



HAL
open science

(Bio-)fonctionnalisation de bâtonnets colloïdaux modèles et étude de leurs auto-assemblages

Alexis De La Cotte

► **To cite this version:**

Alexis De La Cotte. (Bio-)fonctionnalisation de bâtonnets colloïdaux modèles et étude de leurs auto-assemblages. Matière Condensée [cond-mat]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0192 . tel-01612730

HAL Id: tel-01612730

<https://theses.hal.science/tel-01612730>

Submitted on 8 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR
SPÉCIALITÉ : LASERS, MATIÈRE ET NANOSCIENCES

Par Alexis de la COTTE

**(Bio-)fonctionnalisation de bâtonnets colloïdaux modèles
et étude de leurs auto-assemblages**

Sous la direction de : Eric GRELET

Soutenue le 07 octobre 2015

Membres du jury :

M. AARTS, Dirk
M. BELAMIE, Emmanuel
M. GRELET, Eric
M. LECOMMANDOUX, Sébastien
M. NIZAK, Clément
Mme ZAKRI, Cécile

Professeur à l'Université d'Oxford
Directeur d'études à l'EPHE
Chargé de Recherche, CNRS
Professeur à l'INP de Bordeaux
Chargé de Recherche, CNRS
Professeur à l'Université de Bordeaux

Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Examineur
Examineur
Présidente du jury

(Bio)-fonctionnalisation de bâtonnets colloïdaux modèles et étude de leurs auto-assemblages

Cette thèse porte sur les différentes voies de fonctionnalisation et d'auto-organisation d'un système modèle dans le domaine de la matière condensée : le virus fd et ses mutants. Alors que son diagramme de phase cristal-liquide a été établi et sa correspondance qualitative avec les prédictions théoriques montrée, une des perspectives majeure consiste en son utilisation comme brique élémentaire dans la construction de nouveaux auto-assemblages. De telles avancées passent nécessairement par l'ajout de fonctions de manière régio-sélective sur le corps de la particule. Nous proposons dans ces travaux l'étude de plusieurs voies de fonctionnalisation menant à l'ajout d'espèces moléculaires ou macromoléculaires soit sur l'ensemble du virus ou bien uniquement à son extrémité.

En réalisant le greffage de polymères thermosensibles, il est alors possible d'explorer les possibilités d'induire une transition de phase par variation du diamètre effectif du bâtonnet. En utilisant des diblocs d'élastine, ce principe est montré sur la transition entre le liquide isotrope et la phase nématique. L'utilisation de mutants particuliers, conçus par *phage display*, permet de s'intéresser alors uniquement à la fonctionnalisation de la protéine p3 située à une des extrémités du phage. L'ajout de chromophores permet alors une visualisation unique de la phase smectique et de ses défauts et crée également un effet *patchy* perturbant le diagramme de phase cristal-liquide. La biotine quant à elle permet la création d'auto-assemblages du fait de son interaction spécifique avec les dérivés d'avidine et un tel système est alors comparé avec un mutant dont l'ADN modifié permet l'expression directe d'une étiquette biologique complémentaire de la streptavidine. Les résultats prometteurs obtenus sont également complétés par une étude encourageante pour l'utilisation des systèmes cristal-liquides colloïdaux dans le domaine de l'électro-optique.

(Bio)-functionalization of a model system of rod-like particles and study of their self-assemblies

This thesis deals with the different paths of functionalization and self-organization of a model system of colloidal rod-like particles: the fd virus and its mutants. While its liquid-crystalline phase diagram is well established and proven to be in qualitative agreement with theory and numerical simulations, one of the most trending perspectives is its use as building-block in new self-assemblies. For such purposes, it is mandatory to add functions regio-specifically on the particle. We show in this work the study of several ways of functionalization leading to the grafting of molecular or macromolecular compounds onto the whole virus or only onto its tip.

When grafting thermoresponsive polymers, we can then explore the possibilities to induce phase transitions by a variation of the effective diameter of the rod. Using diblocs of elastin-like peptides, this principle is shown to work on the isotropic-to-nematic phase transition. The use of particular mutants, engineered by phage display, allows us to functionalize only the tip of the virus. The addition of dyes provides unique features on the smectic phase and its defects and creates a patchy effect which is modifying the liquid-crystalline phase diagram. The functionalization with biotin leads towards the creation of new self-assemblies thanks to its specific interaction with avidine and such a system is then compared with a mutant displaying a biological tag interacting with streptavidin. The results obtained are promising and are completed by a whole study of the use of colloidal liquid-crystalline system in electro-optics.

Remerciements

Je remercie tout d'abord M. Philippe Richetti et Mme Cécile Zakri, directeur et future directrice du Centre de Recherche Paul-Pascal pour l'accueil qui m'a été fait au sein du laboratoire.

Je remercie également les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail : MM. Dirk Aarts et Emmanuel Belamie qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, Mme Cécile Zakri d'avoir présidé la soutenance et MM. Sébastien Lecommandoux et Clément Nizak.

Cette thèse, encadrée par Eric Grelet, est l'aboutissement de longues années de collaboration entre nous, et je te remercie infiniment de m'avoir accordé ta confiance et soutenu tout du long. Je ne sais pas si le pari de rester il y a quatre ans était risqué, mais toujours est-il que je ne le regrette pas, et je pense, ou tout du moins j'espère, ne pas te l'avoir fait regretter non plus. J'ose espérer aussi que nos routes se recroiseront dans le futur et ce sera toujours avec un immense plaisir.

Mes premières armes au laboratoire, je les ai faites accompagné de deux personnes. Je ne sais trop comment formuler mes remerciements à la première, Richa, qui m'a tant fait grandir, plus particulièrement d'un point de vue personnel et émotionnel. Tu sais ce que je pense de toi et la place spéciale que tu occuperas toujours pour moi. Emilie, l'une des premières sur la longue liste de mes co-bureaux ! J'ai tellement appris de ta rigueur et de ton organisation. Tu es et seras longtemps un modèle pour moi et je suis ravi d'avoir pu te rencontrer si tôt dans cette aventure.

La longue liste de co-bureaux dont je parlais la voici : Julien, Parantap, Déborah, Damien, Lin, Clara, Laura, Cheng, Marie et Jérôme. Merci à tous pour la bonne humeur que vous avez tour à tour apporté au bureau. De manière évidente, je remercie aussi les personnes avec qui j'ai partagé le laboratoire (en plus du bureau pour certains) : Richa, Emilie, Laura, Lin et Louis et plus particulièrement Carlos, Marie, Baekkyoung et Cheng avec qui j'ai partagé des projets et dont l'aide m'a été précieuse. Déborah, Damien, Jérôme, je ne vous oublie pas non plus, même si vos thématiques plus éloignées ne m'ont pas permis de vous être d'une grande aide.

Il me faut également, de manière globale, remercier les ITA du laboratoire pour leur aide et leur sympathie. De manière plus particulière, merci à toi Pascal pour tous ces montages fantastiques sans lesquels je n'aurais pu faire que beaucoup moins, Ahmed pour m'avoir secouru tant de fois, Karen pour ta disponibilité et ton efficacité, Sébastien pour toute l'aide que tu m'as apportée en biologie, Eric pour toutes ces commandes et ces signatures et Isabelle pour m'avoir formé puis aidé dès que j'en avais besoin au MET.

Un grand merci s'impose également à Elizabeth, et à travers toi les membres de l'équipe M³, pour ta sympathie et ta disponibilité dès qu'une envie me prenait de vouloir sortir un de mes produits de la boîte à gants. Un grand merci également à mes collaborateurs au LPMC et à Elisabeth Garanger pour m'avoir accordé leur confiance avec leurs produits.

D'un point de vue plus personnel, l'une de mes premières pensées va à quelques un de mes compagnons de "*galère*" avec qui j'ai commencé et fini cette thèse. Et avec qui je compte bien tenir la promesse d'un voyage en Grèce l'an prochain ! Alan, Eva, Manu, on se souviendra de ces (trop) longues journées d'aout 2015 ! Une pensée encore plus particulière à toi, Eric. Tellement de soirées, de shooters (par mètres parfois !), de jeux de sociétés et de souvenirs. Tout autant de choses qui vont me manquer ! Et avant de les oublier aussi, et parce qu'ils sont forcément associés à toi, je préfère les remercier maintenant : Sandra et notre Besst Team favorite (Anaïs, Alex et Mounir).

Les années passées au sein du laboratoire m'ont également permis de me nouer d'amitié avec un certains nombre de doctorants et post-doctorants que j'aimerais naturellement remercier. Je vais commencer par les plus anciens, qui sont déjà partis. Damien et Romain, j'ai toujours beaucoup apprécié les moments passés au et en dehors du labo et les discussions que nous avons pu avoir. Une mention spéciale à deux personnes : Martin, avec nos expériences bactériennes plus que louches et les fameuses soirées *Tellement Vrai* et autres programmes associés, et Christophe, notre Mamie préférée et victime favorite.

Des remerciements j'en dois également beaucoup à certaines personnes qui vont rester après mon départ. Alors dans un ordre tout à fait arbitraire, je vais commencer par toi, Pauline. Toutes ces heures passées à discuter, ces week-ends, ces sorties. J'espère que tu garderas à vie toutes les peluches que j'ai pu te gagner ! Clairement ces deux dernières années n'auraient pas été les mêmes sans ta présence. Merci pour ta gentillesse, ta patience, ton écoute et merci d'avoir été là, toujours.

Céline... Que dire..? Je ne sais pas si mes cheveux doivent souffrir ou se réjouir de partir ! Il va me manquer en tout cas ce thé presque quotidien et tous ces enfantillages que l'on a pu faire aux quatre coins du laboratoire. Et le décopatch. Et les bracelets. Et mettre le feu à ton appartement en faisant des guirlandes. Je vais forcément devoir revenir te voir car je ne suis pas certain de trouver une personne au monde qui puisse commencer seulement à te ressembler.

Kévin... Mon partenaire de Mojito préféré. Je ne sais pas combien de saladier on a pu faire ensemble, je ne sais pas non plus combien de bonbons j'ai pu manger dans ton bureau, mais je sais que je me souviendrai longtemps de la difficulté de certains lendemains auxquels tu étais souvent associé. Et le badminton, les McDo, tous les mails que j'ai pu envoyer en ton nom, bref : Merci !

Marion... Tellement d'heures passées dans ton bureau à discuter, d'angoisses à scruter l'écran de nos téléphones les jours où Roger joue. Tu as toujours été là dans les moments les plus difficiles, très (voire trop) souvent là aussi lorsqu'il s'agissait de rentrer à des heures tardives, des occasions dont tu as profité pour me faire bailler à répétition. Merci d'être ma rouquine préférée et d'aimer Olaf peut-être autant que moi.

Mélodie... Quelques lignes semblent bien dérisoires en comparaison de tous les moments que l'on a pu partager. Très certainement, je ne serais pas la moitié du cuisinier que je suis maintenant si je ne t'avais pas rencontrée. Je pourrais essayer de lister les choses qui vont me manquer, à commencer par les cannibales ou les snickers, les thés et Nabilla, mais je pense que je peux bien résumer ça en un seul mot : tout. Tout va me manquer... Et pour tout ça justement : Merci !

Et en espérant n'oublier personne : Margot, Mayada, Bosi, Vincent, Antoine, Armand, David, PE, Sophie, Hélène, Artem, Rafael, Hector, Nadine, JC, Pierre, Hélène, Jo, Petra, David, Manue, Laurence, Emmanuel. Quentin, Péroline et Aurélien également, pour les kébabs et tous ces week-ends inoubliables.

Et merci à ma famille pour son soutien, même lointain, avec une pensée particulière pour Gabriel, mon filleul et le dernier venu il y a quelques mois à peine. Qui sait ? Peut-être un jour ce manuscrit lui tombera entre les mains.

"Libéré, délivré !"

Elsa – *La Reine des Neiges* – Walt Disney Pictures

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	1
<u>Chapitre 1 : Etat de l'art</u>	7
1. Auto-organisation d'un système de bâtonnets à répulsion de cœur-dur.....	8
2. Le virus fd : un système modèle	17
3. Bio-fonctionnalisation	29
<u>Chapitre 2 : Fonctionnalisation générique des virus avec des polymères thermosensibles</u> ...	37
1. Introduction	38
2. Protocole de greffage des polymères.....	47
3. Virus fonctionnalisés PNIPAM	49
4. Virus fonctionnalisés par des ELPs	53
<u>Chapitre 3 : Bio-fonctionnalisation régio-sélective du M13-C7C</u>	65
1. Introduction à la bio-fonctionnalisation régio-sélective	66
2. Protocole de fonctionnalisation	67
3. Preuve de principe : fonctionnalisation avec des chromophores.....	69
4. Fonctionnalisation régio-spécifique du M13-C7C avec la biotine : formation d'auto-assemblages.....	79
<u>Chapitre 4 : Ajout régio-sélectif de fonction par phage display et formation d'auto-assemblages</u>	91
1. Introduction au phage display.....	92
2. Evaluation de l'affinité du M13AS pour la streptavidine	94
3. Modèle prédictif et simplifié pour la formation de complexes	98
4. Formation d'auto-assemblages	99
<u>Chapitre 5 : Effets électro-optiques dans des suspensions cristal-liquides minérales</u>	113
<u>Conclusion générale</u>	143

Introduction générale

Cette thèse de doctorat effectuée au Centre de Recherche Paul-Pascal est consacrée à l'étude de l'auto-organisation de deux systèmes de bâtonnets colloïdaux, l'un organique, le virus fd et ses mutants, et le second inorganique, le phosphate de lanthane (LaPO_4).

Les cristaux-liquides colloïdaux, à l'instar de leurs homologues moléculaires, présentent les mêmes facultés d'auto-organisation en diverses mésophases. Leur diagramme de phase s'établit en fonction de la concentration ce qui les classe dans la famille des cristaux-liquides lyotropes, la seconde étant celle des thermotropes dont le diagramme de phase s'établit avec la température.

