

Resonance Light Scattering : théorie et application

Deraine Audrey*, Luc Bidel[§]

* Etudiante en 3^{ème} année de Licence CMI BBB, Faculté des Sciences, Université de Montpellier

[§] Maître de conférence, Chercheur, UMR IATE, CIRAD, Université de Montpellier

Résumé

La RLS (Resonance Light Scattering), et plus particulièrement, la ERLS, sont des techniques utilisées depuis une vingtaine d'années pour analyser des molécules et particulièrement des agrégats moléculaires de protéines par exemple. Nous avons tenté de reproduire dans cette étude les mesures de RLS de l'article de Y.F.Li *et al.* (2002) (12). Nous n'avons pas obtenu exactement les mêmes résultats mais ils sont similaires. La ERLS intervient bien mais, elle diminue de manière drastique pour les concentrations supérieures à $7,52 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/L}$. Nos expériences montrent que, bien que la technique de RLS soit sensible, elle reste assez difficile à comprendre et est très influencée par toute fluctuation intervenant dans le milieu de mesure.

Mots clés : Resonance Light Scattering, RLS, Diffusion de Rayleigh, ERLS, BSA, FCF

I. Introduction

Aujourd'hui, les techniques de détection et de caractérisation de molécule sont nombreuses. On pense par exemple à la spectrophotométrie, qui se base sur les propriétés optiques des molécules pour les analyser et donner une mesure d'absorbance (1) ; la chromatographie, qui elle est basée sur la séparation d'analytes via l'utilisation d'une phase stationnaire et d'une phase mobile qui entraîne avec elle, par élution, les analytes la partie d'intérêt restant accroché sur la phase stationnaire (2)(3). On pense aussi à la technique d'électrophorèse qui consiste essentiellement à faire migrer sur un gel des protéines et à les séparer en fonction de leur poids moléculaire. La liste faite ici n'est pas exhaustive, mais elle a pour but de montrer quelques unes des techniques utilisées aujourd'hui en routine dans les laboratoires, pour faire de l'analyse de molécule.

Cependant, ces techniques ont des sensibilités variables et ne sont pas toujours faciles à utiliser. Cela devient d'autant plus compliqué, quand il s'agit de faire de la quantification des

protéines présentes dans un mélange. Les interactions que peuvent établir les protéines d'un mélange avec leur environnement sont une vraie source d'interférence dans les mesures de quantification.

En spectrophotométrie ou spectrofluorométrie par exemple, on oublie trop souvent que les molécules sur lesquels on envoie un rayon lumineux, peuvent réémettre la lumière dans toutes les directions ce qui est responsable d'erreurs plus ou moins importantes.

La diffusion de la lumière nous la connaissons dans la vie de tous les jours sous la forme des couchers de soleil que l'on peut observer ou des arcs-en-ciel par exemple. Cette diffusion est dépendante de la composition du milieu que traverse le rayon lumineux.

Partant de ce constat, de nombreux chercheurs ont décidé d'utiliser cette diffusion à leur avantage pour développer une nouvelle technique: la Resonance Light Scattering (RLS, *en français : résonance de la diffusion de la lumière*).

Evoquée pour la première fois par Pasternack *et al.* en 1993 (11), cette technique utilise un simple spectrofluorimètre et est donc

assez facile à mettre en œuvre. Le plus souvent la RLS est utilisé sous forme de ERLS (Enhanced RLS, en français : *augmentation de la résonance de la diffusion de la lumière*). Cette technique a souvent été utilisée depuis les années 2000 pour caractériser des agrégats de protéines, de chromophores et même d'acides nucléiques (4) (5).

Dans cette étude, nous nous proposons de vérifier s'il est possible de mesurer cette ERLS avec un spectrofluorimètre FP-8300 Jasco sur des solutions de BSA.

