

MODIFICATIONS DES PARTICULES
DE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC EN SOLUTION.
ÉTUDE PAR LA BIRÉFRINGENCE D'ÉCOULEMENT

I. ACTION DE DIVERS AGENTS PHYSIQUES

par

MAURICE JOLY

Service de Chimie-Physique, Institut Pasteur, Paris (France)

INTRODUCTION

Lorsqu'on étudie les propriétés physico-chimiques de solutions de virus de la mosaïque du tabac préparées depuis un temps assez long et ayant subi des traitements différents, on constate une extrême variabilité des particules de virus. J'ai montré^{1, 2} que la détermination des angles d'extinction permet une étude très précise de ces variations. Nous nous proposons de préciser les renseignements que nous pouvons obtenir par cette technique et de l'appliquer à l'étude des transformations dont sont le siège les solutions de virus dans un état d'agrégation élevé lorsqu'on les soumet à divers agents physiques.

Les solutions mères que nous avons utilisées présentaient toutes un assez haut degré d'agrégation au moment de leur emploi. Leurs caractéristiques sont données dans le Tableau I.

TABLEAU I
CARACTÉRISTIQUES DES SOLUTIONS MÈRES UTILISÉES

Solution	Concentration	Origine	Particularités
I	2.7%	BAWDEN	Solution de 3 ans préparée par précipitation, conservée à température ordinaire
II	4%	BAWDEN	Idem
III	0.2%	SEGRÉTAIN	Solution fraîchement préparée par précipitation
IV	2%	BAWDEN	Solution de 6 mois préparée par centrifugation et précipitation, conservée à température ordinaire
V	0.4%	SEGRÉTAIN	Solution fraîchement préparée en présence de trypsine

TECHNIQUE

L'appareil utilisé pour la mesure des angles d'extinction est du type à cylindre intérieur tournant et a été décrit précédemment^{3, 4}. La précision des déterminations de l'angle d'extinction est de l'ordre de $\pm 0^{\circ}.25$. Pour évaluer les valeurs de la constante de diffusion de rotation à partir des valeurs de l'angle d'extinction en fonction du gradient de vitesse nous avons utilisé les résultats des calculs de SCHERGA, EDSALL ET ORTEN GADD⁵. Dans le cas du virus de la mosaïque du tabac nous avons

affaire à des bâtonnets très allongés. Or, pour les valeurs p du rapport des axes d'un ellipsoïde allongé supérieures à 10, les valeurs χ de l'angle d'extinction, correspondant à une même valeur du rapport $\alpha = g/D$ (g gradient de vitesse, D constante de diffusion de rotation), varient très peu avec p . On peut donc prendre pour évaluer α à partir des valeurs expérimentales de χ une courbe $\chi(\alpha)$ correspondant à la moyenne des courbes $\chi(\alpha, p)$ pour les valeurs de p comprises entre 10 et ∞ . L'erreur que l'on fait ainsi est presque toujours inférieure aux erreurs expérimentales (pour $\alpha = 60$ la variation de χ lorsque p passe de 10 à 50 ne dépasse pas $0^{\circ}.5$ et pour $\alpha = 10$ elle n'est que $0^{\circ}.15$). Des valeurs de D on peut déduire une valeur approchée de la longueur l des particules à l'aide de la relation de KUHN⁶ $D = 8kT/\pi\eta l^3$ (k constante de Boltzmann, T température absolue, η viscosité du solvant), ou mieux, à l'aide de celle de BURGERS⁷ relative à des particules cylindriques $D = 3kT (\ln l/d - 0.11)/\pi\eta l^3$ (d diamètre des cylindres).

La détermination précédente de la longueur l des particules suppose que le système est monodispersé et qu'il est suffisamment dilué pour qu'il n'y ait aucune interaction entre les particules, conditions qui, comme nous l'avons montré⁸, ne sont pratiquement jamais réalisées. C'est pourquoi, pour chaque solution, les valeurs apparentes de l calculées par la méthode précédente sont fonction du gradient de vitesse et de la concentration. Il est possible de tenir compte des perturbations dues à la concentration et à la polydispersion, et on peut atteindre avec une assez bonne précision la valeur vraie de la taille moyenne des particules.

POLYDISPERSION DES SOLUTIONS ET TAILLE MOYENNE DES PARTICULES

SADRON a établi⁹ que pour un système polydispersé très dilué contenant des particules de type 1, 2, ..., i, ... avec les concentrations respectives $c_1, c_2, \dots, c_i, \dots$ l'angle d'extinction est donné

par la relation $\operatorname{tg} 2\chi = \frac{\sum_i c_i \sin 2\chi_i}{\sum_i c_i \cos 2\chi_i}$, χ_i et ∂_i étant l'angle d'extinction et la biréfringence correspondant

aux particules de type i du système si elles étaient seules. Il en résulte que la forme des courbes $\chi(g)$ est fonction de la dispersité de la solution¹⁰. DONNET a pu vérifier expérimentalement¹¹ la relation de SADRON pour g tendant vers zéro. Nous pouvons donc admettre que la relation de polydispersion est valable pour des systèmes dilués de bâtonnets rigides, et comme aucune hypothèse sur g n'est faite pour son établissement (dans le domaine de validité des relations de l'hydrodynamique), nous admettrons qu'elle s'applique en tout point des courbes $\chi(g)$.

L'examen des courbes $\chi(g)$ peut nous donner non seulement la "taille moyenne" des particules, mais des indications sur la distribution des longueurs des particules. Posons $a_i = \frac{g_i}{D_i}$, $p_i = \frac{a_i}{b_i}$, où D_i est la constante de diffusion de rotation des particules de type i , a_i et b_i les longueurs de leurs axes.