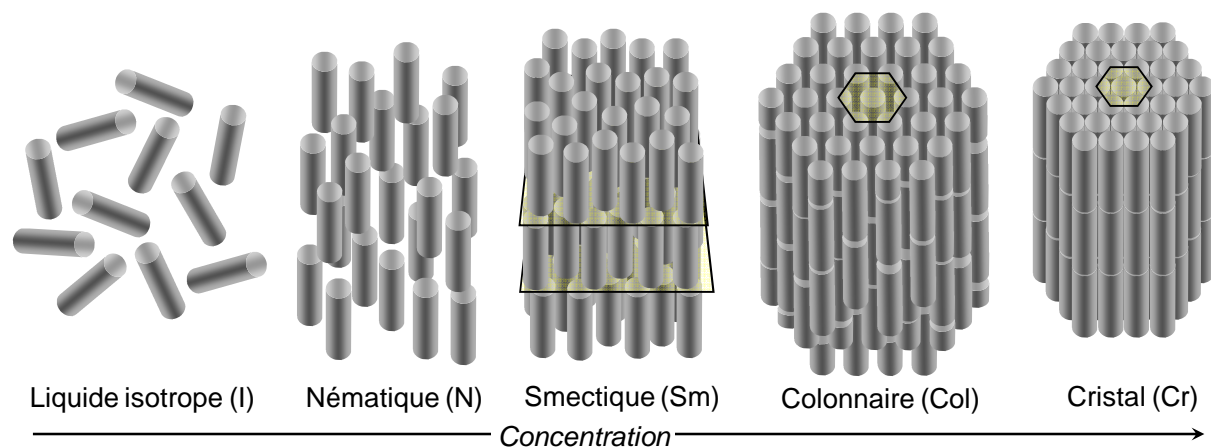


Figure 1 : Auto-organisation cristal-liquide d'un système de particules en forme de bâtonnet présentant une répulsion de cœur dur en fonction de sa concentration : liquide isotrope, nématique, smectique, colonnaire et cristalline. Ce diagramme de phase théorique est celui retrouvé expérimentalement pour les suspensions de virus fd.

L'existence de ces phases complexes émerge de l'anisotropie de forme des colloïdes et de leurs interactions essentiellement d'origine entropique (i.e. de volume exclu) et/ou électrostatique [1]. Très fréquemment, leur taille permet également une visualisation à l'échelle de la particule individuelle, par des techniques simples telles que la microscopie optique, facilitant ainsi les études structurales et dynamiques.

En 1949, Lars Onsager chercha à expliquer les phénomènes de transition entre un liquide isotrope et une phase nématique [2] possédant un ordre orientationnel faites par Zocher [3] sur des particules d'oxyde de vanadium puis de nouveau par Bawden *et al.* [4] sur le virus de la mosaïque du tabac (TMV). Il est alors le premier à montrer la stabilité thermodynamique de la phase nématique.

Son explication repose sur la maximisation de l'entropie s'appuyant sur deux contributions distinctes : l'une orientationnelle (favorisant l'existence du liquide isotrope) et l'autre associée au volume exclu (et favorisant la phase nématique). La compétition de ces deux contributions résulte en une fraction volumique définissant la transition isotrope-nématique (I-N) qu'il explicite comme étant : $\Phi_{I-N} \approx 4 D/L$ (D et L étant le diamètre et la longueur du bâton respectivement). Sur la base et à la suite de ces travaux vont se succéder un grand nombre de modélisations et simulations numériques [1,5–8] qui vont permettre

d'établir le diagramme de phase théorique complet d'un système de particules en forme de bâtonnets (Figure 1).

Il existe un large panel de particules colloïdales dont l'anisotropie de forme permet l'observation d'une transition d'un liquide désorganisé vers un nématique orienté. Depuis les observations faites par Zocher [3], le contrôle de la croissance cristalline de différents composés a permis de mettre en évidence ce type de comportement pour divers oxydes [9] et l'étude des différentes mésophases dans lesquelles ils peuvent s'auto-organiser. Récemment, l'observation d'une transition liquide isotrope – nématique a été faite dans des systèmes tels que des argiles de beidellite [10] ou des feuilles d'oxyde de graphène [11]. La polydispersité en taille des particules et leur stabilité colloïdale sont néanmoins des défauts récurrents qui ne permettent pas l'obtention du diagramme de phase théorique (Figure 1) ou d'envisager de potentielles applications.

D'un point de vue expérimental, le virus fd est alors un système unique. Il s'agit d'un bactériophage filamenteux d'environ 1 μm de longueur pour un diamètre de quelques nanomètres découvert par Hoffman-Berling dans les années 1960 [12]. Depuis, de nombreuses études ne cessent d'être menées sur la compréhension de sa structure et son utilisation dans diverses applications des bio- et nanotechnologies ainsi que dans le domaine de la matière condensée. La nature virale de la particule lui confère une architecture parfaitement définie et uniforme puisque prédéfinie génétiquement qui contraste avec d'autres colloïdes non-sphériques dont la distribution de taille empêche une comparaison directe avec la théorie. La monodispersité dont il fait preuve fait alors du système du virus fd un choix idéal et un modèle unique pour l'étude de l'auto-organisation des particules anisotropes. De manière qualitative, son digramme de phase cristal-liquide est identique à celui prédit par les simulations numériques et présenté en Figure 1 [13–15]. D'un point de vue quantitatif, la prise en compte des phénomènes de flexibilité et des interactions électrostatiques permet d'obtenir également un accord général avec la théorie [16–18].

Le corps du virus est composé d'une seule protéine majoritaire dont les 2 700 copies s'enroulent hélicoïdalement autour d'un brin d'ADN et de quatre autres minoritaires situées aux extrémités [12]. Ces protéines exposent au solvant un nombre important de fonctions chimiques, notamment des amines et des acides carboxyliques [19]. En s'appuyant sur des chimies spécifiques, il est alors possible de venir y greffer des composés moléculaires ou macromoléculaires. Cette fonctionnalisation peut alors permettre une visualisation dynamique ou structurale du système (en marquant certaines particules avec des chromophores) ou bien faire varier les caractéristiques de la particule (notamment son diamètre et sa charge en utilisant un polymère).

L'introduction de fonctions sur le virus est également possible par *phage display* [20]. Cette technique consiste en une modification de l'ADN dont le résultat est l'expression d'une séquence polypeptidique sur l'une des protéines composant le bactériophage. Suivant le gène qui est modifié, l'insert apparaît uniquement sur l'une des protéines et se retrouve donc soit sur l'ensemble du corps du virus, soit uniquement localisé à l'une de ses extrémités. Ainsi, il est possible d'exploiter ces fonctions dans l'idée d'une chimie régio-sélective ou pour leur complémentarité intrinsèque avec d'autres protéines. Dans les deux cas, ces ajouts présentent un intérêt dans l'utilisation du virus pour la construction de nouveaux auto-assemblages.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à l'introduction des notions nécessaires à la compréhension du manuscrit. Le détail et les limites du diagramme de phase d'un système de particules en forme de bâtonnets sont décrits d'un point de vue théorique. Une attention particulière est apportée aux influences de la flexibilité et de la charge sur les transitions de phases. Le virus fd et quelques-uns de ses mutants sont ensuite introduits avec un descriptif de leurs caractéristiques respectives. Le diagramme de phase complet du bactériophage est alors présenté ainsi que les variations qu'il subit du fait de ces mutations (impactant notamment sur sa charge et sa flexibilité) et une comparaison avec la théorie. Enfin, une introduction à la bio-fonctionnalisation est donnée avec notamment l'approche générale et spécifique à deux chimies bien documentées : celle des amines et celle des thiols.

Le deuxième chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus pour des virus dont la surface est modifiée par des polymères thermosensibles. Ce type de polymères subit avec la température un changement de conformation et de taille caractéristique qui, lorsqu'ils sont greffés sur le corps du virus, entraîne une variation du diamètre effectif de la particule. Dans certaines conditions, il est alors possible d'induire une transition cristal-liquide (notamment entre le liquide isotrope et le nématique). Deux systèmes de virus fonctionnalisés sont alors étudiés : avec du poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM), pour lequel seule une transition sol-gel est possible du fait de l'apparition d'interactions hydrophobes attractives, et avec des di-blocs d'élastines, système avec lequel une transition isotrope-nématique réversible avec la température est observable.

Le troisième chapitre s'intéresse à la fonctionnalisation biochimique régio-sélective du bactériophage. Le *phage display* permet l'expression locale (à l'extrémité du virus en particulier) de séquences polypeptidiques spécifiques. L'introduction de cystéines, seul acide aminé à posséder une fonction thiol, ouvre alors la voie à une chimie et un greffage localisé uniquement à l'extrémité de la particule. Dans un premier temps, la réalisation d'une telle fonctionnalisation avec des chromophores en apporte la preuve de principe ainsi qu'une observation plus en détail de la phase smectique et de ses défauts ainsi que l'apparition d'interactions hydrophobes modifiant le diagramme de phase du fait d'une interaction localisée attractive et l'obtention de particules de type *patchy* [21]. Dans un second temps, la même fonctionnalisation est réalisée avec de la biotine afin de permettre, par le biais de son interaction avec l'avidine et ses dérivés (streptavidine, neutravidine), l'utilisation du virus comme bloc de base dans la construction de nouveaux auto-assemblages.

En quatrième chapitre, nous proposons alors une alternative à la voie biochimique présentée précédemment. Le *phage display* est une méthode permettant l'insertion d'une grande variété de séquences polypeptidiques donc certaines présentent la propriété d'être des ligands pour des protéines ou des macromolécules. Nous nous intéressons alors au M13-Antistreptavidine dont l'insert présente un caractère complémentaire avec la streptavidine. Nous présentons dans un premier temps l'estimation de l'affinité du système par le biais de l'évaluation de la constante de dissociation, K_d , avant de nous intéresser à la formation d'auto-assemblages.

En cinquième partie, nous nous intéressons alors au second système, des bâtonnets de phosphate de lanthane (LaPO_4). Malgré leur polydispersité en taille, ils présentent tout de même un caractère modèle du fait de leur grande stabilité colloïdale, et ce même dans les phases concentrées, et de leur biréfringence intrinsèque élevée. Nous montrons alors, sous

la forme de deux articles, l'étude de l'auto-organisation de ce système de bâtonnets inorganiques et l'étude des effets électro-optiques, qui ont un intérêt technologique afin de développer des dispositifs basés sur de telles suspensions minérales. L'une des particularités de ce système est son solvant, l'éthylène glycol, dans lequel il présente une stabilité colloïdale beaucoup plus importante que dans l'eau. Des études par microscopie optique et par diffraction des rayons X aux petits angles permettent alors d'obtenir le diagramme de phase cristal-liquide, qui présente en plus d'une phase nématique, une phase colonnaire hexagonale. Nous nous intéressons par la suite à l'orientation sous champ électrique de ces deux mésophases puis à celle d'un liquide isotrope concentré. Dans ce deuxième cas, l'application du champ entraîne alors l'apparition d'une biréfringence induite connue sous le nom d'effet Kerr. L'étude du couplage et de la relaxation est alors effectuée, dans diverses géométries (avec des électrodes en contact direct ou externes à l'échantillon), et analysée de manière quantitative dans le contexte étendu de la théorie de Maxwell-Wagner.

Enfin, nous terminons ce manuscrit par une conclusion générale, résumant les travaux présentés, ainsi que les perspectives qui peuvent leur être associés.

Bibliographie

- [1] G. J. Vroege and H. N. W. Lekkerkerker, *Rep. Prog. Phys.* **55**, 1241 (1992).
- [2] L. Onsager, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 627 (1949).
- [3] H. Zocher, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **147**, 91 (1925).
- [4] F. C. Bawden, N. W. Pirie, J. D. Bernal, and I. Fankuchen, *Nature* **138**, 1051 (1936).
- [5] D. Frenkel, *J. Phys. Chem.* **92**, 3280 (1988).
- [6] P. Bolhuis and D. Frenkel, *J. Chem. Phys.* **106**, 666 (1997).
- [7] D. Frenkel, H. N. W. Lekkerkerker, and A. Stroobants, *Nature* **332**, 822 (1988).
- [8] J. M. Polson and D. Frenkel, *Phys. Rev. E* **56**, R6260 (1997).
- [9] A. S. Sonin, *J. Mater. Chem.* **8**, 2557 (1998).
- [10] E. Paineau, K. Antonova, C. Baravian, I. Bihannic, P. Davidson, I. Dozov, M. Impéror-Clerc, P. Levitz, A. Madsen, F. Meneau, and L. J. Michot, *J. Phys. Chem. B* **113**, 15858 (2009).
- [11] T.-Z. Shen, S.-H. Hong, and J.-K. Song, *Nat. Mater.* **13**, 394 (2014).
- [12] D. A. Marvin, M. F. Symmons, and S. K. Straus, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **114**, 80 (2014).
- [13] S. Fraden, in *Obs. Predict. Simul. Phase Transit. Complex Fluids*, edited by M. Baus, L. F. Rull, and J.-P. Ryckaert (Kluwer, Dordrecht, 1995), pp. 113–164.
- [14] Z. Dogic and S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 2417 (1997).
- [15] E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168301 (2008).
- [16] E. Grelet and S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 198302 (2003).
- [17] E. Grelet, *Phys. Rev. X* **4**, 021053 (2014).
- [18] Z. Dogic and S. Fraden, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 47 (2006).
- [19] K. Zimmermann, H. Hagedorn, C. C. Heuck, M. Hinrichsen, and H. Ludwig, *J. Biol. Chem.* **261**, 1653 (1986).
- [20] G. P. Smith, *Science* **228**, 1315 (1985).
- [21] A. B. Pawar and I. Kretzschmar, *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 150 (2010).

Chapitre 1 : Etat de l'art

1. Auto-organisation d'un système de bâtonnets à répulsion de cœur-dur.....	8
1.1 Théorie d'Onsager.....	11
1.2 Extensions de la théorie d'Onsager	14
1.3 Transition nématique-smectique.....	15
1.4 Phase colonnaire hexagonale	17
2. Le virus fd : un système modèle	17
2.1 Morphologie du virus.....	17
2.2 Les mutants du virus fd	19
2.3 Le diagramme de phase cristal-liquide du virus fd	21
2.3.a) La phase cholestérique	21
2.3.b) Transition isotrope-cholestérique	25
2.3.c) Phase smectique et transition cholestérique-smectique	27
2.3.d) Ordre hexagonal des phases denses.....	28
3. Bio-fonctionnalisation	29
3.1 Chimie des amines	29
3.1.a) N-hydroxysuccinimide ester.....	29
3.1.b) Alternatives : isothiocyanate et tétrafluorophenyl ester	30
3.2 Chimie des thiols.....	31
3.2.a) Réduction du pont disulfure	31
3.2.b) Maléimides.....	32
3.2.c) Iodo-acetyl.....	32
4. Conclusion.....	33
Bibliographie.....	35

1. Auto-organisation d'un système de bâtonnets à répulsion de cœur-dur

La description de la physique et de l'évolution d'un système macroscopique est régie par les propriétés et les lois d'interactions de ses constituants microscopiques (atomes, molécules, particules...) [1,2].

