bar{y}) = \frac{dn}{d\bar{y}} = \frac{\Delta n}{2\sqrt{\pi D t}} e^{-\frac{\bar{y}^2}{4Dt}} \quad (19)$$

Dans cette expression, le sommet de la courbe est en $\bar{y} = 0$; Δn est la différence d'indice entre les deux milieux extrêmes; D est la constante de diffusion de la protéine responsable de la limite; t est le temps en secondes.

La courbe intégrale de (19) est une courbe en S. Rappelons que nous avons choisi comme répartition des indices dans la cellule une parabole représentée par l'équation (2). Nous pouvons maintenant considérer cette parabole comme étant la parabole osculatrice à la courbe intégrale de (19) et écrire:

$$\frac{d^2n}{dy^2} = \frac{-\bar{y} \frac{du}{dy}}{2Dt} = -2a \quad \text{d'où} \quad a = \frac{\bar{y}n'(\bar{y})}{4Dt} \quad (20)$$

La constante A est définie par les relations (9) et (10):

$$A = \frac{4\pi e a}{\lambda} \quad \text{et} \quad \frac{A}{2\pi} = \frac{2ea}{\lambda} \quad (21)$$

Si β est l'angle que fait avec l'axe y la tangente à la courbe de gradient (19), on voit immédiatement que:

$$2a = \operatorname{tg}\beta \quad (22)$$

$\operatorname{tg}\beta$ se calcule facilement par une mesure directe sur les clichés en tenant compte des constantes de l'appareil.

B. CALCULS NUMÉRIQUES ET VÉRIFICATION EXPÉRIMENTALE

1. Les relations (17), (18), (21) et (22) permettent une vérification immédiate de la théorie.

Les relations (17) donnent les rapports caractéristiques suivants:

$$\frac{y_3 - y_1}{y_5 - y_1} = 0.60, \quad \frac{y_2 - y_1}{y_4 - y_1} = 0.45, \quad \frac{y_3 - y_1}{y_5 - y_1} = 0.38 \quad (23)$$

En tenant compte de (17), (18), (21) et (22), on voit que les écartements des franges pris à deux niveaux d'une courbe de gradient et caractérisés par deux valeurs différentes de $\operatorname{tg}\beta$, sont entre eux comme la racine carrée de l'inverse du rapport des tangentes:

$$\frac{(y_3 - y_1)_1}{(y_2 - y_1)_2} = \frac{(y_2 - y_1)_1}{(y_3 - y_1)_2} = \dots = \sqrt{\frac{\operatorname{tg}\beta_3}{\operatorname{tg}\beta_1}} \quad (24)$$

Les tableaux ci-dessous rassemblent quelques mesures faites sur des gradients réels:

1.

				$\frac{y_3 - y_1}{y_5 - y_1}, \frac{y_2 - y_1}{y_4 - y_1}, \dots$
$y_2 - y_1, y_3 - y_1, \dots 10^{-1} \text{ mm}$				
6	10	13.5	—	0.60
3.5	6	7.5	9	0.58
4	6.5	9	11	0.62
7.5	13	17	—	0.58
				0.44

2.

$\frac{(y_3 - y_1)_1}{(y_2 - y_1)_2}$	$\frac{7.5}{3.5} = 2.1$	$\frac{7.5}{5.0} = 1.5$	$\frac{9.0}{6.0} = 1.5$	$\frac{12}{6.0} = 2.0$	$\frac{8.0}{6.0} = 1.3$
$\sqrt{\frac{\operatorname{tg}\beta_3}{\operatorname{tg}\beta_1}}$	$\sqrt{\frac{38.2}{7.1}} = 2.3$	$\sqrt{\frac{22.9}{7.2}} = 1.8$	$\sqrt{\frac{8.1}{4.3}} = 1.4$	$\sqrt{\frac{19}{5.4}} = 1.9$	$\sqrt{\frac{22}{14}} = 1.25$

On voit, d'après ces deux tableaux, que la théorie développée plus haut est en très bon accord avec les résultats expérimentaux. La mesure directe des distances $y_2 - y_1$, $y_3 - y_1$ etc. permet de calculer immédiatement la position du bord géométrique; il est donc possible de tracer le contour exact du gradient à partir de la position de deux franges facilement repérables au moyen d'un simple compas de proportion.