On a, d'après PETERLIN ET STUART¹², $\chi_i = F(a_i, p_i)$ et $\partial_i = c_i \frac{2\pi(G_1 - G_2)_i}{n} f(a_i, p_i)$; n est l'indice du solvant et G_1 et G_2 des fonctions compliquées caractéristiques de l'anisotropie propre de chaque particule. F et f ont été calculés tout récemment à l'aide du "Mark I computer"¹³. Nous avons vu que pour les valeurs élevées du rapport des axes on peut remplacer les F et f par leurs valeurs moyennes $F(a_i, p_i) = H(a_i)$ et $f(a_i, p_i) = h(a_i)$. D'autre part, sur l'expression générale de $G_1 - G_2$ ¹² on voit qu'en lorsque p_i est grand $\frac{2\pi(G_1 - G_2)_i}{n}$ se réduit en première approximation à $\frac{(n_1^2 - n_2^2)_i}{2n}$; à moins de 10%

près on peut écrire $\partial_i = c_i \frac{(n_1^2 - n_2^2)_i}{2n} h(a_i)$. Pour toutes les particules de virus $n_1^2 - n_2^2$ est le même;

par suite $\partial_i = \frac{n_1^2 - n_2^2}{2n} c_i h(a_i)$. L'angle d'extinction de la solution polydispersée est alors donné par

$$\operatorname{tg} 2\chi = \frac{\sum_i c_i h(a_i) \sin 2 H(a_i)}{\sum_i c_i h(a_i) \cos 2 H(a_i)}.$$

Pour chaque valeur de g on connaît les a_i si les D_i sont connus; on peut donc calculer tous les termes des deux séries à partir des courbes H et h et de la composition de la solution, et avoir ainsi les valeurs de $\operatorname{tg} 2\chi$ d'où l'on déduira α et par suite D apparent pour chaque valeur de g . Il en résulte qu'en utilisant la relation de Kuhn nous pourrons, pour chaque distribution des longueurs des particules constituantes, construire la courbe $l(g)$ des longueurs moyennes apparentes des particules

du système en fonction du gradient de vitesse, c'est-à-dire, pour chaque valeur du gradient de vitesse, la longueur des particules d'un système monodispersé qui donnerait la même valeur de χ . Nous avons fait ce calcul pour un grand nombre de distributions de tailles, soit arbitraires, soit empruntées à la littérature^{13, 14}.

Pour un système polydispersé réel, nous appelons longueur moyenne des particules la longueur l_f des particules de fréquence maxima dans le système. La construction d'un grand nombre de courbes de taille apparente $l(g)$ nous a permis d'établir des relations empiriques permettant de déduire l_f des valeurs de la longueur moyenne apparente pour différentes valeurs du gradient de vitesse. Parmi les relations empiriques obtenues signalons (les l étant exprimés en A) $l_f \# \frac{l_{400} + l_{1200}}{2} - 1.3 \cdot 10^4 \frac{l_{400} - l_{1200}}{l_{400} + l_{1200}}$ qui permet d'atteindre l_f avec une assez bonne précision à partir des valeurs de la longueur apparente pour les deux gradients de vitesse 400 et 1,200 sec⁻¹.

Evaluation de la polydispersion

La connaissance de la taille des particules de fréquence maxima ne suffit pas pour caractériser un système; il faut connaître en outre son degré de polydispersion.

Considérons les courbes de répartition de tailles de nos systèmes de particules $\pi(l)$, π étant le pourcentage de particules de longueur l dans la solution étudiée. Envisageons d'abord le cas où les courbes $\pi(l)$ ne présentent qu'un seul pic. Plus la courbe $\pi(l)$ sera écrasée sur l'axe des l , plus la solution sera polydispersée. Si par des changements d'échelle sur l'axe des π nous construisons toutes nos courbes de façon que les maxima de π soient tous sur une même parallèle à l'axe des l , les courbes représentatives seront d'autant plus étalées que la polydispersion de la solution sera plus grande. D'une façon plus précise, plus la solution sera polydispersée, plus l'aire comprise entre la courbe de répartition et l'axe des l sera grande et on peut évaluer la polydispersion par la valeur Σ de cette aire (le maximum de $\pi(l)$ étant pris égal à l'unité). Dans le cas où les courbes $\pi(l)$ présentent plusieurs pics, opérons comme précédemment, c'est-à-dire faisons égal à 1 le maximum absolu de la courbe $\pi(l)$ (pic le plus élevé). Un accroissement de la polydispersité de la solution pourra se manifester de différentes façons: ou bien les pics s'élargiront, la courbe π s'étalera et l'aire Σ augmentera; ou bien les pics vont devenir plus nombreux sans qu'il y ait variation notable de Σ (à la limite on pourrait distinguer une polydispersion de "bande" et une polydispersion de "raies"). Pour tenir compte de ce dernier cas, nous sommes conduits à prendre pour évaluer le degré de polydispersion d'une suspension de grosses particules le produit de l'aire Σ (définie comme précédemment) par le nombre N des pics, $P = N \Sigma$. Un tel choix est légitimé par le fait suivant:

Dans le cas de bâtonnets, donnons nous a priori plusieurs courbes de répartition, les unes comprenant un seul pic et les autres plusieurs pics, toutes de formes différentes mais telles que l_f ait la même valeur et que $N \Sigma$ soit le même pour toutes les répartitions considérées. Construisons,

$\sum_i c_i h(a_i) \sin 2 H(a_i)$

à partir de l'équation $\operatorname{tg} 2\chi = \frac{\sum_i c_i h(d_i) \cos 2 H(a_i)}{\sum_i c_i h(d_i)}$, les courbes $l(g)$ des longueurs moyennes apparentes

pour toutes ces répartitions. On constate que toutes ces courbes sont extrêmement voisines les unes des autres et que les écarts entre elles sont de l'ordre des erreurs de mesure en biréfringence d'écoulement. Par conséquent, on peut dire que du point de vue de la biréfringence d'écoulement, dans les conditions de validité de l'équation précédente, la polydispersion des systèmes n'intervient que par le produit $N \Sigma$ et par suite peut être définie par cette expression.