II. Matériels et Méthode

Produits chimiques

- Protéine BSA

Fourni par l'UMR IATE, CIRAD (Montpellier, France). La BSA a une masse moléculaire de 66,430 kDa soit $66,430 \cdot 10^3$ g/mol. Les études cristallographiques à son sujet nous révèlent qu'elle mesure environ 217 Å (6) soit 21,7 nm et absorbe essentiellement à 279 nm. La protéine a une structure définie comme dans la Figure 1. Nous avons préalablement préparé une solution stock de 100ml à 0,376 µmol/L soit 25 µg/ml.

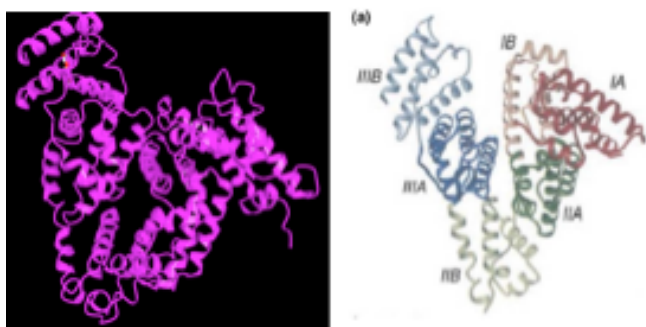


Figure 1. Structure 3D de la BSA (Bovine Serum Albumine) (7) (8)

- Le fluorochrome : Fast Green FCF

Fourni par l'UMR IATE, CIRAD (Montpellier, France). Nous avons préparé une solution stock de 100 ml à 1×10^{-4} mol/L soit 10 µmol/L.

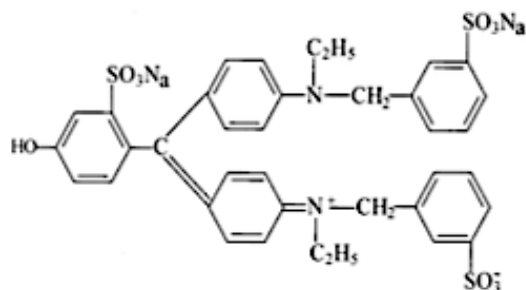


Figure 2. Structure moléculaire du Fast Green FCF

- Le tampon Britton-Robinson

Acheter chez Sigma-Aldrich, il est utilisé pour contrôler l'acidité du milieu. Il est composé de 0,04 mol/L de H_3BO_3 , de 0,04 mol/L de H_3PO_4 et de 0,04 mol/L de CH_3COOH . Nous n'avons pas ajuster le pH de la solution avant de l'utiliser.

- NaCl

Une solution stock de 100 mL à 1 mol/L de NaCl a été préparée.

Outils de mesure

Le spectre d'absorbance et de RLS ont été mesuré et enregistré à l'aide d'un spectrofluorimètre Jasco FP-8300 fourni par le laboratoire chimie de l'Université de Montpellier. Pour les mesure d'absorbance et de transmittance, le spectrofluorimètre a été équipé d'un miroir qui permet de reflécher la longueur d'onde (λ) d'excitation (λ_{exc}) et la longueur d'onde d'émission (λ_{em}).

Les mesures de fluorescence ont été réalisées une fois avec un miroir polarisant et une fois sans, et elles ont toutes été réalisées avec des filtres permettant de réduire l'intensité lumineuse émise pour ne réceptionner que 0,3% du signal sinon le spectrofluorimètre saturer. Nous avons aussi utilisé la fonction de spectre synchrone de fluorescence permettant de faire le monochromateur d'excitation se déplacer en parallèle du monochromateur d'émission.

Les mesure on été faite 2 fois pour les blancs, pour les autres solutions nous avons utilisé les répliques de manière à avoir au moins 2 mesures pour chaque solution.

Nous avons utilisé une cuve à quartz pour mettre les solutions dans le spectrofluorimètre.