Repronons par exemple le microphotogramme des franges publié par LONGSWORTH (Fig. 3). L'auteur situe l'ombre géométrique en h_o , sensiblement à une intensité caractérisée par $\frac{d_o}{4}$ où d_o est le noircissement. La mesure de l'écartement des franges montre

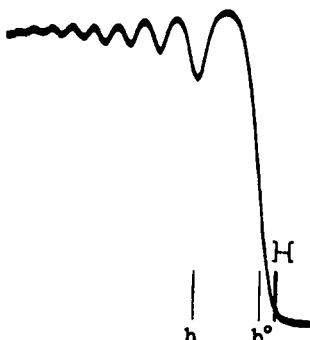


Fig. 3. Microphotogramme des franges de diffraction (d'après LONGSWORTH¹⁾)

qu'en réalité l'ombre géométrique correspond presque exactement à la limite ombre-lumière enregistrée, soit H sur la figure. Les écarts mesurés à partir de h_o sont en effet pour $y_1, y_2, y_3: 0.7, 1.7, 2.3$. Les relations (23) sont satisfaites, mais les équations (17) ne se vérifient qu'à condition de placer le bord géométrique en H ; les écarts y_1, y_2, y_3 deviennent alors $0.7 + 0.3, 1.7 + 0.3, 2.3 + 0.3$. L'ombre géométrique correspond à un noircissement déterminé, mais qui dépend des caractéristiques du matériel photographique, du choix du temps de pose et des conditions de développement.

2. Les équations (17) à (22) peuvent aussi servir à calculer la valeur absolue des écarts.

a. Ecartements calculés d'après les clichés expérimentaux, au moyen des équations (22), (21) et (17):

Constantes: distance couteau-cellule corrigée pour le trajet dans la cuve thermostatique: $R = 100$ cm; $e = 0.6$ cm; $\lambda = 5 \cdot 10^{-5}$ cm. Rapport déplacement couteau/plaque: $1/7$ ou $1/14$; $\frac{I}{c}$ grandissement: $G = 0.875$.

β'	$\operatorname{tg} \beta'$	$a = \frac{\operatorname{tg} \beta'}{2 \operatorname{Rec}}$	$\frac{A}{2\pi} = 2.4 \cdot 10^4 a$	Ecartements calculés		Ecartements observés $\times \frac{I}{G}$	
				y_1	y_2	y_1	y_2
61°	1.80	$\frac{0.9}{420}$	51	0.170	0.33	0.17	0.34
$88^\circ 30'$	38.2	$\frac{19.1}{420}$	1090	0.037	0.07	0.035	0.07
87°	19	$\frac{9.5}{840}$	270	0.075	0.14	0.07	0.135

L'accord est aussi bon que possible.

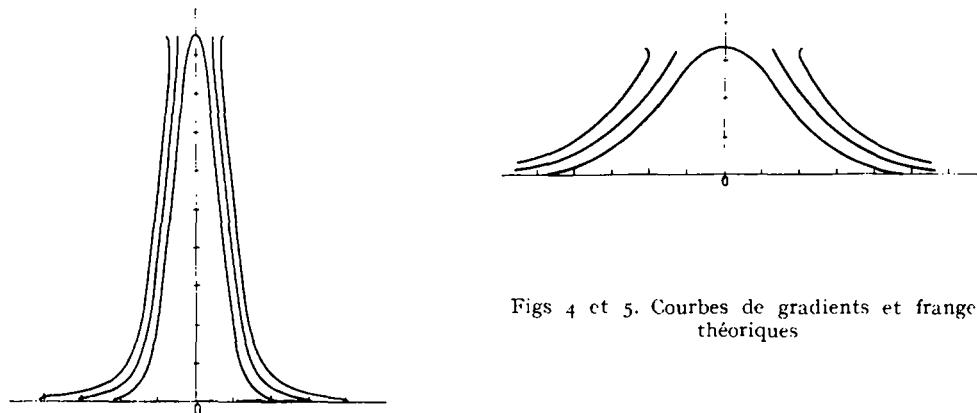
b. Courbes de gradient et franges calculées d'après les équations (19), (20) et (17).

Constantes: $D = 5 \cdot 10^{-7}$, $\Delta n = 0.0043$, $R = 100$ cm, $\frac{I}{c} = 1/7$, $e = 0.5$ cm, $\lambda = 5 \cdot 10^{-5}$ cm, grandissement 1.

Les Figures 4 et 5 montrent les courbes de gradients et la disposition des franges pour des temps $t = 36000$ et 288000 sec.

L'allure des phénomènes de diffraction est semblable à celle observée sur les clichés réels (Figs 6 et 7).