De la même façon que pour la détermination de la taille de fréquence maxima, nous avons obtenu des relations empiriques qui donnent une assez bonne évaluation de la polydispersion des systèmes; dans le présent travail nous avons utilisé $P \# 10^{-3} (l_{400}^2 - l_{1200}^2)$ (les l étant exprimés en A). La validité des relations empiriques donnant l_f et P a en outre été vérifiée par comparaison avec la détermination des tailles par microscopie électronique³⁶.

Détermination expérimentale de la taille des particules et de la polydispersion

Sauf indication contraire, dans tout l'exposé qui va suivre, lorsque nous donnerons des tailles de particules, il s'agira des valeurs de l_f . D'autre part, lorsqu'aucune précision contraire ne sera

donnée, les longueurs de particules indiquées seront les longueurs à 20°. Nous avons vérifié que l'élévation de température favorisait l'agrégation des particules (voir plus loin) et qu'il en résultait un léger accroissement de la taille moyenne, de l'ordre de 0.5% par degré. On a sensiblement $l_{(20^\circ)} = \frac{l(t^\circ)}{1 + \frac{t - 20}{200}}$ entre 10° et 40°, et très grossièrement pour la polydispersion $P_{(20^\circ)} = \frac{P(t^\circ)}{1 + \frac{t - 20}{100}}$. Donnons

un exemple de détermination de l_f et de P : solution mère n° III, concentration 0.008%, pH 5; mesures immédiatement après préparation de la solution diluée; température 26° 5. A partir des valeurs de χ on trouve pour les tailles apparentes $l_{400} = 6,880$ Å et $l_{1200} = 5,840$ Å; par application des relations établies plus haut, il vient $l_{f(26^\circ 5)} = 6,300$ Å et $l_{f(20^\circ)} = 6,100$ Å, $P_{(26^\circ 5)} = 13,200$ et $P_{(20^\circ)} = 12,800$.

EFFET DE CONCENTRATION ET INTERACTION ENTRE LES PARTICULES

J'ai indiqué antérieurement² que la dilution semblait conduire à des particules en moyenne plus courtes. Ceci est en accord avec les mesures de diffusion de la lumière¹³ qui montrent qu'en absence d'électrolyte il y a dès les plus faibles concentrations une

diminution rapide de dissymétrie, ce qui indique qu'il y a interférence entre les particules (pour nos solutions mères I, II et IV on a certainement une concentration saline inférieure à $M/200$ puisqu'il y a séparation en 2 phases^{15,16}. En effet, si les particules étaient indépendantes, il correspondrait à l'accroissement de symétrie une diminution de la longueur des bâtonnets¹⁷ lorsque la concentration augmenterait, ce qui serait assez peu vraisemblable. C'est cette interférence entre les particules qui, dans nos mesures de biréfringence d'écoulement, favorise la corrélation de leur orientation et conduit à des longueurs apparentes des bâtonnets croissant avec la concentration. La Fig. 1 donne deux exemples relatifs à une solution fraîche à pH 4.5 préparée à partir de II et à une solution vieille de 24 h à pH 4.5 préparée à partir de I et ayant subi un

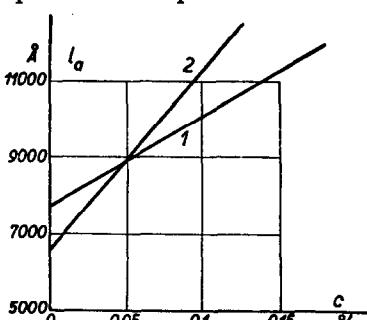


Fig. 1. Variation de la longueur moyenne apparente des particules en fonction de la concentration
1. Solution II, pH 4.5
2. Solution I, pH 4.5, après léger traitement mécanique

traitement thermique et mécanique ménagé (voir plus loin). En extrapolant à $c = 0$ on obtient la longueur moyenne vraie des particules; dans le cas des exemples précédents, 7,800 Å pour la première solution et 6,700 Å pour la seconde.

Toutes les tailles de particules (en absence d'électrolyte) que nous donnerons par la suite seront les longueurs extrapolées à concentration nulle si nous disposons d'un nombre suffisant de points expérimentaux ou, à défaut, la valeur approchée donnée par

la relation empirique $l_{(c=0)} = \frac{l(c)}{1 + 3.1 c}$ (c étant exprimé en %) qui, pour les concentrations inférieures à 0.2% se vérifie à mieux de 10% près. Signalons qu'il y correspond, très grossièrement, pour la polydispersion $P_{(c=0)} = \frac{P(c)}{1 + 6.2 c}$.