Préparation des solutions

Les échantillons ont tous été préparés avec 0,6 mL de notre solution stock de NaCl, 1mL de la solution stock de FCF, 1 mL du tampon Britton-Robinson. Les solutions ont été complétées avec un volume variable d'H₂O et de solution stock de BSA pour avoir des concentrations croissantes allant de $7,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol/L}$ à $7,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$.

La composition exacte des solutions est détaillée en annexes (*Annexe 1 et 2*).

Les solutions ont été préparées en 3 répliquas chacune sauf les blancs.

III. Théorie

La RLS se base essentiellement sur la théorie de la diffusion de Rayleigh. C'est cette diffusion qui est responsable par exemple de la couleur du ciel, bleu la journée et rouge-orangé le soir (9).

La diffusion de Rayleigh a lieu lorsque la taille de la particule, qui interagit avec les photons incidents, est très inférieure (10 à 20 fois) à la longueur d'onde de ce rayonnement incident (10) et se produit dans toutes les directions.

L'intensité de cette diffusion de Rayleigh peut être décrite par une équation qui peut prendre plusieurs formes, mais celle que l'on retiendra a été établie par C.Z. Huang *et al.* (10) :

$$I = I_0 \frac{8000(2.303)^2 \pi V n^2 c}{3 \lambda_0^4 N_A} \times \left\{ \frac{\varepsilon^2(\lambda_0)}{4 \lambda_0^2} + \left[\frac{1}{\pi} \int_0^\infty \frac{\varepsilon(\lambda) d\lambda}{\lambda_0^2 - \lambda^2} \right]^2 \right\} = Kc$$

Eq. 1 équation décrivant l'intensité de la diffusion de Rayleigh dans le phénomène de RLS

I représente l'intensité de la diffusion de la lumière et λ sa longueur d'onde, I_0 est l'intensité du rayonnement incident et λ_0 sa longueur d'onde, c correspond à la concentration des diffuseurs, la partie entre crochet représente

respectivement la partie réelle et la partie imaginaire de l'indice de réfraction souvent nommé n .

Quand on compare cette équation avec celles qui peuvent exister sur le net (Wikipédia ou autre site discutant de la diffusion de Rayleigh), nous n'avons pas du tout la même organisation et il est difficile de déterminer comment les auteurs ont fait pour arriver à un tel résultat.

D'après ce même article, on peut s'attendre à avoir une très fort signal de RLS (c'est-à-dire de la ERLS) quand la partie imaginaire de l'indice de réfraction dans Eq.1.

Cependant la diffusion de Rayleigh n'est pas la seule qui existe et en particulier au niveau microscopique des molécules. En effet, la diffusion de Rayleigh concerne plutôt la diffusion dite « élastique », du fait qu'elle intervient pour des particules bien plus petites que la longueur d'onde du rayon incident. Les autres diffusion qui

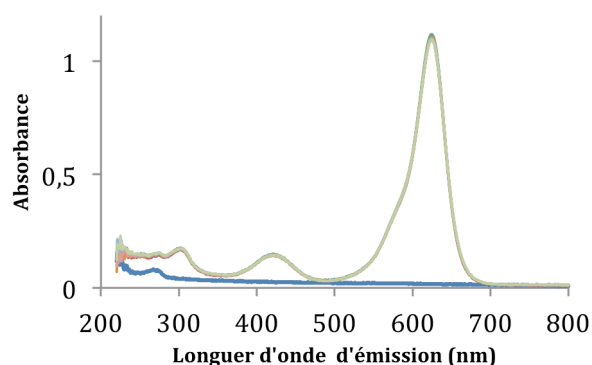


Figure 3. Spectre d'absorption de la BSA + solvant (BSA_Max) à $7,5 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$, du FCF + solvant (FCF_alone) à 10 $\mu\text{mol/L}$ et des solution de BSA + FCF (solution 1 à 7). La solution ne contenant ni BSA, ni FCF a servi de blanc pour cette mesure. Voir Annexe 1 pour le détail des solutions.