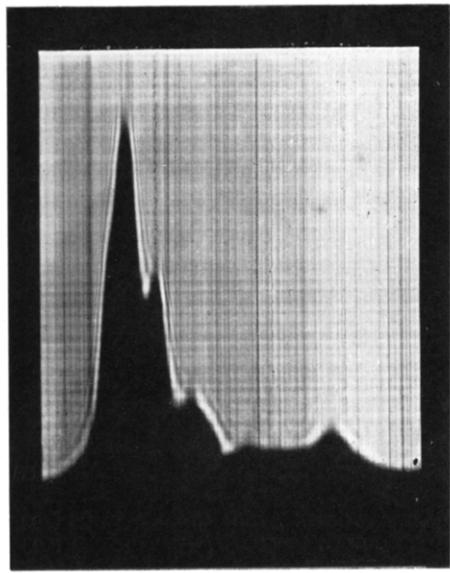
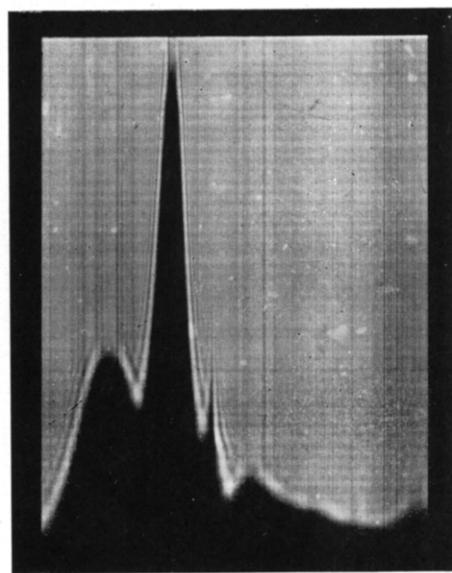
On voit que les franges s'écartent légèrement au sommet et que leur disparition



Figs 4 et 5. Courbes de gradients et franges théoriques

permet de situer exactement le point de gradient maximum. Pour des gradients très petits, la présence de franges est un indice certain de l'existence de ces gradients.

Ajoutons, pour terminer, quelques mots sur l'importance des fentes utilisées dans l'appareil. Les franges et la limite de l'ombre sont d'autant mieux définies que les fentes sont étroites. Une fente large à la source lumineuse produit une superposition des contours et des franges, légèrement décalés les uns par rapport aux autres. Cet effet est surtout important, là où la variation du gradient est faible, c'est-à-dire au



Figs 6 et 7. Clichés expérimentaux d'électrophorèses de protéines musculaires. Appareillage du type LONGSWORTH décrit par DUBUSSON ET JACOB⁴

Bibliographie p. 154.

sommet et à la base des contours. L'ombre géométrique ne correspond plus aux points $I_{\frac{1}{2}}$, mais pourra encore être précisée d'après la position des franges si celles-ci sont visibles. On réglera la dimension des fentes d'après les clichés.

C. CONCLUSIONS

Les phénomènes de diffraction observés sur les clichés d'électrophorèse à l'aide de l'appareillage décrit par LONGSWORTH rentrent dans le cadre général de la diffraction de la lumière par un écran à bord droit. Ils en forment un cas particulier intéressant. On peut, en utilisant les équations que nous avons établies, calculer la position des franges en fonction du gradient observé.

Le contour exact des courbes de gradients est défini par le lieu des points d'intensité $I_{\frac{1}{2}}$. On peut, par une mesure directe de l'espacement des franges, vérifier si la limite ombre-lumière observée sur les clichés correspond bien au contour théorique. Eventuellement, le contour peut être tracé par points, à partir d'un repérage précis des franges.

Nous tenons à remercier bien vivement Monsieur F. TEMMERMAN, Ing. A. I. Br, pour l'enseignement et l'aide considérable qu'il nous a prodigués lors de l'élaboration de ce travail.

RÉSUMÉ

La position des franges de diffraction observées sur les clichés d'électrophorèse du type LONGSWORTH peut être calculée, en excellent accord avec l'expérience, en fonction du gradient observé et des constantes de l'appareil. Le phénomène est un cas particulier de la diffraction par un écran à bord droit, mais où l'écartement des franges est fonction du gradient. Le repérage précis des franges peut permettre de tracer par points le contour exact de la courbe de gradients.

SUMMARY

The positions of the diffraction bands observed on LONGSWORTH electrophoresis photographs can be calculated in excellent agreement with the experimental results from the gradient observed and the constants of the apparatus. This phenomenon is a special case of diffraction by a screen with straight edges, however the interval between the bands is a function of the gradient. By marking the precise position of the bands the curve of the gradients can be drawn point by point.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Lage der Diffraktionsbanden, welche man auf den photographischen Aufnahmen einer im LONGSWORTH'schen Apparate ausgeführten Elektrophorese beobachtet, können in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen aus dem beobachteten Gradienten und den Konstanten der Apparatur berechnet werden. Diese Erscheinung ist ein besonderer Fall der Diffraktion durch einen Schirm mit geradem Rand, wo aber die Entfernung der einzelnen Banden vom Gradienten abhängt. Zeichnet man die Banden genau ein, so findet man punktweise den genauen Verlauf der Kurve der Gradienten.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 LONGSWORTH, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 1755.
- 2 G. BRUHAT, *Cours d'Optique*, Masson (1931) 179-196.
- 3 H. SVENSSON, *Arkiv. Kemi, Mineral., Geol.*, 22A no. 10 (1946) 78.
- 4 M. DUBUSSON ET J. JACOB, *Bull. soc. roy. Sci., Liège*, no. 3 (1945) 133.