Comme il fallait s'y attendre, en présence d'électrolyte, l'effet de concentration disparait. Lorsque les solutions ne sont pas fraîchement préparées, il peut même sembler parfois légèrement inversé par suite de la marge d'indétermination de l'effet de vieillissement (voir plus loin). C'est ainsi qu'une solution préparée à partir de IV dans KCl $M/75$ à pH 5 donne au bout de 24 h comme longueur moyenne apparente des particules $l = 8,850$ Å pour $c = 0.008\%$ et $l = 8,400$ Å pour $c = 0.024\%$.

La rapide variation, en absence d'électrolyte, de la longueur moyenne apparente des particules en fonction de la concentration, même lorsque celle-ci est très petite, montre que les covolumes "réels" des particules sont beaucoup plus grands que les covolumes "géométriques" du fait de la forte répulsion entre les particules chargées lorsque l'épaisseur de la couche double diffuse est grande. Rappelons que d'après la théorie de DEBYE-HÜCKEL l'épaisseur de cette atmosphère ionique est sensiblement égale à $\kappa = \frac{3}{\sqrt{s}}$ Å, s étant la concentration molaire du sel (dans le cas d'un électrolyte mono-monovalent) et qu'il a été établi^{18,19,20} que la force de répulsion entre deux bâtonnets distants de R est de la forme $F = Ae^{-\frac{2R}{\kappa}}$, A étant une fonction des charges difficile à expliciter exactement. Divers auteurs^{21,22,23,24,25,26} ont donné pour le covolume géométrique de bâtonnets l'expression $b = \frac{\pi d^2 l^2}{4}$. Ceci, dans le cas du virus de la mosaïque du tabac, en admettant un diamètre de $d = 150$ Å, donne $b = 116 \cdot l^2 A^3$ (l exprimé en Å) tandis que le volume d'une particule de longueur l est $v = 1.77 \cdot 10^4 l A^3$. Le volume spécifique du virus de la mosaïque du tabac étant 0.743^{27} le volume disponible par particule au sein de la solution est $V = 1.345 v/c$, soit $V = 2.38 \cdot 10^4 l/c A^3$ (c étant le poids en gramme de virus par ml de solution) et par suite $V/b = 2.05 \cdot 10^8 / cl$. D'autre part, le volume de la sphère circonscrite à chaque bâtonnet est $B = 0.524 l^3$, d'où $V/B = 4.55 \cdot 10^4 / l^2$.

Par exemple, pour la solution fraîchement préparée à partir de II à pH 4.5 et pour laquelle $l = 7,800$ Å, on a $v = 1.38 \cdot 10^8 A^3$, $b = 7.05 \cdot 10^9 A^3$ et $B = 2.48 \cdot 10^{11} A^3$. Pour $c = 0.025\%$, $V = 7.45 \cdot 10^{11} A^3$, d'où $V/b = 105$ et $V/B = 3$. Or, pour cette concentration, la longueur moyenne apparente est $8,450$ Å au lieu de $7,800$ Å. Il y a donc corrélation d'orientation même pour un volume disponible par particule triple de celui de la sphère balayée par la particule en mouvement libre autour de son centre de gravité, et plus de 100 fois supérieur au covolume géométrique. On a donc une interaction non négligeable entre des particules de 7,800 Å de long distances en moyenne de près de 10,000 Å.

On peut essayer de préciser la relation entre l'interaction entre les particules et la longueur moyenne apparente en se limitant, pour simplifier, au cas du problème plan, c'est-à-dire au cas où toutes les particules ont leur grand axe dans le plan d'écoulement. Pour avoir une première approximation, suivons un raisonnement parallèle à celui de BOEDER²⁸.

La méthode de BOEDER consiste à évaluer la variation au cours du temps du nombre de particules orientées entre les directions φ et $\varphi + d\varphi$. Si ρ est la densité de direction (N étant le nombre total de particules, le nombre de particules orientées entre φ et $\varphi + d\varphi$ est égal à $N\rho(\varphi)d\varphi$), la variation considérée est $\frac{\partial \rho}{\partial t}$ au facteur N près. Elle se décompose pour BOEDER en deux termes, l'un du à l'écoulement, l'autre au mouvement brownien. Le premier est $(\frac{\partial \rho}{\partial t})_e = -\frac{\partial(\rho \omega_e)}{\partial \varphi}$, $\omega_e(\varphi)$ étant la vitesse angulaire imposée aux particules de direction φ du fait de l'écoulement, le second est $(\frac{\partial \rho}{\partial t})_b = D \frac{\partial^2 \rho}{\partial \varphi^2}$, D étant la constante de diffusion de rotation des particules. En régime permanent on a $\frac{\partial \rho}{\partial t} = 0$, d'où $D \frac{\partial^2 \rho}{\partial \varphi^2} - \frac{\partial(\rho \omega_e)}{\partial \varphi} = 0$. Nous allons ajouter un troisième terme du aux interactions entre les particules. Par suite de leur charge, les particules voisines se repoussent et tendent à se disposer parallèlement les unes aux autres; il en résulte que les particules de direction φ prendront, du fait de l'interaction avec leurs voisines, une vitesse angulaire ω_i . Le terme supplémentaire que nous ajouterons à l'équation de BOEDER sera donc $(\frac{\partial \rho}{\partial t})_i = -\frac{\partial(\rho \omega_i)}{\partial \varphi}$ et la fonction de répartition de la densité de direction est intégrale de l'équation $D \frac{\partial^2 \rho}{\partial \varphi^2} - \frac{\partial(\rho \omega_e)}{\partial \varphi} - \frac{\partial(\rho \omega_i)}{\partial \varphi} = 0$. J'ai pu donner un calcul approché^{36,38} de ω_i et montrer que l'équation précédente pouvait se réduire à $D[1-2.25 F(\psi)] \frac{\partial^2 \rho}{\partial \varphi^2} - \frac{\partial(\rho \omega_e)}{\partial \varphi} = 0$. Le calcul numérique de la fonction F a été effectué une fois pour toutes; ψ est le quotient par kT de la barrière de potentiel U qu'une particule doit franchir pour tourner de 180° autour d'un axe passant par son centre de gravité et perpendiculaire au plan d'écoulement.