Cette description repose sur des grandeurs telles que le volume, la pression, la température, le nombre de particules, etc... Certaines de ces grandeurs sont fixées par des contraintes extérieures et sont imposées au système et d'autres sont libres d'évoluer au gré des variations de l'état microscopique. Le caractère fixe ou variable de ces grandeurs dépend de l'interaction du système avec son milieu extérieur. Les paramètres intrinsèques au système peuvent alors être traités par une distribution statistique.

La physique statistique repose sur l'utilisation de probabilités qui est justifiée pour des systèmes ayant un grand nombre de constituants. Cependant, ce traitement probabiliste implique que l'information que l'on possède sur le système n'est pas complète. La mesure de l'information connue se fait avec l'entropie statistique qui est définie par :

$$S_{stat} = -k_B \sum_{i=1}^M P_i \ln P_i \quad (1)$$

avec k_B , la constante de Boltzmann. Cette définition est valable pour un ensemble d'événements fini $\{1 \dots M\}$ avec leur probabilités respectives $\{P_1 \dots P_M\}$. Lorsque tous les événements sont équiprobables (i.e. $P_i = 1/M$, quelque soit i), l'entropie statistique se réécrit alors :

$$S_{stat} = k_B \ln M \quad (2)$$

Dans notre cas, nous nous intéressons à un système non-isolé de N particules indiscernables, chacune ayant une position r_i et un moment cinétique $p_i = m_i v_i$ (m et v étant la masse et la vitesse respectivement), de volume V . Ce système interagit avec le milieu extérieur et fait l'objet d'une description canonique, c'est-à-dire que sa température, T , est imposée par son contact avec un thermostat.

Cette description se fait par une distribution statistique de l'énergie totale, E , dont chaque valeur est associée à une probabilité. On peut ainsi définir une fonction de partition, $Z(N, V, T)$, dite canonique qui dans le cas d'une distribution continue s'écrit :

$$Z(N, V, T) = \frac{1}{N! h^{3N}} \int dr dp \exp(-\beta E(r^N, p^N)) \quad (3)$$

avec $\beta = k_B T$. La probabilité d'un état d'énergie est associée à cette fonction de partition,

$$P_i = \frac{1}{Z(N, V, T)} \exp(-\beta E_i) \quad (4)$$

ainsi que l'énergie libre du système :

$$\beta F(N, V, T) = -\ln Z(N, V, T) \quad (5)$$

L'association de la définition de l'entropie statistique (équation (1)) avec les probabilités définies dans l'ensemble canonique (équation (4)) aboutit à la définition de l'entropie canonique :

$$S_{can} = \frac{1}{T}(E - F) \quad (6)$$

Notre système de particules est susceptible de subir une transition de phase d'un système désordonné vers un système ordonné. Cette transition se faisant à température et volume constants, elle ne peut s'effectuer que par une diminution de l'énergie libre, ce qui, d'après l'équation (6), s'accompagne d'une augmentation de l'entropie.

La compréhension du phénomène de transition passe par celle de l'évolution de F , qui implique donc le calcul de la fonction de partition (équation (5)). Dans un premier temps, il convient de décomposer l'énergie totale du système en deux composantes, une d'énergie potentielle et une d'énergie cinétique :

$$E(r^N, p^N) = U_N(r^N) + K_N(p^N) \quad (7)$$

avec r^N l'ensemble des positions de chaque particule ($\{r_1 \dots r_N\}$) et p^N celui des moments cinétiques ($\{p_1 \dots p_N\}$). L'intégration sur les moments simplifie l'expression de Z :

$$Z(N, V, T) = \frac{1}{N! \Lambda^3} Q(N, V, T) \quad (8)$$

avec la longueur d'onde thermique de de Broglie :

$$\Lambda = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k_B T}} \quad (9)$$

et l'intégrale de configuration :

$$Q(N, V, T) = \int dr^N \exp(-\beta U_N(r^N)) \quad (10)$$

L'énergie libre se décompose alors en une somme de contributions ayant chacune une intégrale de configuration spécifique :

$$\beta F(N, V, T) = \beta \sum_i F_i(N, V, T) \quad (11)$$

Dans le cas d'un système de particules interagissant entre elles, il est nécessaire de distinguer les contributions provenant des particules individuelles et celles provenant de

leurs interactions. Le cas sans interactions est celui idéal dit du gaz parfait pour lequel $U_N = 0$. L'intégrale de configuration se simplifie alors comme :

$$Q_{GP}(N, V, T) = V^N \quad (12)$$

En utilisant l'approximation de Stirling, il est alors possible de calculer l'énergie libre du système sans interactions :

$$\beta F_{GP}(N, V, T) = N \left(\ln \left(\frac{N \Lambda^3}{V} \right) - 1 \right) \quad (13)$$

Une fois cette contribution idéale extraite, il est possible alors d'obtenir la contribution à l'énergie libre due aux interactions entre particules :

$$\beta F_{int}(N, V, T) = -\ln \left(\frac{1}{V^N} Q_{int}(N, V, T) \right) \quad (14)$$

Il est possible de définir l'énergie comme une somme d'énergie d'interactions de paire :

$$U_N(r^N) = \sum_{i < j}^N u(r_i, r_j) \quad (15)$$

puis la fonction de Mayer-f comme :

$$f(i, j) = \exp \left(-\beta u(r_i, r_j) \right) - 1 \quad (16)$$

qui est reliée au volume exclu entre particules par :

$$v_{ex}(i, j) = - \int dr_i dr_j f(i, j) \quad (17)$$

L'approximation du gaz parfait est uniquement valable à une température donnée pour des systèmes dont la fraction volumique ($\rho = N / V$) est suffisamment faible. Dans notre cas, la manière la plus commune d'approximer l'énergie libre d'interaction est d'effectuer un développement du viriel. C'est un développement qui se fait en puissance de ρ et qui nous donne :

$$\beta F_{int}(N, V, T) \approx B_2 N \rho + \frac{1}{2} B_3 N \rho^2 + \dots \quad (18)$$

avec B_2 et B_3 les coefficients du viriel correspondant à des interactions entre deux et trois particules respectivement :

$$B_2 = -\frac{1}{2} \int \int dr_1 dr_2 f(1,2) = \frac{1}{2} v_{ex}(1,2) \quad (19)$$

$$B_3 = -\frac{1}{3} \int \int \int dr_1 dr_2 dr_3 f(1,2)f(1,3)f(2,3) \quad (20)$$

On se limite dans notre cas aux interactions impliquant uniquement deux particules entre elles. L'énergie libre totale du système, dans cette limite du deuxième ordre du viriel, va alors s'exprimer comme :

$$\beta F(N, V, T) \approx N(\ln(\Lambda^3 \rho) - 1) + B_2 N \rho \quad (21)$$

Cette définition de l'énergie libre est celle sur laquelle nous allons nous appuyer pour comprendre l'auto-organisation d'un système de bâtonnets à répulsion de cœur dur.

1.1 Théorie d'Onsager

Dans le cas qui nous intéresse ici, à savoir les particules colloïdales en forme de bâtonnets, les premières observations d'une transition de phase d'un liquide désordonné (isotrope (I)) vers une phase nématique (N) (Figure 1), dans laquelle une orientation préférentielle est adoptée, ont été faites par Zocher [3] sur des particules d'oxyde de vanadium et Bawden *et al.* [4] puis Bernal et Fankuchen [5] sur le virus de la mosaïque du tabac (TMV) en concentrant le système en particules. La phase nématique est caractérisée par son directeur qui correspond à l'orientation moyenne du grand axe des bâtonnets (Figure 1).

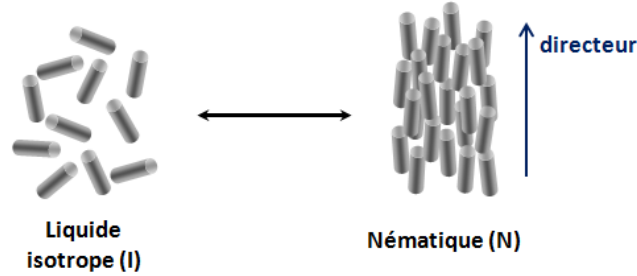


Figure 1 : Illustration de la transition d'un liquide isotrope vers la phase nématique.

La théorie faisant la description de ce phénomène sera faite par Lars Onsager en 1949 [6]. Il exprime alors les différentes contributions à l'énergie libre comme des fonctions d'une distribution orientationnelle des particules anisotropes, $f(\Omega)$. Ω est l'angle solide caractérisant chacune des orientations qui sont alors traitées comme des populations de particules indépendantes les unes des autres. La distribution orientationnelle est normalisée pour le nématique par :

$$\int f(\Omega) d\Omega = 1 \quad (22)$$

et pour le liquide isotrope, où la libre rotation des particules rend toutes les orientations équiprobables, il en découle que :

$$f_{iso}(\Omega) = \frac{1}{4\pi} \quad (23)$$

Onsager utilise cette distribution pour reformuler le développement du viriel de l'interaction de paire entre bâtonnets en se limitant au second coefficient qui s'exprime alors comme :

$$B_2 = \frac{1}{2} \int \int d\Omega d\Omega' f(\Omega) f(\Omega') v_{ex}(\Omega, \Omega') \quad (24)$$

où $v_{ex}(\Omega, \Omega')$ est le volume exclu entre deux particules d'orientations Ω et Ω' . En sommant les différentes contributions, l'énergie libre totale d'un système de bâtonnets s'écrit alors ainsi :

$$\begin{aligned} \beta F(f(\Omega)) = & N \left(\ln \left(\frac{N\Lambda^3}{V} \right) - 1 \right) + N \int d\Omega f(\Omega) \ln (4\pi f(\Omega)) \\ & + \frac{1}{2} \rho N \int \int d\Omega d\Omega' f(\Omega) f(\Omega') v_{ex}(\Omega, \Omega') \end{aligned} \quad (25)$$

Le premier terme correspond à l'entropie du système sans interactions entre particules, le deuxième exprime l'entropie orientationnelle des bâtonnets et le troisième l'entropie positionnelle reliée uniquement au volume exclu entre particules. Pour des particules suffisamment allongées, Onsager prédit alors une transition isotrope-nématique (I-N) en fonction de la fraction volumique et qui résulte de la compétition entre les entropies orientationnelle et positionnelle.

La Figure 2 illustre le volume exclu entre deux bâtonnets de forme sphéro-cylindrique de longueur L et de diamètre D dans les deux phases, liquide isotrope et nématique, qui peut s'exprimer de la manière suivante :

$$v_{ex}(\Omega, \Omega') = 2L^2 D |\sin \gamma| + 2\pi D^2 L + \frac{4}{3} \pi D^3 \quad (26)$$

avec γ , l'angle entre les deux grands axes des particules. Onsager se place alors dans la limite des bâtonnets infiniment longs (i.e. un rapport d'aspect $L/D \gg 1$) et rigides, ce qui revient à négliger les effets de bords et considérer uniquement le premier terme :

$$v_{ex}(\Omega, \Omega') \approx 2L^2 D |\sin \gamma| \quad (27)$$

L'énergie libre finale d'un système de bâtonnets infiniment long peut donc s'écrire comme :

$$\begin{aligned} \beta F(f(\Omega)) = & N \left(\ln \left(\frac{N\Lambda^3}{V} \right) - 1 \right) + N \int d\Omega f(\Omega) \ln (4\pi f(\Omega)) \\ & + \rho N L^2 D \int \int d\Omega d\Omega' f(\Omega) f(\Omega') |\sin \gamma| \end{aligned} \quad (28)$$

Onsager résout alors le problème de manière quantitative en prenant la fonction suivante pour la distribution orientationnelle dans le nématique :

$$f_{nem}(\theta) = \frac{\alpha \cosh(\alpha \cos \theta)}{4\pi \sinh \alpha} \quad (29)$$

où θ représente l'angle entre un bâtonnet et le directeur nématique.

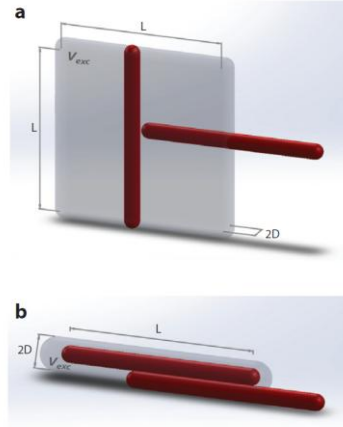


Figure 2 : Volume exclu entre deux bâtonnets (a) dans la phase liquide isotrope et (b) dans la phase nématique [7].

Il détermine ainsi les deux fractions de coexistence entre le liquide isotrope et la phase nématique. Plusieurs travaux vont ensuite affiner le choix de la fonction de distribution [8], et obtenir de manière quantitative :

$$\phi_{I(-N)} = 3.3 \frac{D}{L} \quad (30)$$

$$\phi_{(I-)N} = 4.2 \frac{D}{L} \quad (31)$$

Ces valeurs sont uniquement dépendantes du rapport d'aspect de la particule et sont exactes dans les limites des particules infiniment longues et rigides.

La phase nématique dans laquelle le système va s'ordonner est également caractérisée par un paramètre d'ordre orientationnel :

$$s = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2(\theta) - 1 \rangle \quad (32)$$

L'orientation maximale dans notre cas correspond au cas où toutes les particules sont orientées le long de ce directeur ($\theta = 0^\circ$), ce qui donne un paramètre d'ordre, $s = 1$. Dans le cas de la distribution orientationnelle choisie dans le cadre de la théorie d'Onsager, le paramètre d'ordre nématique obtenu est de $s = 0.79$.

De nombreux travaux vont venir s'appuyer sur cette théorie pionnière afin de la rendre plus précise en incluant certaines caractéristiques de systèmes expérimentaux.