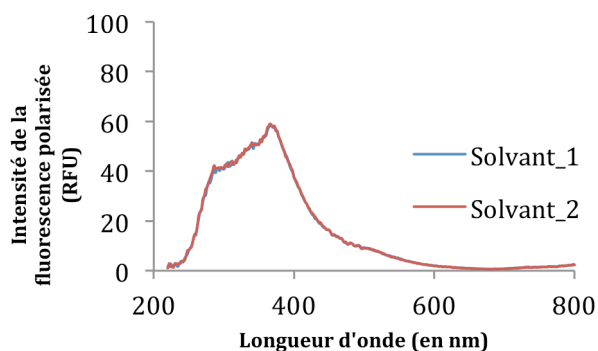


Figure 4. Spectre de fluorescence de la solution de solvant mesurer avec le miroir polarisant. Composition décrite en Annexe 1

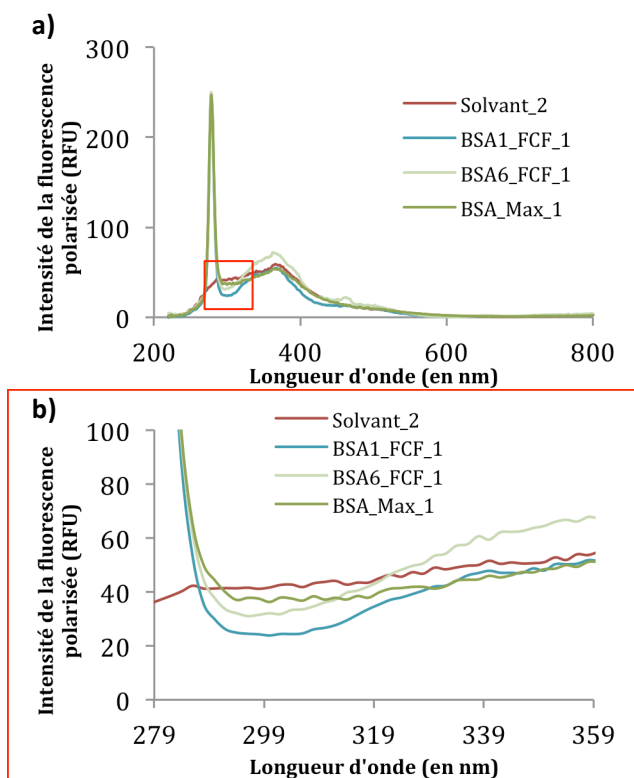


Figure 5. a) Spectre d'émission de fluorescence/ de RLS du FCF avec la BSA et du solvant ; FCF 10 $\mu\text{mol/L}$; BSA ($\mu\text{mol/L}$) du bas vers le haut (BSA1_FCF1) $7.5 \cdot 10^{-4}$, (BSA6_FCF_1) $6,02 \cdot 10^{-2}$, (BSA_Max) $7,5 \cdot 10^{-2}$ (sans FCF) b) Zoom sur la zone de 279 à 359 nm et de 0 à 100 RFU de a)

interviennent à cette échelle sont celles de Mie, qui se produit quand la taille de la particule est beaucoup plus grande que celle de la longueur d'onde du rayon incident ($d \gg \lambda_0$) et celle de Tyndall, qui se produit quand la particule a une taille équivalente à la longueur d'onde du rayon incident ($d \approx \lambda_0$). Par conséquent, la diffusion de Rayleigh correspond à un cas limite de la diffusion de Mie.

Bien que la base de la théorie de la RLS soit la diffusion de Rayleigh, on voit à travers la littérature, que beaucoup d'autres phénomènes sont mis en jeu. Il est, par conséquent, encore difficile de comprendre les phénomènes physiques sous jacent à cette technique et il faudra encore plusieurs études mathématiques approfondies pour en connaître les subtilités.