On constate que cette équation ne diffère de celle relative au cas où il n'y a pas interaction entre les particules que par la substitution à la constante de diffusion de rotation D d'une particule d'une constante de diffusion de rotation apparente $D' = D[1 - 2.25 F(\psi)]$. Il en résulte qu'en première approximation on peut admettre que les équations de la birefringence d'écoulement seront conservées dans le cas où il y a interaction entre les particules si on remplace D par D' .

Si pour relier la constante de diffusion de rotation à la longueur des bâtonnets on s'en tient à l'approximation de KUHN⁶ on a $D = 8kT/\pi\eta l^3$ et $D' = 8kT/\pi\eta l'^3$, d'où entre les longueurs réelles et apparentes des particules la relation $l'^3 = l^3[1 - 2.25 F(\psi)]$.

L'expérience nous donne $l'(c)$ directement et l par extrapolation à concentration nulle. On en déduit $F(\psi)$ d'où ψ que l'on a ainsi en fonction de la concentration. On constate, comme on pouvait s'y attendre d'ailleurs, que $\psi(c)$ croît très vite avec la concentration en absence d'électrolyte. Ainsi, pour la solution préparée à partir de II à pH 4.5 on a vu que $l = 7,800 \text{ \AA}$ et que les longueurs moyennes apparentes étaient 8,000 \AA pour $c = 0.008\%$, 9,000 \AA pour $c = 0.05\%$ et 11,500 \AA pour $c = 0.15\%$; il y correspond pour ψ les valeurs 0.01, 0.215 et 1.06, et pour U les valeurs $4 \cdot 10^{-16}$, $8.6 \cdot 10^{-15}$ et $4.24 \cdot 10^{-14}$ erg.

VIEILLISSEMENT DES SOLUTIONS

On sait que pour les solutions relativement concentrées de virus de la mosaïque du tabac, même lorsque la préparation a été menée de façon à obtenir des particules de taille à peu près uniforme^{13,16}, l'état d'agrégation varie (en général augmente) au cours du temps, surtout à température ordinaire (ou encore mieux vers 37°) et au voisinage du pH isoélectrique (pH 3.92)²⁹ pour atteindre au bout de plusieurs jours une répartition de tailles des particules qui demeure désormais à peu près stationnaire. Comme nous l'avons dit au début de cet exposé nous n'étudions dans le présent travail que des solutions anciennes qui ont atteint leur répartition d'équilibre. Nous nous sommes proposé de voir si la taille moyenne des particules dépendait de la concentration, et en particulier, si en diluant de vieilles solutions concentrées, la taille de leurs particules changeait.

Le comportement observé est très complexe. D'une façon générale pour les faibles concentrations, la taille des particules décroît légèrement durant les premiers jours de la dilution. Le Tableau II en donne quelques exemples. Mais si on conserve très longtemps des solutions diluées, il arrive qu'on observe une nouvelle agrégation des particules au bout d'un temps suffisamment long. C'est ainsi que III dilué à 0.008% à pH 4.75 (voir Tableau II) donne $l_f = 4.950 \text{ \AA}$ au bout de 17 jours. Assez souvent un léger accroissement de l'état d'agrégation précède la dissociation des agrégats par dilution :

TABLEAU II
EFFET DE VIEILLISSEMENT DES SOLUTIONS DE VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC

Souche	c initiale	c après dilution	pH	l_i immédiatement après dilution	Au bout de	l_f
II	4%	0.025%	4.5	7,900 \AA	24 heures	7,750 \AA
III	0.2%	0.008%	4.75	4,800 \AA	4 jours	4,300 \AA
IV	2%	0.008%	4.75	17,550 \AA	18 heures	16,100 \AA
V	0.4%	0.008%	4.85	22,300 \AA	4 jours	16,900 \AA
V	0.4%	0.008%	2	—	1 jour	18,000 \AA
V	0.4%	0.008%	2	—	4 jours	17,150 \AA

c'est ainsi que pour IV dilué à 0.008% à p_H 5 on observe $l_f = 11,250$ Å immédiatement après dilution, $l_f = 14,800$ Å au bout de 48 h et $l_f = 11,200$ Å au bout de 91 h. Dans certains cas on n'observe pas de diminution de l'état d'agrégation après l'accroissement initial; c'est ainsi que V dilué à 0.008% à p_H 7 donne $l_f = 8,400$ Å au bout de 24 h et $l_f = 11,350$ Å au bout de 4 jours.

On voit que les solutions diluées (préparées à partir de solutions concentrées anciennes fortement agrégées) présentent une lente évolution à température ordinaire au cours du temps sans qu'il soit possible jusqu'à maintenant de la systématiser avec certitude. En particulier, dans de nombreux cas, il semble que la polydispersion du système s'accroisse lorsque la taille moyenne des particules diminue au cours de cette évolution, mais on observe parfois le contraire (pour IV dilué à 0.008% à p_H 4.75 par exemple). Ce comportement mal défini est probablement la conséquence de la superposition de deux processus antagonistes dont on n'a pas encore pu préciser les paramètres.