1.2 Extensions de la théorie d'Onsager

L'une des premières extensions vise à s'affranchir du côté rigide du bâtonnet et inclure son caractère flexible à travers la notion de longueur de persistance (P) qui correspond à la longueur typique sur laquelle la particule est capable de maintenir sa forme malgré les déformations provoquées par l'agitation thermique. Elle s'exprime en fonction du module de rigidité de flexion du colloïde (B_S) :

$$P = \frac{B_S}{k_B T} \quad (33)$$

Dans leurs travaux publiés en 1982 [9], Khokhlov et Semenov vont être les premiers à modéliser la transition et sa coexistence en fonction de la flexibilité. Ce modèle, repris par Chen [10] puis Tang et Fraden [11], identifie alors l'évolution de la position de l'isotrope-nématique en fonction du rapport entre la longueur et la longueur de persistance (Figure 3). De manière assez nette, l'augmentation de la flexibilité, et donc la diminution de P , entraîne une déstabilisation de la phase nématique et la transition isotrope-nématique s'en retrouve décalée vers de plus hautes fractions volumiques. Pour des particules complètement rigides (soit $L/P = 0$), les valeurs de la théorie d'Onsager sont bien retrouvées. Il est important de noter également que l'augmentation du ratio L/P s'accompagne d'une diminution du domaine de coexistence entre le liquide isotrope et le nématique [12].

La plupart des systèmes de particules en solutions sont stabilisés par la répulsion électrostatique due à leur charge. Afin d'étudier leur comportement, il convient de tenir compte de l'épaisseur de la double couche électronique, donnée par la longueur de Debye κ^{-1} :

$$\kappa^{-1} = (8\pi l_B N_a I)^{-1/2} \quad (34)$$

avec N_a le nombre d'Avogadro et l_B la longueur de Bjerrum qui traduit la distance entre deux charges à partir de laquelle la répulsion électrostatique devient comparable avec l'agitation thermique (environ 0.7nm dans l'eau à température ambiante). Le paramètre essentiel à la longueur de Debye est la force ionique, I , qui peut être définie par :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (35)$$

où c_i est la concentration molaire de chaque ion mobile présent en solution et z_i sa valence. La force ionique est généralement calculée en tenant en compte uniquement du sel ajouté à l'électrolyte et en négligeant donc les contre-ions des particules.

Stroobants, Odijk, Vroege et Lekkerkerker [8,13,14] vont donc inclure cette caractéristique et s'intéresser à son influence sur la transition isotrope-nématique. Ils vont pour cela intégrer la notion de diamètre effectif (D_{eff}) dans les développements d'Onsager ainsi que l'influence de la répulsion électrostatique sur l'orientation (répulsion qui favorise une orientation perpendiculaire des bâtonnets). Ils vont alors recalculer les concentrations

de coexistence et obtenir que l'augmentation de la force ionique entraîne un rehaussement des fractions volumiques de transition comme montré sur la Figure 3.

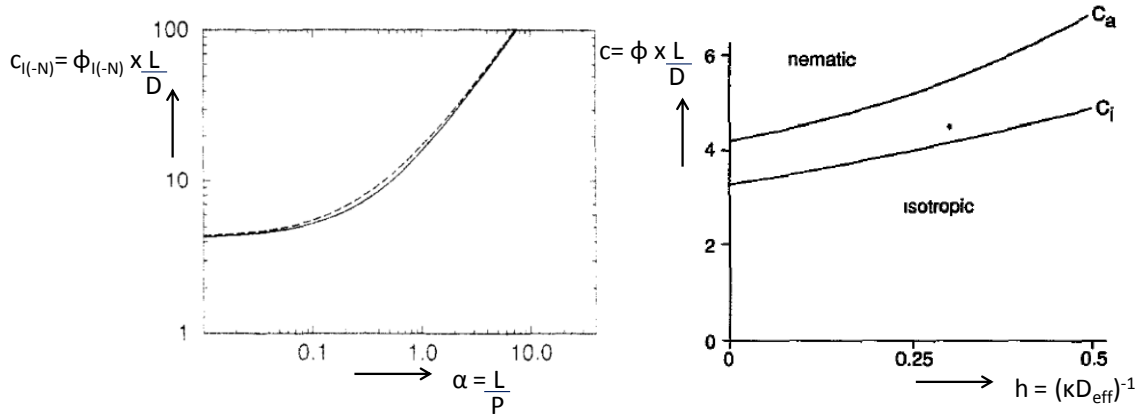


Figure 3: Evolution de la transition isotrope-nématique pour différents systèmes. A gauche, le cas de particules flexibles montrant l'augmentation de la fraction volumique isotrope à la transition ($\Phi_{I(-N)}$) avec le ratio L/P [10]. A droite, le cas de particules chargées pour lesquelles la concentration à l'isotrope-nématique augmente avec la force ionique et le domaine de coexistence s'élargit [8].

Finalement, une approximation implicite à la théorie d'Onsager est la monodispersité du système, bien qu'il évoque, dans les perspectives de sa théorie, la possibilité et la difficulté des calculs pour les cas polydisperses. Plusieurs travaux, par Flory *et al.* [15,16], Lekkerkerker *et al.* [17] et Birshtein *et al.* [18], vont alors s'attacher à intégrer cette notion en se limitant dans un premier temps à des cas bi-disperses pour lesquels ils vont mettre en évidence des phénomènes de démixtion (avec la coexistence entre deux phases nématiques), de fractionnement (les particules les plus courtes restant préférentiellement dans la phase isotrope) et l'élargissement du domaine de coexistence. Ces prédictions vont être retrouvées lorsque la polydispersité du système est prise sous la forme de différentes distributions de taille [19–22] en soulignant toutefois que ces comportements cités plus haut ne sont pas observables pour des distributions de taille trop étroites.

1.3 Transition nématique-smectique

Dans leurs simulations de 1987, Stroobants *et al.* [23] vont dresser un diagramme de phase plus complet pour les systèmes composés de particules en forme de bâtonnets. Ils constatent notamment la présence, pour des fractions volumiques élevées, d'une phase smectique A, correspondant à une organisation en couches des bâtonnets qui conservent un ordre liquide au sein des couches, et d'une phase colonnaire hexagonale, dans laquelle les particules forment des colonnes le long desquelles un ordre liquide est conservé et qui s'organisent dans un réseau hexagonal à deux dimensions (Figure 4).

L'une des premières prédictions de l'existence d'une phase smectique pour des systèmes à répulsion de cœur-dur a été formulée par Hosino *et al.* [24]. Ils identifient alors la transition de la phase nématique et la phase smectique A comme étant une transition du second ordre ou d'un premier ordre faible. Polson et Frenkel [25] montreront par la suite qu'il s'agit uniquement d'une transition du premier ordre.

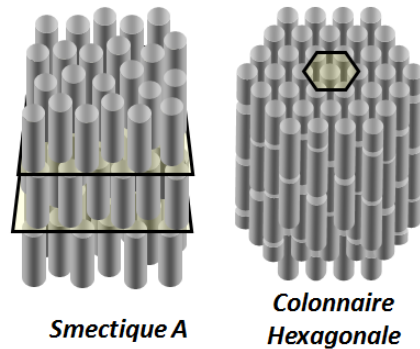


Figure 4 : Représentation schématique des phases smectique A et colonnaire hexagonale.

Plusieurs travaux vont ensuite s'attacher à décrire cette transition de manière plus rigoureuse et montrer qu'en effet, la phase smectique est une mésophase stable pour ce type de système. Frenkel *et al.* [26,27] vont particulièrement viser à se dégager de l'hypothèse des modèles précédents qui fixent au préalable l'orientation des bâtonnets en les pré-considérant parallèles les uns aux autres (soit avec un paramètre d'ordre orientationnel de 1). En laissant libre le degré d'orientation des bâtonnets, ils établissent de nouveau la présence d'une transition d'un nématique vers un smectique. Ils montrent surtout que cette transition est également dominée par l'entropie qui émerge du volume exclu au voisinage des extrémités des particules (Figure 5 à gauche). Poniewierski [28] mentionnera tout de même que la transition s'en trouve décalée vers des fractions volumiques plus denses.

De même que pour la transition isotrope-nématique, un grand intérêt a été porté à l'influence de la flexibilité sur l'apparition de la phase smectique. Tkachenko [29] va notamment montrer que la phase nématique est plus stable dans le cas des colloïdes semi-flexibles. En effet, le possible réarrangement dû à la flexibilité va entraîner la diminution de la taille des zones d'exclusion au voisinage des extrémités des particules et ainsi retarder la transition vers la phase smectique. A ces résultats, confirmés par d'autres travaux [25,30], s'ajoutent également la diminution de la périodicité smectique (celle-ci avoisinant la longueur L de la particule) voire sa disparition lorsque la flexibilité devient trop importante.

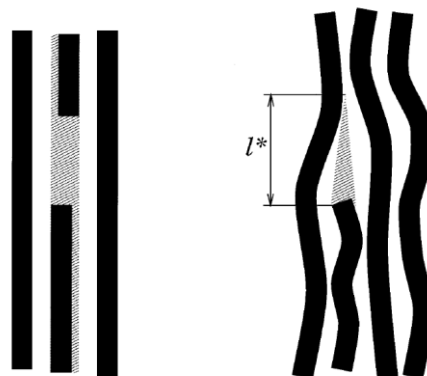


Figure 5 : Illustration du volume exclu (zones hachurées) au voisinage des extrémités des bâtonnets qui dirige la transition nématique-smectique. A gauche est présenté le cas de particules rigides et à droite celui de particules semi-flexibles pour lequel ce volume exclu est réduit [29].

Kramer et Herzfeld [31] proposent également l'évolution des limites de stabilité du diagramme de phase avec la variation de force ionique pour le cas de particules chargées. Ils

observent alors l'augmentation générale des fractions volumiques de transition jusqu'à des valeurs plateaux (correspondant à celles estimées dans les cas de particules non-chargées) ainsi que l'élargissement progressif du domaine de coexistence. Des études ont également été menées par Bates et Frenkel [32] et Bohle et *al.* [33], cette fois sur l'effet de la polydispersité dans les systèmes de colloïdes en forme de bâtonnets, qui suggèrent que la phase smectique disparaît lorsque la distribution en longueur devient trop large.

1.4 Phase colonnaire hexagonale

Bien que son existence soit suggérée par Stroobants *et al.* [23] en 1987, des simulations plus poussées et sur des ensembles de particules plus grands faites par Veerman et Frenkel [34] vont exclure la phase colonnaire hexagonale du diagramme pour une transition directe du smectique à un solide (à l'ordre cristallin hexagonal).

La réapparition de la phase colonnaire hexagonale se fait lorsque le système perd sa monodispersité. Dans le cas bidisperse, présenté par Stroobants [35], le comportement cristal-liquide du mélange est différent du comportement des deux systèmes pris à part. Il montre notamment la présence soit d'une transition smectique-colonnaire, soit d'une transition nématique-colonnaire. Il observe que le deuxième cas est favorisé avec l'augmentation de la bidispersité et que les deux transitions sont quoi qu'il en soit d'un premier ordre peu marqué.

Le même constat est fait avec une polydispersité induite par une distribution de longueur [32,33], avec la présence de la phase colonnaire hexagonale qui n'apparaît que lorsque la polydispersité est suffisante. La phase smectique quant à elle est progressivement supprimée du diagramme de phase pour finalement laisser place à une transition directe du nématique au colonnaire.

Enfin, une phase colonnaire hexagonale est également prédite dans les systèmes de chaînes semi-flexibles. Les travaux de Selinger et Bruinsma [36] et de Hentschke et Herzfeld [37] montrent qu'une diminution de la longueur de persistance favorise l'apparition d'une organisation colonnaire hexagonale.

2. Le virus fd : un système modèle

Dans le vaste paysage des particules en forme de bâtonnets, le virus fd se dégage lorsqu'il s'agit de confronter ces modèles et prédictions théoriques à l'expérience. En effet, sa monodispersité en longueur et diamètre et sa taille colloïdale (permettant sa visualisation à l'échelle de la particule individuelle en microscopie de fluorescence dans le but d'études dynamiques par exemple) en font une référence dans le domaine des cristaux liquides lyotropes [38,39].

2.1 Morphologie du virus

Le virus fd se classe dans la catégorie des bactériophages filamenteux et est le premier à avoir été caractérisé comme tel par Hartmut Hoffman-Berling [40]. Ils font partie des systèmes les plus simples en biologie et ne possèdent qu'une dizaine de gènes tout au plus. Depuis leur découverte, il y a un demi-siècle, un grand intérêt a été porté à la

compréhension de leur structure ainsi qu'à leur application dans divers domaines des bio- et nanotechnologies [40–43].

Le virus fd est composé d'un ADN simple brin à topologie circulaire et fait partie de la classe I des bactériophages. Son génome a été l'un des tous premiers à être séquencé. Il contient 8 gènes et est composé de 6408 nucléotides [40,41] pour la souche sauvage. Ces huit gènes codent principalement pour les protéines composant le corps du virus, dont la structure est donnée ci-dessous.

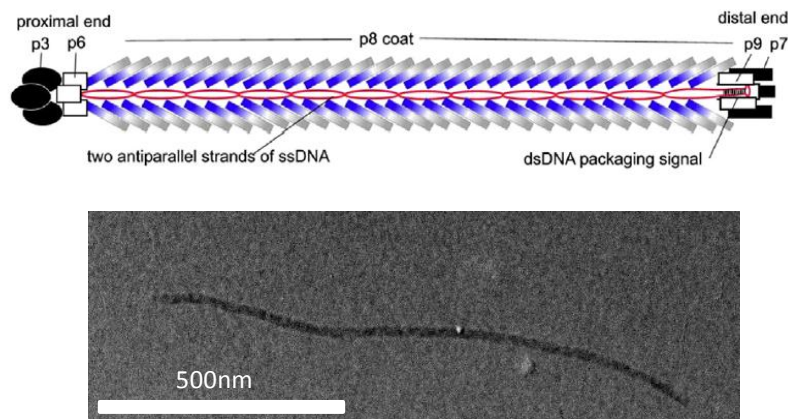


Figure 6 : En haut : structure schématique du virus fd avec en rouge son ADN autour duquel s'enroulent les protéines p8 de manière hélicoïdale. Aux extrémités, sont représentées également les deux couples de protéines, p3/p6 et p9/p7 [40]. En bas : cliché de microscopie électronique d'un virus contrasté par de l'acétate d'uranyle.

Le bactériophage est donc composé de cinq protéines, dont une principale et majoritaire, la protéine p8. Le virus en contient 2700 copies qui recouvrent sa surface de manière hélicoïdale (Figure 6). A ses deux extrémités se trouvent deux couples différents : les protéines p3 et p6 d'un côté et p9 et p7 de l'autre (au nombre de 5 chacune).