IV. Expérience : mesure de la RLS d'une solution de BSA et Fast Green FCF

Résultats et Discussions

Les spectres d'absorbances en **Figure 3** se superposent pratiquement tous, ce qui signifie qu'ils sont très homogènes et que l'expérience est tout à fait reproductible. Le seul qui ne soit pas comme les autres (en bleu foncé en bas de la figure), correspond au spectre de la solution BSA_Max, cette solution ne contenant pas de FCF. On voit donc que *la protéine n'absorbe pas dans le visible*, cependant, on devrait avoir un pic d'absorption à 279 nm ce qui n'est pas le cas ici. On suspecte qu'il s'agit certainement de la qualité du miroir, qui normalement n'est pas fait pour ce genre de mesure, et par conséquent les mesures dans les UV ne semblent pas valables. En revanche, nous avons une bonne définition dans le visible, c'est ce qui nous permet de dire que *les solutions préparées ont été bien construites*, sinon nous n'aurions pas cette superposition des spectres.

La **Figure 4** représente le spectre d'absorption du solvant. Faire ce spectre et le voir seul, nous permet de voir dans les spectres des solutions avec la BSA ou avec la BSA et le FCF

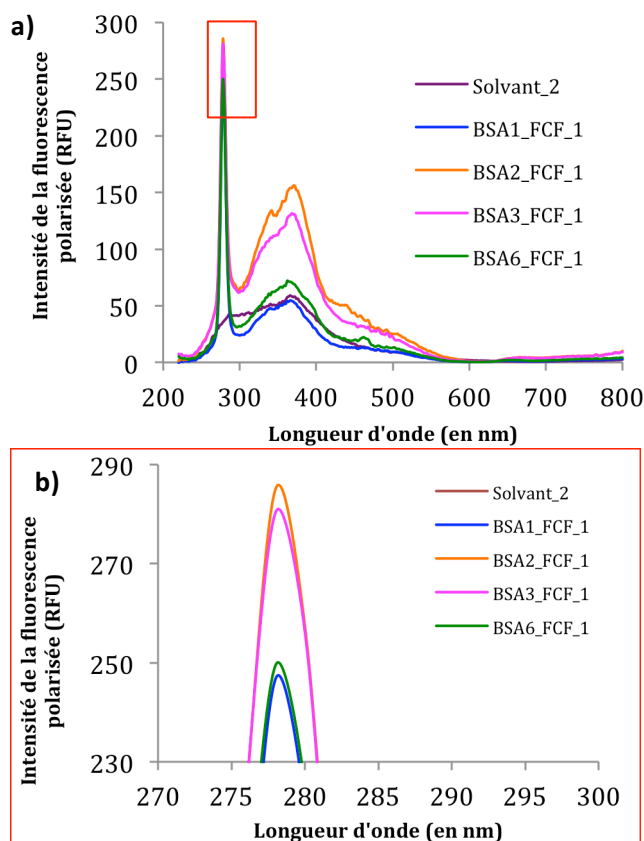


Figure 6. a) Spectre d'émission de fluorescence / de ERLS du FCF avec la BSA et du solvant ; FCF 10 $\mu\text{mol/L}$; BSA ($\mu\text{mol/L}$) du bas vers le haut (BSA1_FCF_1) $7.5 \cdot 10^{-4}$, (BSA6_FCF_1) $6,02 \cdot 10^{-2}$, (BSA3_FCF_1) $1,50 \cdot 10^{-2}$, (BSA2_FCF_1) $7,52 \cdot 10^{-3}$; b) Zoom sur la zone de 270 à 300 nm et de 230 à 290 RFU de a)