DÉMIXTION DES SOLUTIONS CONCENTRÉES

Depuis que BAWDEN ET PIRIE ont observé³⁰ que des solutions aqueuses de virus suffisamment concentrées et en absence d'électrolyte se séparent en deux phases liquides cette démixtion a fait l'objet de nombreuses études tant expérimentales que théoriques^{16, 21, 22, 30, 31}. Tant les mesures de biréfringence d'écoulement² que celles de diffusion de la lumière¹⁵ ont montré que pour les solutions de virus dans des états de forte agrégation, lorsque le phénomène de démixtion avait lieu, la couche inférieure contenait des particules en moyenne plus longues que celles de la couche supérieure. Pour la solution II à p_H 4.5 j'ai trouvé comme taille moyenne des particules 6,050 Å pour la couche supérieure et 8,650 Å pour la couche inférieure, les polydispersions correspondantes étant sensiblement dans le rapport de 1 à 2. Signalons que la même solution donnait, immédiatement après agitation pour supprimer la séparation de phase, une longueur moyenne de particules de 7,850 Å et une polydispersion d'environ 19,000.

EFFET DU TRAITEMENT MÉCANIQUE

J'ai signalé antérieurement^{1,2} que les grandes particules de virus de la mosaïque du tabac étaient facilement brisées. En effet, si on détermine la longueur moyenne des particules d'une solution (mesures effectuées à de faibles gradients de vitesse), puis qu'on soumette cette solution à un gradient de vitesse élevé, et qu'enfin on mesure à nouveau la taille moyenne (à de faibles gradients), on trouve le plus souvent une valeur nettement plus petite. C'est ainsi que pour une solution à p_H 5 préparée à partir de I on trouve 6,750 Å comme longueur moyenne des particules (mesurée entre 400 et 4,000 sec⁻¹); si on soumet cette solution à un gradient de vitesse de l'ordre de 50,000 sec⁻¹, on trouve au bout de $1/2$ h $l_f = 6,600$ Å, au bout de 1 h $l_f = 4,900$ Å, au bout de 2 heures $l_f = 4,600$ Å, la polydispersion variant dans le même temps de 10,800 à 7,300, ce qui indique bien que ce sont les particules les plus longues qui sont brisées. Signalons qu'après un tel traitement, si la solution est maintenue au repos pendant un temps suffisamment long (une journée en moyenne), elle évolue de façon que la répartition des tailles des particules revienne très proche de ce qu'elle était avant le laminage.

Dans certains cas, principalement pour des particules très longues, la rupture a lieu dès les faibles gradients ainsi qu'on le voit sur l'exemple du Tableau III relatif à une solution de 0.008% à p_H 4.85 fraîchement préparée à partir de V et étudiée à 19°. Les

longueurs moyennes apparentes des particules l_a déterminées dans tous les cas pour un gradient de vitesse de 132 sec^{-1} sont d'autant plus petites que la solution a été soumise antérieurement pendant un temps t plus long à un gradient de vitesse g plus élevé.

TABLEAU III
EFFET DU TRAITEMENT MÉCANIQUE

g	t	χ	a	D	l_a
					pour $g = 132 \text{ sec}^{-1}$
132	3 minutes	3°	218	0.61	25,600 Å
1,890	3 minutes	3°	218	0.61	25,600 Å
2,480	3 minutes	4°25	192	0.69	24,600 Å
3,140	3 minutes	7°	77	1.71	18,000 Å
7,150	3 minutes	7°25	72.8	1.81	17,600 Å
9,900	3 minutes	11°5	29.8	4.44	13,100 Å
9,900	15 minutes	14°25	19.05	6.94	11,200 Å
9,900	30 minutes	15°	17.1	7.73	10,800 Å

Solution de 0.008% à pH 4.85 préparée à partir de IV et étudiée à 19°

On peut avoir une idée de la force nécessaire pour rompre une particule en utilisant la relation approchée de KUHN^{6,32} qui donne la valeur maxima de la force à laquelle est soumise une particule très allongée du fait de l'écoulement $F_{\max} = \frac{3}{32} \pi \eta g l^3$, soit, dans le cas de nos solutions très diluées, $F \approx 3 \cdot 10^{-8} g l^2$. Pour tous les systèmes que nous avons étudiés F est compris entre 10^{-7} et $7 \cdot 10^{-7}$ dyne.

De nombreux clichés de virus de la mosaïque du tabac pris au microscope électronique montrent la structure granuleuse des bâtonnets qui semblent constitués par l'agrégation bout à bout de particules élémentaires presque sphériques. Une telle structure permet d'ailleurs de comprendre que l'on trouve dans les solutions polydispersées des répartitions de tailles presque continues lorsqu'on fait la statistique des longueurs des bâtonnets sur les clichés obtenus au microscope électronique. La facilité de rupture de ces chapelets de particules élémentaires indique qu'elles ne sont pas soudées entre elles par des liaisons chimiques. Si on admet que les interactions entre ces particules élémentaires sont du type forces de London et forces dipolaires, on trouve que l'énergie d'interaction entre deux granules est grossièrement de l'ordre de $FR_0/5$, R_0 étant la distance des centres de gravité de deux granules voisins. En les supposant sensiblement sphériques, $R_0 \approx 150 \text{ Å}$ et on a comme énergie de liaison entre deux granules d'un bâtonnet $W = 3 \cdot 10^{-7} F$, ce qui correspond, dans tous les cas que nous avons étudiés, à des énergies comprises entre $3 \cdot 10^{-14}$ et $9 \cdot 10^{-14}$ erg, donc assez voisines de kT .