La protéine p8 forme une hélice composée de cinquante acides aminés dont uniquement les vingt premiers sont exposés au solvant [40,44], le reste agissant comme une enveloppe hydrophobe protectrice pour l'ADN. Cette partie exposée au milieu extérieur a fait l'objet d'une étude complète par Zimmerman *et al.* [44] montrant que celle-ci présente une charge de 10 e/nm à pH physiologique provenant uniquement d'amines (NH₂) ou d'acides carboxyliques (COOH).

Sa longueur (L) est de 880nm pour un diamètre (D) de 6.6nm et une longueur de persistance (P) de 2800nm [12]. Sa masse molaire (M_w) vaut 1.64 x 10⁷ g/mol et son point isoélectrique vaut 4.3 [12,40,44,45]. Enfin, le virus absorbe dans l'UV, à une longueur d'onde de 269nm, avec un coefficient d'absorption de 3.84 cm²/mg, permettant ainsi une mesure directe de sa concentration en solution par spectrophotométrie [12].

Afin de se répliquer, le virus utilise comme hôte l'*Escherichia coli* (E. Coli) [40–42]. Il a la particularité de n'infecter que les bactéries contenant un F-pilus [42] qui doivent alors être sélectionnées lors de la culture par l'utilisation d'antibiotiques [46]. L'infection se fait par l'adsorption de la protéine p3 sur le pilus de la bactérie. L'ADN est ensuite injecté en son sein et combiné avec une nouvelle protéine, appelée p5, avec laquelle il se complexe empêchant ainsi la production du brin complémentaire. La lecture de l'ADN par les enzymes

bactériennes permet alors la production des protéines nécessaires à l'obtention de nouveaux virions qui sont ensuite assemblés par extrusion lors de leur expulsion de la membrane bactérienne (Figure 7) [40–42].

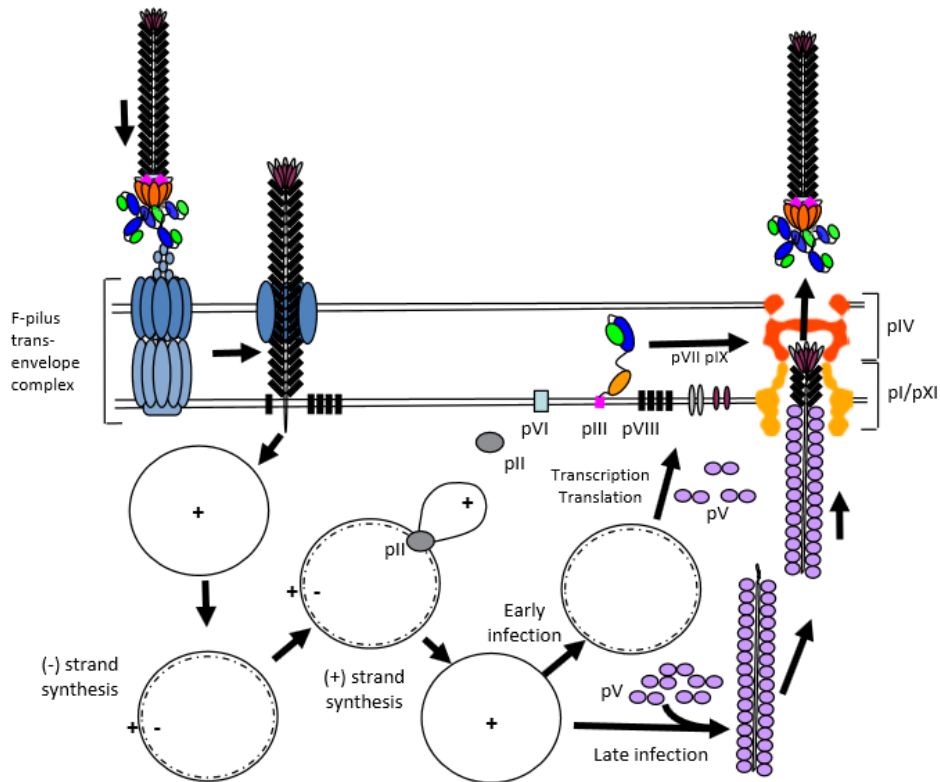


Figure 7 : Représentation schématique du cycle d'infection d'une bactérie par un bactériophage. De gauche à droite, le virus infecte la bactérie par l'accroche de la protéine p3 sur le F-pilus. L'ADN est ensuite injecté puis répliqué puis la bactérie reprogrammée pour la production des protéines composant les nouveaux phages. Ces derniers sont alors assemblés par extrusion à la membrane et sont expulsés de la bactérie hôte [47].

2.2 Les mutants du virus fd

Du fait de sa nature biologique, le virus fd, et plus particulièrement son ADN, peut subir des altérations qui vont avoir pour effet d'aboutir à des mutants du bactériophage. Certains d'entre eux se révèlent intéressants dans le cadre de l'étude des phénomènes d'auto-organisation.

Le premier est le M13 qui diffère simplement par un acide-aminé, l'acide aspartique en position 12 de la p8 du fd étant substitué par l'asparagine sur la p8 du M13 [48]. Cette substitution est répétée sur l'ensemble des 2700 copies qui forment le corps du virus. De manière globale, les caractéristiques principales, à savoir longueur, diamètre et longueur de persistance ne sont pas modifiées [48]. La masse molaire des deux acides aminés étant très proche, le poids moléculaire n'est également pas modifié [48]. Cependant, l'acide aspartique étant chargé, au contraire de l'asparagine qui est un acide-aminé neutre. La substitution s'effectuant en position 12 qui est une position exposée au solvant, la charge du virus va être impactée. Elle diminue d'environ 30% et tombe à 7 e/nm à pH physiologique [48].

Sur le même principe, le fd-Y21M diffère également par un unique acide aminé, la tyrosine en 21^{ème} position étant remplacée par une méthionine sur la protéine p8 [49]. Cette substitution, faite sur un acide aminé du "cœur" de la protéine (i.e. non exposé au solvant), est transférée à l'ensemble des 2700 copies recouvrant le virus et va avoir plusieurs effets sur la morphologie du virus. Dans un premier temps, sa longueur va augmenter à 920nm [45] ainsi que sa longueur de persistance qui vaut alors 9900nm [12], ce qui en fait un bâtonnet quasi-rigide ($L/P < 0.1$). Son poids moléculaire est également légèrement modifié et vaut 1.63×10^7 g/mol. L'absorption du virus dans l'UV est également modifiée et est de $3.63 \text{ cm}^2/\text{mg}$ à 269nm [12].

Enfin, isolé par New-England Biolabs par *phage display*, le M13-C7C est un mutant un peu plus particulier [50–52]. La mutation de l'ADN va en effet permettre l'expression sur la protéine p3 d'une séquence courte d'acides aminés aléatoires pouvant servir de ligands pour un grand nombre de cibles [52]. La mutation "C7C" contient en plus deux cystéines qui forment une structure cyclique favorisant sa stabilité (Figure 8). Notre principal intérêt dans cette mutation est l'unicité de la cystéine qui n'est pas un acide aminé exposé au solvant sur le reste du virus [44] et qui est le seul à contenir une fonction thiol (SH). L'apparition de ce nouveau groupe réactif sur le virus va permettre d'envisager une fonctionnalisation dite "régio-sélective" [50,51]. La longueur du virus est modifiée par cette mutation ($L = 1.015 \mu\text{m}$, mesurée sur une population de 100 virus individuels) ainsi que son poids moléculaire (1.89×10^7 g/mol, calculé à partir du ratio de longueur du M13-C7C et du fd-wt). Enfin, il est à noter que la modification de ce virus se porte sur la protéine p3, qui est la protéine permettant l'accroche du virus sur la bactérie pour l'infecter, mais que la longueur de la séquence (14 acides aminés) est suffisamment courte pour ne pas affecter de manière significative les rendements de production.



Figure 8 : Structure du mutant M13-C7C avec la séquence d'acides aminés insérée sur la protéine p3. Le X₇ correspond à une série aléatoire de 7 acides aminés séparant les deux cystéines (C) liées de manière cyclique [52].

La distinction des différentes souches peut se faire tout d'abord lors de la détermination du pfu/ml (plaque-forming unit) d'une solution de virus. Cette quantité permet de connaître le nombre de phages infectieux en solution et se mesure en effectuant une titration sur des plaques de LB/Agar puis en comptant le nombre de colonies bactériennes infectées (visibles par leur retard de croissance - Figure 9) [46,52]. Lors de cette titration, il est possible d'ajouter un marqueur, par la combinaison des deux molécules : XGal/IPTG, qui va ainsi colorer en bleu toutes les plaques infectées par un phage contenant un gène bien spécifique, le gène *LacZ* (Figure 9) [46,52]. Dans les exemples de mutants présentés au-dessus, ce gène n'est présent que dans l'ADN du M13-C7C et cette méthode va donc permettre à la fois de le distinguer des autres mais également de vérifier la pureté des solutions. Néanmoins, il est à noter que le gène *LacZ* n'est pas exclusif au M13-C7C, mais que d'autres mutants (tels que le M13-mp18, M13-mp19, M13-KE,...) le possèdent et que cette méthode ne permet donc pas de les discriminer.

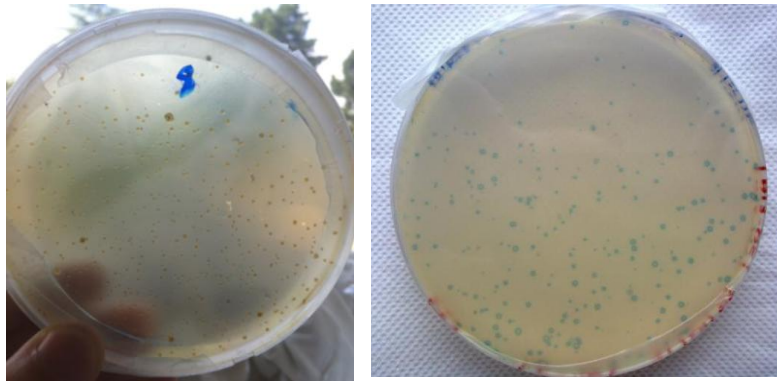


Figure 9 : Plaques de retard de croissance bactérienne. A gauche, résultat pour une souche sauvage avec des plaques blanches, et à droite, résultat pour un mutant possédant le gène LacZ, avec des plaques colorées en bleu.

Même si cette méthode ne permet pas de faire de distinction entre les autres souches (fd, M13 et fd-Y21M), des méthodes plus physiques permettent de le faire de manière relativement simple et efficace. Ainsi, le fd-Y21M et le fd ayant des longueurs différentes, une mesure statistique en MET (Microscopie Electronique à Transmission) permet de les distinguer [45], et le M13 et le fd ayant une charge différente, leur identification est possible par électrophorèse sur gel d'agarose [48].

Néanmoins, la manière la plus efficace et la moins équivoque de distinguer les souches les unes des autres est le séquençage de leur ADN et l'identification de la présence, ou non, des différentes mutations.

2.3 Le diagramme de phase cristal-liquide du virus fd

Les caractéristiques du virus fd étant bien connues, celui-ci est devenu assez rapidement un objet privilégié dans l'objectif de comparer les modèles et prédictions théoriques établis pour l'auto-organisation d'un système de bâtonnets avec un système expérimental. Son caractère semi-flexible, la variation de charge ou de flexibilité présente dans le cas de certains mutants, ouvrent également la possibilité d'une vaste confrontation entre théorie et expérience [38,53].

2.3.a) La phase cholestérique

La première étude du diagramme de phase cristal-liquide du virus fd et la première observation d'une transition isotrope-nématique dans ce système a été faite par Lapointe et Marvin en 1973 [54]. Pour des solutions concentrées en phages (aux alentours de 15 mg/ml), ils vont alors mettre en évidence une séparation entre deux phases, dont l'une est biréfringente (nématique) et l'autre pas (liquide isotrope) (Figure 1).

La phase qu'ils observent n'est en fait pas une phase nématique au sens strict (pour laquelle les particules s'orientent préférentiellement suivant un directeur) mais une phase nématique chirale ou cholestérique dans laquelle le directeur nématique va tourner selon une hélice qui se dessine autour d'un axe. Cette phase est notamment caractérisée par son pas, correspondant à la période nécessaire à une rotation complète de 360° du directeur suivant l'axe de son hélice, ainsi que son hélicité, à savoir si le directeur tourne vers la gauche ou la droite (Figure 10).

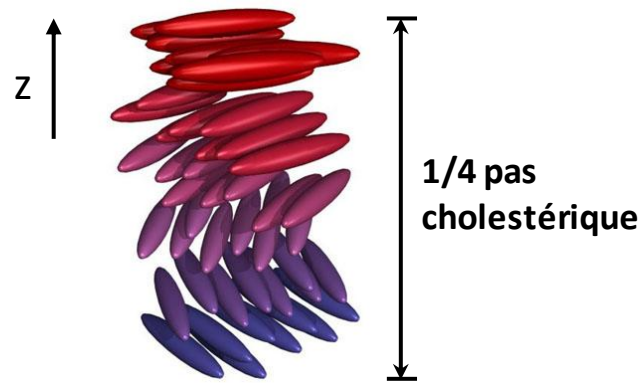


Figure 10: Illustration de la phase cholestérique (hélicité gauche) et de son pas caractéristique.

Les caractéristiques de cette phase chirale-nématique ont été explorées plus en détail par Dogic et Fraden [55]. Ils retrouvent ainsi une texture typique "d'empreinte digitale" dont ils sont capables de mesurer le pas (représenté par P_0 sur la Figure 11). Ils focalisent principalement leur étude sur l'évolution de ce pas cholestérique en fonction de trois paramètres : la concentration en virus (c), la force ionique (I) et la température (T).

La valeur du pas cholestérique diminue de manière continue avec la concentration en suivant empiriquement une loi de puissance : $P_0 \propto c^\nu$. Il est à noter que le facteur ν n'est que très peu influencé par la force ionique, la souche du virus ou la modification de sa surface (Figure 11) [12,55–57].