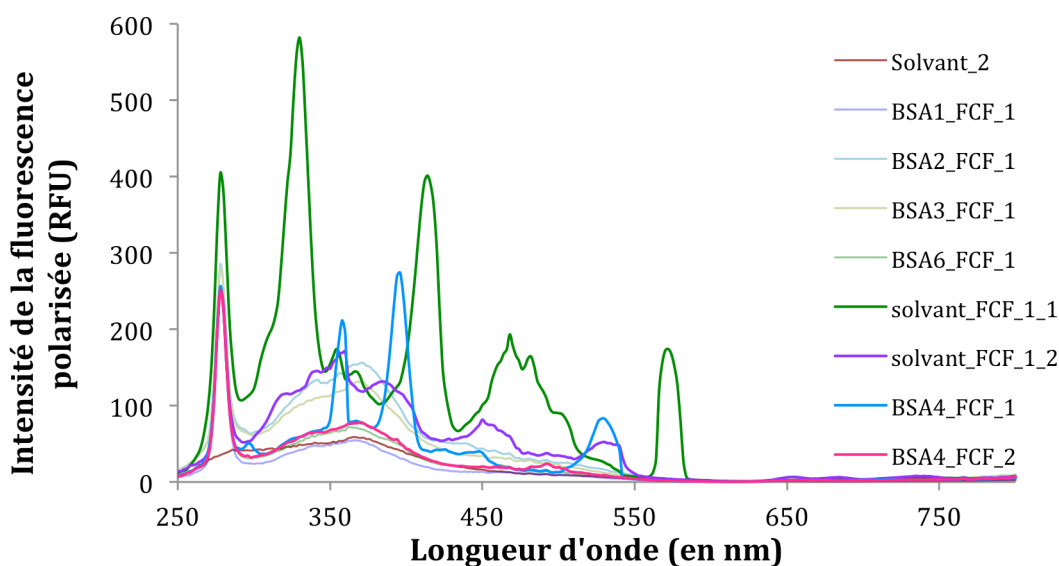


Figure 7. Superposition du spectre d'émission de fluorescence/ de ERLS du FCF avec de la BSA de la Figure 6. avec les spectres de fluorescence des 2 réplicas de la solution BSA4 ($3,01.10^{-2}$) et des réplicas de la solution du FCF seul dans le solvant (Solvant_FCF ou FCF_alone) à $10 \mu\text{mol/L}$. Les spectres d'intérêt sont mis en avant dans cette figure dans un but précis.

quelle partie correspond à la fluorescence du solvant et quelle partie est spécifique des solutions avec la protéine et le fluorochrome. Ces courbes sont représentées dans la **Figure 5** (pour faciliter la lecture nous n'avons représenté qu'une seule des répétitions réalisées pour chaque solution). Ainsi dans cette figure, on peut voir que dans les solutions contenant la BSA, on obtient un important *pic de fluorescence centré sur 279 nm*, qui semble être caractéristique de la présence de la protéine. De plus, on observe une diminution dans le spectre d'émission de la fluorescence du solvant entre 280 nm et 600 nm avec une intensité variable. On dit que plus la concentration de BSA est élevée, plus l'atténuation du signal est grande et plus la fluorescence est petite. On suppose que ce phénomène est dû à l'absorption des photons par les protéines. On parle de *l'effet de filtre interne*, qui se produit quand les particules, qui sont sur la route du rayon lumineux incident, absorbent un peu de rayonnement avant que celui-ci n'atteigne « sa cible ». Pour corriger cet effet, il faudrait calculer la fluorescence corrigée ($F_{\text{corrigée}}$) en utilisant le spectre d'absorption précédent.

La **Figure 6** nous montre qu'à la plus basse concentration de BSA (BSA1_FCF1) on n'observe pas le phénomène d'augmentation de la RLS (ERLS). En revanche, on peut voir un spectre de

ERLS se produire de BSA1 à BSA3 à partir du pic à 279 nm jusqu'à 600 nm. La fluorescence augmente plus entre BSA1 et BSA2 qu'entre BSA2 et BSA3 où l'on observe même une diminution de la fluorescence. On constate donc que *le signal de ERLS diminue pour les concentrations supérieures ou égales à BSA3 ($1,50.10^{-2} \mu\text{mol/L}$)*. Le phénomène de ERLS ne s'observe donc que pour des concentrations assez faibles.