Il est vraisemblable que l'effet du mouillage sur la répartition des tailles des particules du virus de la mosaïque du tabac³³ (enrichissement de la solution en particules de taille moyenne aux dépend des grandes particules) peut s'interpréter comme provoquée par l'action mécanique à laquelle il faut soumettre la solution pour la faire mousser.

EFFET DU TRAITEMENT THERMIQUE

Nous avons signalé plus haut qu'au voisinage de la température ordinaire l'élévation
Bibliographie p. 144.

de température favorisait légèrement l'évolution vers les particules de grande taille. Le Tableau IV donne à titre d'exemple la longueur moyenne apparente l_a des particules pour un gradient de vitesse de 27 sec^{-1} dans le cas d'une solution de 0.01% à pH 4.5 préparée à partir de I depuis 24 heures.

TABLEAU IV
EFFET DE LA TEMPÉRATURE
Solution de 0.01% à pH 4.5 préparée depuis 24 heures à partir de I

T	χ	a	D	l_a (pour $g = 27 \text{ sec}^{-1}$)
12°	22°5	7.35	3.7	13,000 Å
20°	22°	7.725	3.5	14,200 Å
38°	23°25	6.9	3.9	16,000 Å

J'ai signalé antérieurement^{1,2} qu'une congélation prolongée entraînait pour les solutions assez fortement agrégées une évolution des particules vers les faibles longueurs. C'est ainsi qu'une solution préparée à partir de II à pH 4.5 donnait à 20° une longueur moyenne des particules de 7,900 Å avec une polydispersion de l'ordre de 5,000 tandis qu'après avoir été maintenue 4 jours aux environs de 0° C, elle donnait $l_f = 5,550$ Å mais que P était passé à 7,000 environ. De même, une solution préparée à partir de III à pH 5 et pour laquelle à 20° $l_f = 5,450$ Å et $P = 5,800$ donnait, après un séjour 48 heures à 5°, $l_f = 4,950$ Å et $P = 9,000$. Dans ce cas également il suffit de maintenir ensuite la solution pendant un temps suffisamment long (quelques jours par exemple) à température ordinaire pour retrouver la répartition initiale.

On sait^{18,29} que l'incubation pendant plusieurs jours à 37° C de solutions de virus de la mosaïque du tabac préparées par centrifugation différentielle^{13,33}, amenées au point isoélectrique (pH 3.92) puis à pH 7 conduit à un degré d'agrégation élevé des particules. Il semble par contre que lorsqu'on part d'une solution assez peu concentrée (0.2%), fraîchement préparée par précipitation et contenant des particules d'assez grande taille, et qu'après dilution (à 0.008%) on la porte à 37° C, à un pH de l'ordre de 5, on obtienne non pas une agrégation ultérieure de l'ensemble des particules mais un accroissement de l'état de polydispersion avec une évolution de la taille moyenne vers les petites longueurs. C'est ainsi que pour une solution préparée à partir de III à pH 5 on a $l_f = 5,550$ Å et $P = 5,000$ à 20° et immédiatement après préparation, tandis que si on la garde 48 h à 37° on trouve alors $l_f = 4,400$ Å et $P = 10,400$. Indiquons que si la même solution est maintenue 48 h à 20° on a alors $l_f = 5,150$ Å, longueur qu'un chauffage de 1 h 30 à 62° fait passer à 4,350 Å (avec $P = 11,000$). (La même solution au bout de 6 h seulement à 20° donnait $l_f = 5,400$ Å et il suffisait de la chauffer 10 minutes à 55° pour que l_f tombe à 4,800 Å avec $P = 7,800$).

ACTION DU pH

L'effet du pH sur la taille des particules du virus de la mosaïque du tabac est bien connu. Dès 1938 MEHL remarquait³⁴ que pour un échantillon préparé par voie chimique en 1935 par STANLEY la constante de diffusion de rotation était 34.5 fois plus grande à pH 6.8 qu'à pH 4.5. Pour pH 6.8 il observait une valeur de D voisine de 25, ce qui

correspond à une taille moyenne de particules de 7,000 Å, et à p_H 4.5 $D \approx 0.75$, soit 1,25,000 Å. Il a également signalé la lenteur des évolutions et, en particulier, que pour

des changements successifs de p_H la réversibilité de l'agrégation paraissait incomplète par suite du retard à l'établissement des équilibres. Plus récemment, la dissociation réversible des particules de virus "non agrégé" (masse particulaire $4 \cdot 10^7$ environ) dans la région des p_H alcalins a fait l'objet d'une étude très complète³⁷.

Nous avons étudié la variation de la longueur moyenne des grosses particules en fonction du p_H pour certaines de nos solutions dans la région des p_H acides. La Fig. 2 donne quelques résultats caractéristiques. L'allure générale du comportement est la même que celle indiquée par MEHL, y compris la réversibilité partielle (due à la lenteur d'établissement des équilibres) des distributions de taille lors de changements successifs de p_H . On voit sur ces courbes l'énorme différence de taille qui accompagne le passage d'une solution mère à une autre, et par suite se trouve confirmé l'effet considérable sur la taille

Fig. 2. Variation de la taille des particules en fonction du p_H

1. Solution I
2. Solution III
3. Solution IV
4. Solution V

moyenne des particules du mode de préparation du virus et des divers traitements auxquels il a été soumis³⁵.