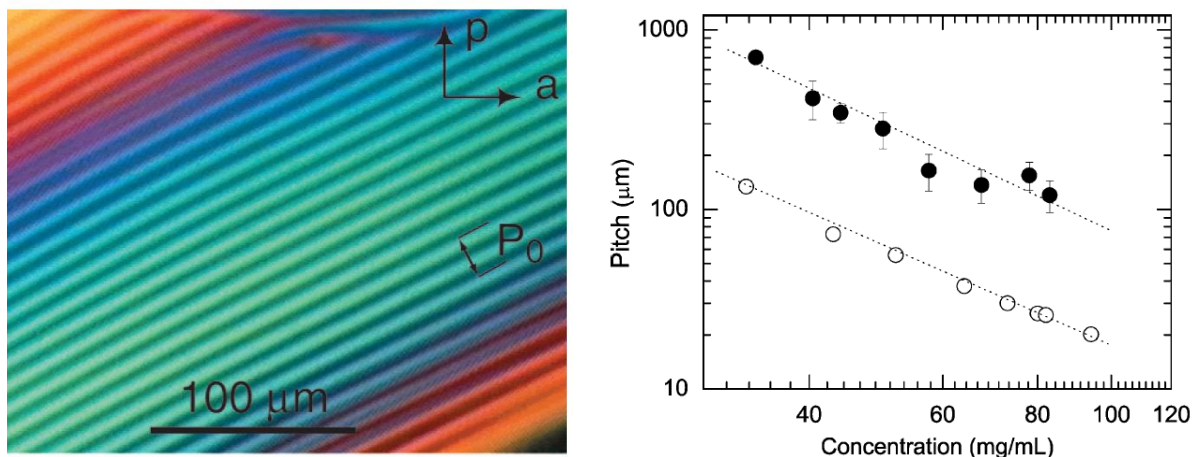


Figure 11 : Texture "d'empreinte digitale" caractéristique de la phase cholestérique [55] et mesure du pas en fonction de la concentration en virus pour une force ionique pour le fd-wt (cercles vides) et le fd-Y21M (cercles pleins) à une force ionique $I = 110$ mM [12].

Bien que les phages soient des particules chirales (à plusieurs niveaux comprenant l'arrangement asymétrique des C_α des acides aminés, la structure en hélice α de la protéine et son arrangement hélicoïdal autour de l'ADN du virus), l'origine de cette phase cholestérique dans les suspensions de virus soulève la question de la transmission et de l'amplification de la chiralité. En particulier, Grelet et Fraden [56] vont s'intéresser à la comparaison entre le système de virus nus et un système de virus complètement recouverts d'un polymère neutre (le PolyEthylene Glycol (PEG)) masquant ainsi la charge des particules. De manière assez surprenante, ils vont observer que le système stabilisé par des polymères

présente également une phase cholestérique et que le pas de celle-ci n'est pas indépendant de la force ionique.

Le modèle le plus simple présentant l'apparition d'une torsion hélicoïdale entre particules a été proposé par Straley [58] en étendant la théorie d'Onsager aux hélices dures et en ne prenant en compte que des interactions de volume exclu (Figure 12). Il prédit alors un pas cholestérique indépendant de la concentration, ce qui n'est pas retrouvé expérimentalement, et un tel modèle ne permet pas non plus d'expliquer la dépendance de P_0 avec la force ionique dans les systèmes fd-PEG.

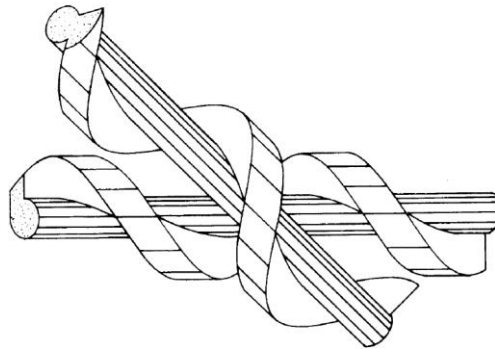


Figure 12 : Approche de deux hélices dures dans le modèle de Straley [58].

Dans ce modèle, repris dans des travaux plus récents [59] l'un des paramètres principaux gouvernant l'hélicité d'un assemblage d'hélices dures est l'angle d'inclinaison φ d'une hélice individuelle (illustré dans le cas du virus en Figure 13). Cette dépendance se traduit par un angle critique φ_0 , de 45° [60,61], en dessous duquel l'hélicité de la particule sera conservée et transmise à la phase chirale mais sera inversée pour des angles supérieurs.

Dans le cas des bactériophages fd ou M13, l'arrangement hélicoïdal des protéines du manteau donne lieu à un angle d'inclinaison de 41° [60]. L'hélicité de la particule étant droite, l'observation d'une phase cholestérique d'hélicité gauche (Figure 13 et Figure 14) confirme l'échec d'un modèle purement stérique dans l'explication de l'origine de la chiralité dans les suspensions de virus.

De manière quantitative, la valeur du pas et le sens de l'hélice reposent sur la compétition entre les forces élastiques et de torsion. Cette compétition peut se formuler avec le rapport suivant :

$$P_0 = 2\pi \frac{K_{22}}{K_t} \quad (36)$$

où K_{22} est la constante représentant la force élastique de torsion, K_t celle représentant la "force chirale", i.e. la capacité intrinsèque d'un système à se déformer sous l'impulsion d'interactions chirales entre particules, et P_0 la valeur du pas dont le signe détermine l'hélicité de l'arrangement final (gauche ou droite).

Comme suggéré par Tombolato *et al.* [60,62], les propriétés de la phase cholestérique sont aussi le résultat de plusieurs contributions à la chiralité, et notamment une stérique ($K_t^{st.}$) et l'autre électrostatique ($K_t^{él.}$). En associant cet arrangement hélicoïdal de protéines avec une distribution de charges elle-même hélicoïdale (Figure 13), Tombolato *et*

al. [60] vont alors mettre en évidence la contribution électrostatique à la constante totale de torsion K_t , et surtout son caractère antagoniste avec la contribution stérique. En effet, le rapprochement de charges de même signe maximise la répulsion électrostatique dans les configurations favorisées de manière stérique. Cette contribution électrostatique étant largement supérieure à son homologue stérique, l'arrangement de la phase cholestérique finale se fait donc avec une hélicité opposée à celle du virus seul.

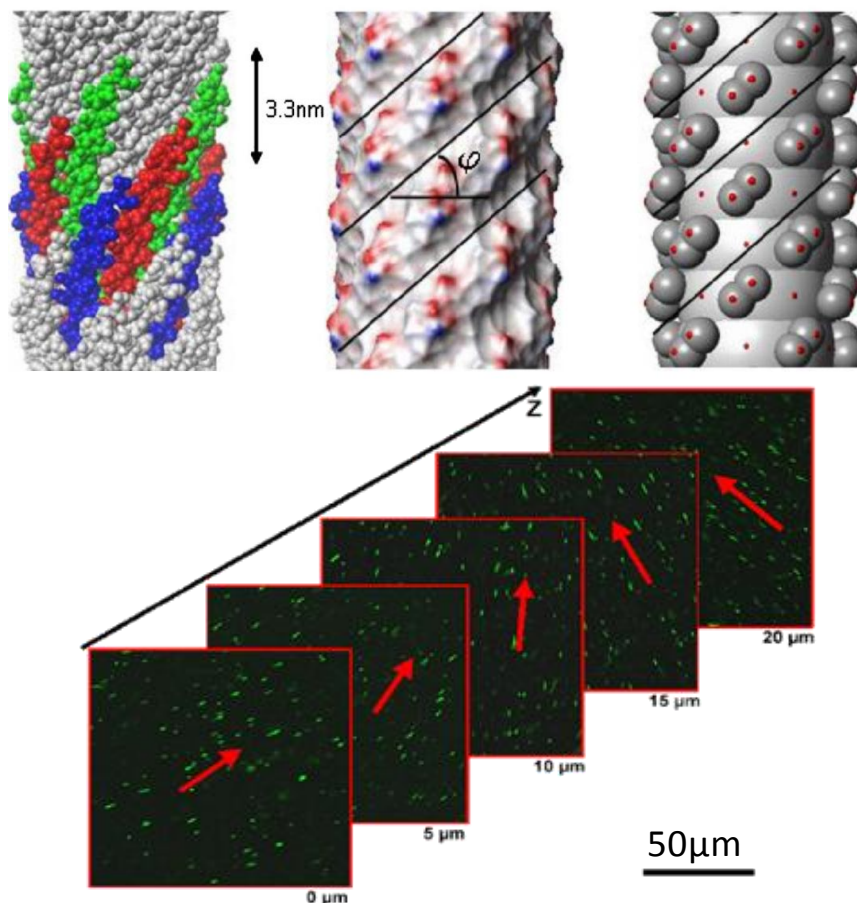


Figure 13 : En haut : modélisation de l'arrangement hélicoïdal des protéines sur le virus. A gauche, une représentation de tous les atomes avec les protéines individuelles surlignées de couleurs différentes. Au centre, un représentation électrostatique, le bleu correspondant à un potentiel négatif et le rouge positif. A droite, la modélisation à grains grossiers de la surface du virus, les points rouges représentant les charges ponctuelles négatives. En bas, l'illustration de l'hélicité gauche de la phase cholestérique du M13 observée en microscopie confocale de fluorescence (1 virus sur 100 000 ayant été fonctionnalisés par des marqueurs fluorescents) [60].

L'histoire de l'origine de la chiralité dans les suspensions de virus ne se limite cependant pas uniquement à une compétition entre contributions stérique et électrostatique. La phase cholestérique du fd-Y21M observée par Barry *et al.* [12] (Figure 14) présente en effet une hélicité droite, opposée à celle du virus fd et un pas environ cinq fois plus important (Figure 11). Les deux virus ne diffèrent que d'un acide aminé impactant principalement sur la morphologie du virus (longueur et longueur de persistance) et donc sur l'arrangement hélicoïdale à la fois des protéines et des charges.

Même si ces modifications de structure pourraient suffire à expliquer le changement d'hélicité de la phase cholestérique, il est possible également de le voir comme l'influence d'un autre type d'interactions chirales entre particules venant de la flexibilité du virus.

Comme suggéré dans les travaux de Grelet et Fraden [56], il est possible d'imaginer un modèle dans lequel de manière dynamique se crée une hélice supramoléculaire reposant sur le couplage entre la flexibilité et la chiralité de la particule faisant tourner le virus préférentiellement dans un sens et lui donnant ainsi une forme en "tire-bouchon" (Figure 15).

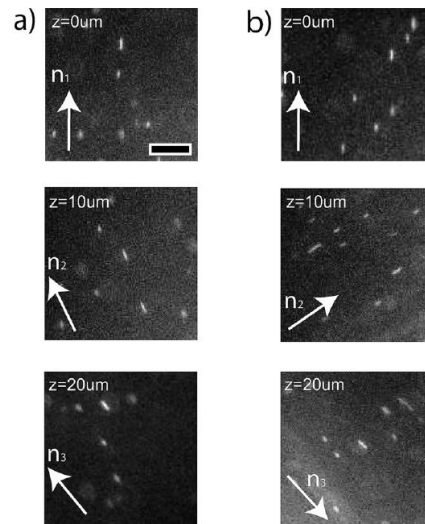


Figure 14 : Hélicité des phases cholestériques du fd-Y21M (a) et du fd (b) (barre d'échelle : 5 μ m). Les images sont les observations à la caméra et montrent une hélicité opposée à l'hélicité réelle du fait d'un nombre impair de miroirs dans le dispositif optique utilisé [12].

La flexibilité variant de manière significative entre le fd et le fd-Y21M pourrait alors également contribuer au changement d'hélicité entre les deux phases cholestériques. De plus, la longueur de persistance étant dépendante de la force ionique [63,64], l'ajout de cette contribution fournit donc une explication qualitative à l'influence de la force ionique sur la variation du pas cholestérique et notamment dans le cas où le virus est stabilisé de manière stérique par des polymères [56] bien qu'un modèle quantitatif reste à faire afin de valider cette hypothèse.

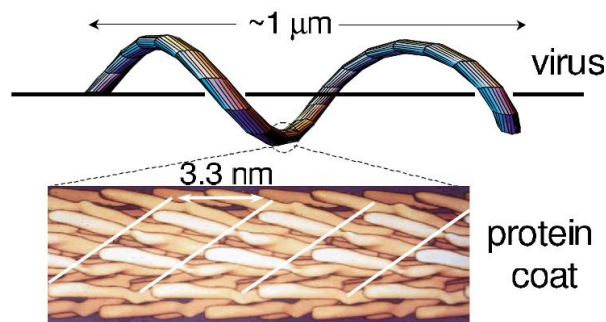


Figure 15 : Illustration de la déformation du virus en forme de "tire-bouchon" [56].

2.3.b) Transition isotrope-cholestérique

La première étude de la transition est faite par Tang et Fraden [65] qui s'intéressent particulièrement à l'influence de la force ionique. Les mesures faites dans le groupe de Fraden permettent alors de déterminer les concentrations de coexistence entre les phases

isotrope et cholestérique pour différentes forces ioniques (Figure 16) ainsi qu'une dépendance avec la température qui peut être attribuée aux variations de flexibilité du virus [11].

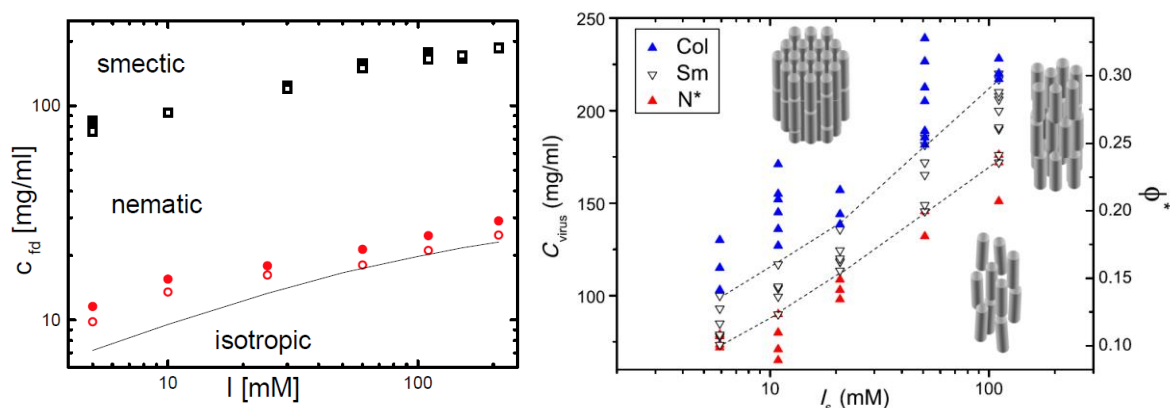


Figure 16 : A gauche : coexistence de phase entre les phases liquide isotrope et cholestérique (cercles) et entre les phases cholestérique et smectique (carrés) en fonction de la force ionique (sel ajouté) [66]. La ligne continue représente la prédiction théorique issue des travaux de Chen [10] pour un rapport L/P correspondant au fd. Le diamètre effectif (D_{eff}) variant avec la force ionique est calculé selon la description faite par Stroobants et al. [13] en résolvant l'équation non-linéaire de Poisson-Boltzman de manière numérique en utilisant les approximations développées par Philip et Wooding [67] ($\Phi \propto D_{eff} / L$). A droite : diagramme de phase expérimental des phases denses montrant les transitions de phase nématique-smectique et smectique-colonnaire en fonction de la force ionique [53].