Pour certains réplicas, comme ceux de BSA4 représentés dans le **Figure 7**, on observe des pics supplémentaires à une intensité très importante ce qui nous fait supposer que pour ces réplicas, un *phénomène d'agrégation* a pu se produire. Pour le prouver, il faudrait reproduire l'expérience et ajouter dans ces solutions un détergent comme du SDS ou augmenter la concentration en NaCl.

On peut aussi observer dans cette figure, les pics correspondants à la fluorescence émise par le solvant avec le FCF seul, sans protéine. Pour ce spectre, nous obtenons là aussi une augmentation de l'intensité de fluorescence avec des pics spécifiques. Cependant, on observe une très mauvaise reproductibilité des pics en question. On pense donc qu'il s'agit probablement d'un problème avec la *cuve en quartz, qui a pu être mal nettoyé* avant la mesure, et qu'il resterait donc des protéines sur les parois. Il peut aussi s'agir d'un problème inhérent à *la cuve elle-même* qui

pourrait contenir des impuretés dans son quartz. Par conséquent, il faudrait refaire ces mesures soit en nettoyant bien la cuve après chaque usage soit utiliser une cuve différente pour chaque solution.

V. Conclusion

En conclusion, la théorie de la technique RLS reste mal comprise et son application n'est pas si simple de ce fait. C'est une technique très sensible à la concentration des solutions utilisées, pour lesquelles il ne faut pas aller au delà d'une certaine limite, sous peine de voir le signal s'effondrer drastiquement. Cependant cette sensibilité peut s'utiliser à notre avantage pour détecter des quantités infimes de molécules mais pour cela il faudrait mieux connaître la théorie « pure » de la RLS.

Les résultats des mesures avec le spectrofluorimètre sans polariseur feront l'objet d'une présentation ultérieure.

VI. Remerciements

Je remercie M. Luc Bidel d'avoir accepté de me faire partager son savoir et de m'avoir fait découvrir un nouveau point de vue sur la biologie. Merci de m'avoir permis de diversifier mes expériences.

Merci aussi à M. Clarence Charnay de nous avoir aidé pendant les expérimentations. Votre aide nous a été précieuse.

VII. Bibliographie et Webographie

- (1) Z.Marczenko *et al.* (2000). *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis ; Vol. 10, Chap. 2 Principles of Spectrophotometry*).
- (2) V.R.Meyer. (2013). CHROMATOGRAPHY | Principles . (M. S. Reference Module in Chemistry, Éd.) St. Gallen, Switzerland.
- (3) D.Gully (2015) Cours de 2^{ème} année de Licence de biologie, unité d'enseignement HLB1305 Opérations Technologiques, Chromatographie, Université de Montpellier.
- (4) RF Pasternack *et al.* (1995). *Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation*, Science , 269, n° 5226, 935-939.
- (5) I.E.Borissevitch *et al.* (1997). *Resonance Light Scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin*. Analytica Chimica Acta, 343, 281-286
- (6)<http://www.rcsb.org/pdb/explore/materialsAndMethods.do?structureId=4F5S>
- (7)<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?showseq=1&mmbid=103555&buidx=1>
- (8) B.X.Huang *et al.* (2004). *Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 15, 1237-1247
- (9) <http://e-cours.univ-paris1.fr/modules/ued/envcal/html/rayonnement/3-rayonnement-atmosphere/3-3-diffusion-rayleigh.html>
- (10) C.Z.Huang. (2003). *Resonance light scattering technique used for biochemical and pharmaceutical analysis*. Analytica Chimica Acta, vol 500, pages 105-117
- (11) R.F.Pasternack *et al.* (1993). *Porphyrin Assemblies on DNA as Studied by a Resonance Light-Scattering Technique*. J. Am. Chem. Soc., 115, 5393-5399
- (12) Y.F.Li *et al.* (2002) *A Resonance Light-Scattering Determination of Proteins with Fast Green FCF*. Jap. Soc. An. Chem., 18, 177-181