CONCLUSION

De toute l'étude qui précède il ressort que pour les solutions de virus de la mosaïque du tabac dans un état d'agrégation élevée, la taille des particules de fréquence maxima et le degré de polydispersion des solutions sont extrêmement sensibles aux divers facteurs physiques. Malgré le grand nombre de paramètres qui interviennent dans la fixation de la répartition de taille des particules, il est possible de systématiser les propriétés des solutions, et les perfectionnements que nous avons apportés à la théorie de la biréfringence d'écoulement des solutions colloïdales permettent de suivre avec précision les modifications des particules de virus de la mosaïque du tabac.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier ici MM. BAWDEN (Rothamsted Experimental Station, Harpenden) et SEGRÉTAIN (Institut Pasteur, Paris) qui ont bien voulu préparer et mettre à notre disposition d'assez grosses quantités de virus de la mosaïque du tabac.

RÉSUMÉ

La mesure en fonction du gradient de vitesse de l'angle d'extinction des solutions du virus de la mosaïque du tabac permet de déterminer la taille moyenne des particules, d'évaluer leur degré de polydispersion et d'estimer leurs interactions. On étudie successivement l'effet du vieillissement des solutions, leur démixtion, l'action des traitements mécaniques et thermiques ainsi que l'effet des variations de p_H .

SUMMARY

The measurement of the extinction angle of tobacco mosaic virus solutions at different velocity gradients gives with satisfactory accuracy the mean size of the particules, the polydispersity, and the magnitude of interactions. Aging of the solutions, demixting, and the effects of mechanical and thermal processes have been studied.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Messung des Auslöschenwinkels der Tabakmosaikvirus-Lösungen für verschiedene Geschwindigkeitsgradienten ermöglicht die Bestimmung der mittleren Grösse der Partikeln, des Polydispersionsgrades und der Wechselwirkungen. Der Einfluss des Alters der Lösungen, die Entmischung, die Wirkung der mechanischen und thermischen Behandlungen und die Wirkung der Änderungen des pH werden untersucht.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. JOLY, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 404.
- 2 M. JOLY, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 108.
- 3 M. JOLY, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 398.
- 4 M. JOLY, *Kolloid-Z.*, 115 (1949) 83.
- 5 H. A. SCHERAGA, J. T. EDSALL ET J. O. GADD, *Double refraction of flow and the dimensions of large asymmetrical molecules* (1949). (Communication privée).
- 6 W. KUHN, *Z. physik. Chem.*, 161 A (1932) 1 et 447.
- 7 J. M. BURGERS, *Second Report on Viscosity and Plasticity*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam 1938.
- 8 M. JOLY, *J. chim. phys.*, 46 (1949) 316.
- 9 CH. SADRON, *J. phys. radium*, 9 (1938) 381.
- 10 CH. SADRON ET H. MOSIMANN, *J. phys. radium*, 9 (1938) 384.
- 11 J. B. DONNET, *Compt. rend.*, 229 (1949) 189.
- 12 A. PETERLIN ET H. A. STUART, *Z. Physik*, 112 (1939) 1 et 129.
- 13 G. OSTER, P. M. DOTY ET B. H. ZIMM, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 1193.
- 14 E. PFANKUCH ET H. RUSKA, *Z. Naturforsch.*, 2b (1947) 358.
- 15 G. OSTER, *Rec. trav. chim.*, 68 (1949) 1123.
- 16 G. OSTER, *J. Gen. Physiol.*, 33 (1950) 445.
- 17 P. M. DOTY, W. A. AFFENS ET B. H. ZIMM, *Trans. Faraday Soc.*, 62 B (1946) 66.
- 18 E. J. W. VERWEY, *Philips Research Reports*, 1 (1945) 33.
- 19 E. J. W. VERWEY ET J. T. OVERBEEK, *Trans. Faraday Soc.*, 42 B (1946) 117 et 126.
- 20 E. J. W. VERWEY ET J. T. OVERBEEK, *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1948.
- 21 L. ONSAGER, *Physic. Rev.*, 62 (1942) 558.
- 22 L. ONSAGER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 (1949) 627.
- 23 B. H. ZIMM, *J. Chem. Phys.*, 14 (1946) 164.
- 24 J. DUCLAUX, *J. Polymer Sci.*, 2 (1947) 626.
- 25 C. V. SCHULTZ, *Z. Naturforsch.*, 2a (1947) 348.
- 26 M. L. HUGGINS, *J. Phys. Colloid Chem.*, 52 (1948) 248.
- 27 G. SCHRAMM ET G. BERGOLD, *Z. Naturforsch.*, 2b (1947) 108.
- 28 P. BOEDER, *Z. Physik*, 75 (1932) 258.
- 29 G. OSTER, *J. Gen. Physiol.*, 31 (1947) 89.
- 30 F. A. BAWDEN ET N. W. PIRIE, *Proc. Roy. Soc. London*, 123 B (1937) 274.
- 31 J. D. BERNAL ET I. FANKUCHEN, *J. Gen. Physiol.*, 25 (1941) 111.
- 32 W. KUHN, *Kolloid-Z.*, 62 (1933) 269.
- 33 W. M. STANLEY, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1804.
- 34 J. W. MEHL, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 6 (1938) 218.
- 35 F. A. BAWDEN ET N. W. PIRIE, *Brit. J. Exptl Pathol.*, 26 (1945) 294.
- 36 M. JOLY, *Trans. Faraday Soc.*, à paraître.
- 37 G. SCHRAMM, *Z. Naturforsch.*, 2b (1947) 112 et 249.
- 38 M. JOLY, *J. phys. radium*, sous presse.
- 39 H. RUSKA, *Kolloid-Z.*, 110 (1948) 97.

Reçu le 23 avril 1951