Ces mesures, reprises et affinées dans plusieurs travaux [38,48,66,68], peuvent être comparées de manière quantitative avec la théorie d'Onsager en prenant en compte notamment la flexibilité (ratio L/P) et la notion de diamètre effectif (D_{eff}) variable avec la force ionique [10]. Comme montré sur la Figure 16, l'accord est seulement semi-quantitatif, et de nettes divergences sont observables principalement à faible force ionique où la condensation des ions autour de la particule joue un rôle prépondérant et doit faire l'objet d'une renormalisation dans le calcul de la force ionique [53]. Purdy et Fraden vont également montrer que la densité surfacique de charge du virus influe de manière négligeable sur la transition en effectuant la comparaison entre le M13 et le fd à différents pH [48], confirmant ainsi la renormalisation de la charge (condensation de Manning) de ces poly-électrolytes biologiques hautement chargés.

La flexibilité de la particule en revanche influe de manière significative sur les concentrations de transition entre l'isotrope et le cholestérique. En utilisant différents mutants du M13 de longueur variable, il est possible de constater que la diminution du rapport L/P (et donc de la flexibilité) entraîne une diminution des concentrations de coexistence [48]. Ce constat est confirmé par Barry *et al.* [12] lorsqu'ils comparent l'isotrope-cholestérique du fd-Y21M et du fd. Pour une même force ionique ($I = 110$ mM), le domaine de coexistence passe de 19.8-22.6 mg/ml dans le cas du fd à 13.9-18.9 mg/ml pour le fd-Y21M, plus rigide. Au-delà de cette diminution dans les concentrations à l'isotrope-cholestérique, l'augmentation de la rigidité s'accompagne également d'un élargissement du domaine de coexistence.

2.3.c) Phase smectique et transition cholestérique-smectique

La première observation de la phase smectique est également faite par Lapointe et Marvin [54] qui vont seulement relater ses propriétés sans l'identifier formellement. Ils mentionnent ainsi les deux caractéristiques principales de la phase : l'observation d'une périodicité d'environ $1 \mu\text{m}$ (qu'ils qualifient toujours de pas cholestérique) et la décomposition de la lumière blanche par l'échantillon (Figure 17).

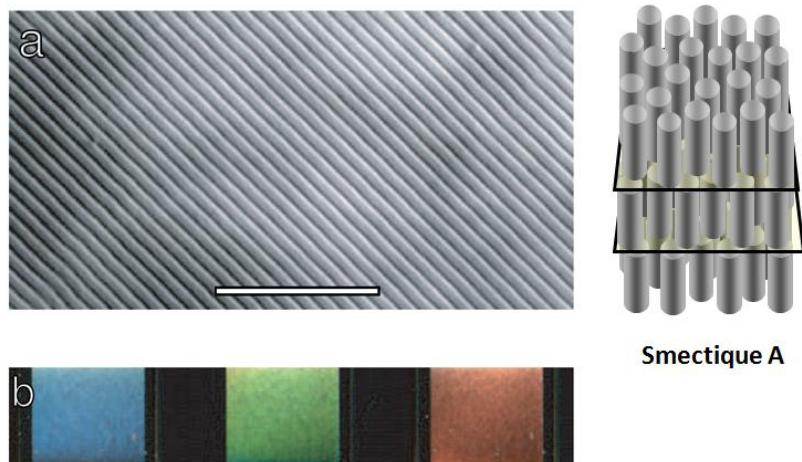


Figure 17 : (a) Image de microscopie à contraste interférentielle montrant les couches smectiques (échelle : $10\mu\text{m}$) et représentation schématique de l'arrangement des bâtonnets dans les couches. (b) Illustration de la décomposition de la lumière blanche par la phase smectique. Chaque image correspond à un angle d'illumination différent, changeant ainsi les conditions de Bragg, et l'échantillon apparaît alors d'une couleur différente [38].

Dogic et Fraden puis Purdy et Fraden vont présenter une étude plus complète de la phase smectique et de la transition en fonction de la charge et de la flexibilité [69,70]. De manière plus précise, ils mesurent la périodicité smectique du fd qui est de 920 nm , très proche de la longueur du virus (880 nm) et les concentrations de coexistence entre les deux phases (Figure 16). La transition s'avère être du premier ordre mais leur renormalisation, prenant en compte un diamètre effectif et le caractère semi-flexible de la particule, ne trouve pas d'accord quantitatif avec les prédictions théoriques. Ils attribuent notamment cette différence à une importance sous-estimée du caractère semi-flexible, puisque ce décalage de la transition vers de plus hautes fractions volumiques et la diminution de la périodicité smectique avec la flexibilité ont été rapportés dans plusieurs modèles [25,29,30].

Afin de trouver un meilleur accord avec les modélisations, Grelet propose une réévaluation du diamètre effectif prenant en compte la condensation des ions qu'il estime par divers modèles quantitatifs [53]. De cette manière, il trouve cette fois un bon accord quantitatif entre théorie et expérience. Il souligne également l'importance de la flexibilité en faisant notamment la comparaison entre le fd et le fd-Y21M. Il montre ainsi une diminution de la fraction volumique effective à la transition pour le fd-Y21M, plus rigide, ainsi qu'un domaine smectique plus large. Ces observations s'accordent donc avec l'idée générale de la déstabilisation de la phase smectique, au profit du nématique, avec l'introduction de la flexibilité [29].

2.3.d) Ordre hexagonal des phases denses

De la même manière que Lapointe et Marvin avec le smectique, Dogic et Fraden observent à très haute fraction volumique une transition vers une phase qu'ils qualifient de "désordonnée" [69]. La nature de cette phase sera explicitée par Grelet qui va l'identifier comme une phase colonnaire hexagonale [71] puis s'intéresser à la transition avec la phase smectique (Figure 16) [53].

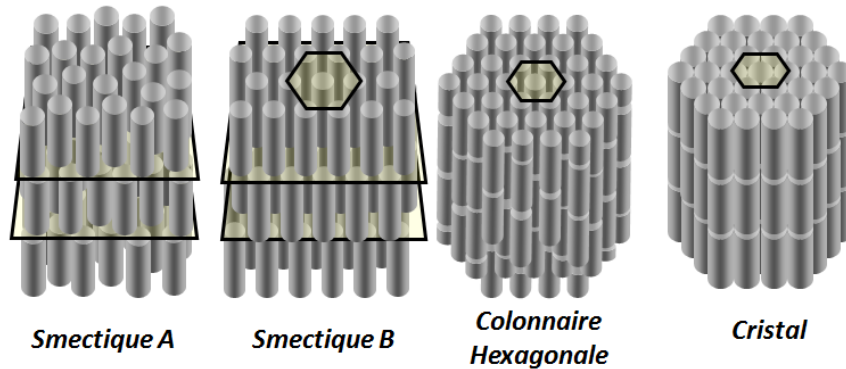


Figure 18 : Représentation schématique des mésophases denses observées dans le système du virus fd [53,71]. La fraction volumique augmente de la gauche vers la droite.

La phase colonnaire hexagonale correspond à une organisation des bâtonnets en colonnes le long desquelles un ordre liquide est conservé. Ces colonnes quant à elles adoptent une structure donnant aux virus un ordre positionnel hexagonal à deux dimensions (Figure 18). D'après les modèles et prédictions théoriques, l'apparition d'une telle phase est reliée à l'introduction de polydispersité dans le système [32,33,35]. Cette polydispersité émerge probablement des variations du diamètre des phages du fait de leur caractère semi-flexible [71].

L'ordre positionnel hexagonal mis en évidence dans cette phase est à vrai dire à courte portée ce qui suggère un ordre plus hexatique que parfaitement hexagonal [71]. L'apparition d'une telle structure est directement liée à la présence de défauts topologiques liés à la compétition entre l'ordre hexagonal et une force de torsion due à la chiralité des particules. Pour des fractions volumiques très importantes, le système forme une phase cristalline (Figure 18) dans laquelle on retrouve un ordre translationnel le long des virus [71].

Il est à noter également que l'on retrouve deux types d'organisation pour la phase smectique (Figure 18). La transition avec le cholestérique se fait avec une phase smectique A pour laquelle les particules dans les couches sont simplement orientées parallèles les unes aux autres et un ordre liquide est conservé à l'intérieur des couches. Avant la transition avec le colonnaire hexagonal, une phase smectique B intermédiaire est observée pour laquelle en plus de l'organisation en couches propre au smectique, un ordre hexagonal à l'intérieur de celles-ci apparaît. Cette phase, proche de la phase cristalline, s'en distingue par l'absence de corrélation de l'organisation hexagonale entre les couches (corrélation présente dans le cas du cristal) [53].

Il est à noter, à la vue de ces résultats expérimentaux obtenus récemment, que l'ensemble de ces mésophases denses mériteraient des investigations théoriques et des

simulations numériques plus poussées afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu dans leur formation.

3. Bio-fonctionnalisation

Comme explicité précédemment, les virus sont composés de protéines en partie exposées au solvant qui vont offrir un grand nombre de fonctions accessibles et réactives [44]. L'identification des acides aminés ionisables [44] va permettre d'optimiser les conditions afin de venir y greffer des groupes fonctionnels.

3.1 Chimie des amines

Les protéines du virus sont des séquences d'acides aminés qui, comme leur nom l'indique, sont notamment composés d'amines. Le virus fd et ses mutants peuvent donc être vus comme des bâtonnets recouverts de fonction NH_2 . La réactivité de ces fonctions dépend principalement du pK_a de chaque acide aminé et donc du pH de la solution, la forme protonée (NH_3^+) étant non-réactive. Le détail des acides aminés ionisables de la protéine p8 et de leurs constantes acido-basiques est donné dans les travaux de Zimmerman *et al.* [44] et ceux exposés au solvant sont reportés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Nature, nombre et constante acido-basique des acides aminés ionisables présents et exposés au solvant pour la protéine p8 [44].

Acide aminé	pKa	Nombre
<i>Lysine</i>	10.1	1
<i>Acide Glutamique</i>	4.5	2
<i>Acide Aspartique</i>	4.5	3
<i>NH₂ terminal</i>	7.9	1

3.1.a) N-hydroxysuccinimide ester

Afin de créer une liaison stable pour greffer des groupes fonctionnels, l'agent le plus communément utilisé est le N-hydroxysuccinimide ester (NHS ester). Par une réaction de transamidification, présentée en Figure 19, il se forme alors une liaison amide stable.

Afin que cette réaction se réalise, plusieurs considérations sont à prendre en compte. Le choix du milieu dans lequel elle se fait est l'élément central de sa réussite. Premièrement, et de manière assez évidente, celui-ci ne doit pas contenir d'amines libres, ce qui exclut tous les tampons tels que le TRIS [72].

Ensuite, l'une des clés de la réaction est l'optimisation du pH de la solution tampon. Afin de maximiser le nombre d'amines primaires disponibles sur le corps du virus, l'idéal serait de se placer aux alentours voire au dessus des pK_a des acides aminés des protéines concernées (ici la Lysine et le NH_2 terminal), soit aux alentours de 9 [44,73]. Le groupement NHS ester est cependant instable en solution et soumis à hydrolyse qui le rend non-réactif [73,74]. Au-delà de pH 8, l'hydrolyse devient très rapide et la stabilité de la fonction ne dépasse pas quelques dizaines de minutes [74]. Un compromis doit alors être trouvé

entre une présence suffisante d'amines primaires sur le virus et la maximisation du temps de demi-vie de l'hydrolyse du NHS ester. Ce pH intermédiaire est le plus souvent choisi à 7.8.

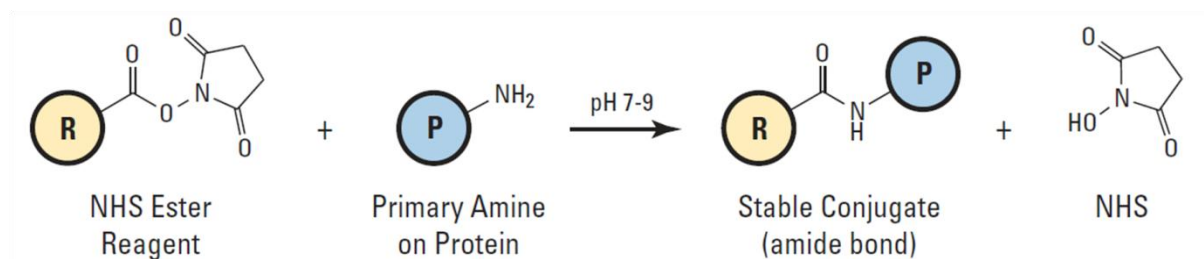


Figure 19 : Schéma réactionnel de la fonctionnalisation de l'amine d'une protéine du virus par un NHS ester [75].

L'option la plus courante dans la nature du tampon est celle du phosphate (PBS – couple $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$), qui ne présente pas d'amines et dont le pK_a est de 7.2 (en faisant attention que celui-ci est dépendant de la force ionique totale) [76]. La force ionique est ajustée par ajout de chlorure de sodium (NaCl) et choisie élevée afin de minimiser la longueur de Debye et donc la taille du nuage électronique entourant chaque virus ($I = 350$ mM). Ce paramètre est à ajuster en fonction notamment de la solubilité du composé à greffer.

La fonctionnalisation des amines par le NHS ester reste l'une des méthodes les plus faciles à mettre en œuvre. Elle présente néanmoins l'inconvénient de la stabilité limitée de la fonction qui s'hydrolyse rapidement (temps de demi-vie d'environ 1h à pH 7.8 [74]) et donc de la compétition avec le nombre d'amines réactives présentes sur le virus. Son efficacité repose sur la rapidité de la diffusion du groupe fonctionnel vers les amines disponibles et est donc relativement bonne pour des composés moléculaires ou des polymères de faible poids moléculaire. Une autre limitation, notamment dans le cas de polymères, est l'insertion du NHS ester en tant que fonction terminale nécessitant dans certains cas une synthèse particulière qui peut être difficile à mettre en œuvre.

3.1.b) Alternatives : isothiocyanate et tétrafluorophenyl ester

Une alternative commune au NHS ester est l'utilisation de composés activés par des isothiocyanates ou des tétrafluorophenyl (TFP) esters (Figure 20) qui sont des groupements retrouvés fréquemment sur les chromophores commerciaux.

Leur principal avantage vis-à-vis du NHS ester est leur stabilité accrue à pH alcalin, permettant ainsi d'effectuer la réaction à un pH de 9. Dans ces conditions, le nombre d'amines primaires est maximisé et donc la réactivité des virus envers ce types de composés augmentée. Le tampon utilisé est toujours un tampon ne contenant pas d'amines, et dans ces conditions, le plus adapté est le bicarbonate de sodium (couple $\text{HCO}_3^{2-}/\text{H}_2\text{CO}_3^-$) dont le pK_a vaut 10.3, toujours à force ionique élevée.

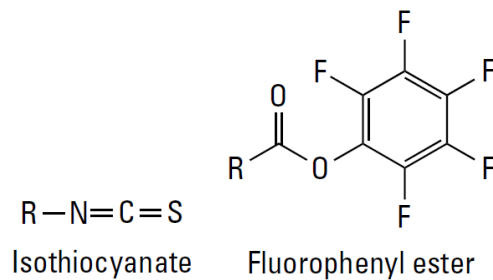


Figure 20 : Structure chimique des groupements isothiocyanates et TFP esters [75].

3.2 Chimie des thiols

Bien que de manière générale les acides aminés des virus exposés au solvant ne sont composés que d'amines et d'acides carboxyliques, le M13-C7C se distinguent par l'introduction à travers une mutation du génome d'une séquence à l'extrémité de la protéine p3 contenant deux cystéines. La cystéine est un acide aminé singulier puisqu'il est le seul à contenir une fonction thiol, susceptible d'être conjuguée chimiquement.

3.2.a) Réduction du pont disulfure

L'introduction de deux cystéines mène à la création d'un pont disulfure (S-S) les reliant entre elles et qui favorise la stabilité de la séquence mais qui les rend non-réactives pour la fonctionnalisation en tant que telles. Au préalable de toute réaction, il faut donc procéder à la réduction de ces ponts afin d'exposer deux groupements thiols au solvant.

De nombreux composés sont utilisables dans cette optique. Les plus courants sont le dithiothréitol (DTT), le 2-mercaptoethanol (2-ME) ou le Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Ce dernier, le TCEP, présente notamment l'avantage de ne pas contenir de thiols dans sa structure et donc de limiter les problèmes de contaminations avec la présence de thiols libres en solution.

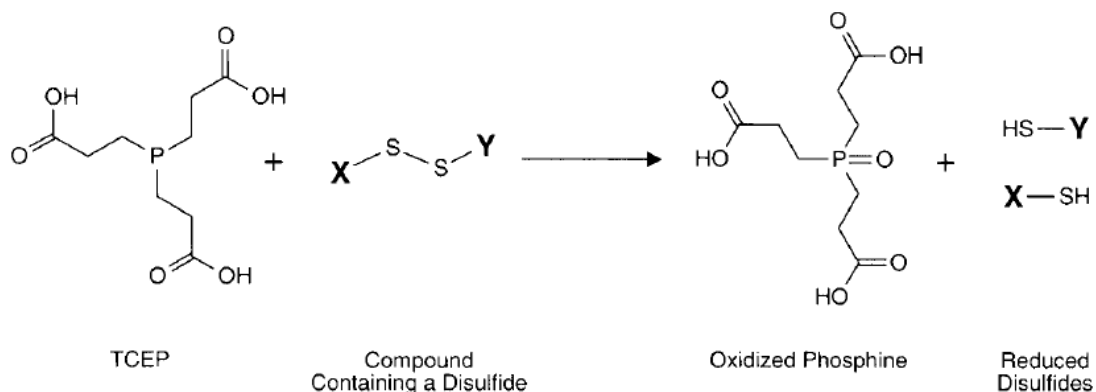


Figure 21 : Réduction d'un pont disulfure par le TCEP [72].

Cette réduction se fait suivant le schéma réactionnel présenté en Figure 21 et en présence d'une concentration allant de 1 mM [77] à plusieurs dizaines de mM [72] en agent réducteur.

3.2.b) Maléimides

Une fois les ponts disulfures brisés, la manière la plus courante de venir greffer des composés sur les thiols est d'utiliser des groupements activés par un maléimide. La double liaison présente sur celui-ci va pouvoir subir une alkylation avec le thiol afin de créer une liaison thioether stable (Figure 22).

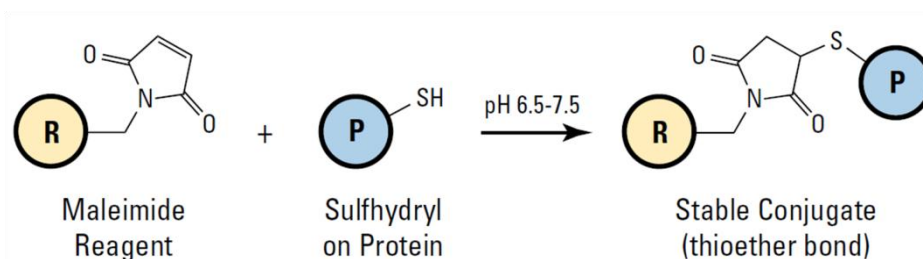


Figure 22 : Schéma réactionnel de la fonctionnalisation d'un thiol d'une protéine par un composé activé par un maléimide [75].

La considération principale afin que cette réaction se réalise est le pH de la solution. Les maléimides sont des composés également susceptibles de réagir avec les amines, qui sont en large majorité sur les virus. Afin de conserver le plus possible la spécificité envers les thiols, le pH doit donc être maintenu préférentiellement en-dessous de 7.5 (i.e. en-dessous du pK_a des amines du virus [44] qui seront alors sous la forme NH_3^+ non-réactive).

Cependant, le thiol est en équilibre acido-basique avec sa forme thiolate (S^-), un équilibre dont le pK_a vaut 8 [78]. La forme thiolate étant plus nucléophile et donc réactive que le thiol [78], le pH doit également être maintenu suffisamment haut, au-dessus de 6.5, afin de maximiser la présence de la forme thiolate et que la réaction avec le maléimide soit plus favorable. Typiquement à pH 7, la réaction entre le maléimide et un thiol est 1000 fois plus rapide que celle entre un maléimide et une amine [72]. Cependant, cela reste tout de même à relativiser avec le large excès d'amines vis-à-vis des thiols sur le virus (environ 3000 protéines p8 contenant au moins une amine contre 5 p3 contenant 2 thiols).

La gamme de pH (6.5-7.5) correspond parfaitement au tampon phosphate, généralement choisi à forte force ionique afin de minimiser la taille du nuage électronique autour des particules.

3.2.c) Iodo-acetyl

Une alternative à la fonctionnalisation utilisant les maléimides est celle se faisant avec des composés iodo-acétylés afin de créer également une liaison thioether (Figure 23).

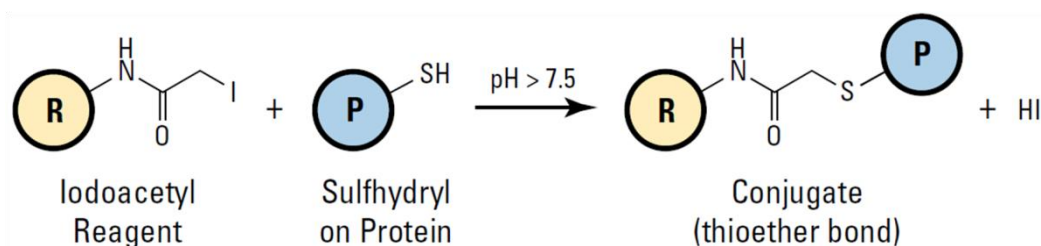


Figure 23 : de la fonctionnalisation d'un thiol d'une protéine par un composé activé par un iodo-acétyl [75].

Encore une fois, la réaction n'est pas entièrement spécifique envers les thiols. Les iodo-acetyls sont également susceptibles de réagir avec un bon nombre de groupes fonctionnels des protéines, tels que les histidines et surtout les amines primaires [72]. Afin de minimiser ces réactions parasites, le pH de la solution doit être légèrement alcalin (i.e. > 7.5) afin de maximiser la nucléophilie des thiols. Aussi, le caractère spécifique envers les thiols peut être augmenté en minimisant les excès de réactifs [72].

4. Conclusion

Le système du virus fd est donc un système modèle dans le domaine des cristaux liquides lyotropes. Du fait de sa grande monodispersité en longueur son diagramme de phase cristal-liquide expérimental concorde avec celui prédit par les théories et simulations. Cette concordance n'est pas uniquement qualitative mais une renormalisation prenant en compte les différents effets de charge, flexibilité, etc... permet également de retrouver quantitativement les limites attendues pour un tel système. La nature biologique de la particule rend également sa surface accessible à différents types de fonctionnalisation, notamment par le biais de deux fonctions réactives : les amines et les thiols.

Le chapitre suivant est consacré à la fonctionnalisation du corps du virus par différents polymères thermosensibles. Le greffage en question utilisera les deux chimies spécifiques mentionnées dans cette partie en passant dans un premier temps par une conversion des amines en maléimides puis une réaction avec des composés possédant une fonction thiol. Le polymère thermosensible va subir une variation de taille caractéristique brusque avec la température qui, lorsqu'il est greffé en surface du virus, va provoquer une variation du diamètre effectif de la particule. L'étude proposée s'intéresse donc notamment à cet effet et la possibilité d'induire une transition de phase cristal-liquide par cette variation de diamètre avec la température.

En troisième partie, la spécificité du phage M13-C7C est exploitée afin d'explorer les possibilités de fonctionnalisation régio-sélective. En effet, puisqu'il possède deux cystéines exprimées uniquement sur la protéine p3 située à l'une de ses extrémités, la présence des thiols va permettre, par le biais de leur chimie spécifique, de venir y greffer divers composés. La visualisation de cette fonctionnalisation spécifique est faite à l'aide de chromophores avant de poursuivre avec des molécules susceptibles de permettre une interaction entre plusieurs virus. C'est le cas notamment de la biotine dont le couplage spécifique avec les dérivés d'avidine peut mener à des auto-assemblages entre phages ou avec des nanoparticules.

Le quatrième chapitre s'intéresse à un mutant obtenu par *phage display*, le M13-Antistreptavidine (M13AS) dont la séquence polypeptidique insérée sur la protéine p3 est directement complémentaire de la streptavidine. Après avoir déterminé l'affinité du phage (exprimée par la constante de dissociation, K_d) pour la streptavidine, l'étude se concentre alors sur la formation d'auto-assemblages entre virus et l'influence de différents paramètres (concentration, force ionique,...).

En dernière partie, nous nous intéressons à un second système, inorganique, des bâtonnets de phosphate de lanthane (LaPO_4). Ces particules montrent une grande stabilité colloïdale dans l'éthylène glycol, ce qui nous permet alors d'étudier leurs facultés d'auto-

organisation en phases cristal-liquides. Ces suspensions présentent également un grand intérêt concret à travers leurs propriétés électro-optiques et leur couplage avec le champ électrique qui, associé à leur transparence optique et leur comportement athermal, est prometteur pour l'intégration de colloïdes minéraux dans de futurs dispositifs électro-optiques.

Bibliographie

- [1] B. Diu, C. Guthmann, D. Lederer, and B. Roulet, *Physique statistique* (Hermann, Paris, 1996).
- [2] D. Frenkel, *Nat. Mater.* **14**, 9 (2015).
- [3] H. Zocher, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **147**, 91 (1925).
- [4] F. C. Bawden, N. W. Pirie, J. D. Bernal, and I. Fankuchen, *Nature* **138**, 1051 (1936).
- [5] J. D. Bernal and I. Fankuchen, *J. Gen. Physiol.* **25**, 111 (1941).
- [6] L. Onsager, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 627 (1949).
- [7] Z. Dogic, P. Sharma, and M. J. Zakhary, *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.* **5**, 137 (2014).
- [8] G. J. Vroege and H. N. W. Lekkerkerker, *Rep. Prog. Phys.* **55**, 1241 (1992).
- [9] A. R. Khokhlov and A. N. Semenov, *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* **112**, 605 (1982).
- [10] Z. Y. Chen, *Macromolecules* **26**, 3419 (1993).
- [11] J. Tang and S. Fraden, *Biopolymers* **39**, 13 (1996).
- [12] E. Barry, D. Beller, and Z. Dogic, *Soft Matter* **5**, 2563 (2009).
- [13] A. Stroobants, H. N. W. Lekkerkerker, and T. Odijk, *Macromolecules* **19**, 2232 (1986).
- [14] T. Odijk, *Macromolecules* **19**, 2313 (1986).
- [15] P. J. Flory and A. Abe, *Macromolecules* **11**, 1119 (1978).
- [16] A. Abe and P. J. Flory, *Macromolecules* **11**, 1122 (1978).
- [17] H. N. W. Lekkerkerker, P. Coulon, R. Van Der Haegen, and R. Deblieck, *J. Chem. Phys.* **80**, 3427 (1984).
- [18] T. M. Birshtein, B. I. Kolegov, and V. A. Pryamitsyn, *Polym. Sci. USSR* **30**, 316 (1988).
- [19] Z. Y. Chen, *Phys. Rev. E* **50**, 2849 (1994).
- [20] A. Speranza and P. Sollich, *J. Chem. Phys.* **117**, 5421 (2002).
- [21] A. Speranza and P. Sollich, *Phys. Rev. E* **67**, 061702 (2003).
- [22] H. H. Wensink and G. J. Vroege, *J. Chem. Phys.* **119**, 6868 (2003).
- [23] A. Stroobants, H. N. W. Lekkerkerker, and D. Frenkel, *Phys. Rev. A* **36**, 2929 (1987).
- [24] M. Hosino, H. Nakano, and H. Kimura, *J. Phys. Soc. Jpn.* **46**, 1709 (1979).
- [25] J. M. Polson and D. Frenkel, *Phys. Rev. E* **56**, R6260 (1997).
- [26] D. Frenkel, *J. Phys. Chem.* **92**, 3280 (1988).
- [27] D. Frenkel, H. N. W. Lekkerkerker, and A. Stroobants, *Nature* **332**, 822 (1988).
- [28] A. Poniewierski, *Phys. Rev. A* **45**, 5605 (1992).
- [29] A. V. Tkachenko, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 4218 (1996).
- [30] P. van der Schoot, *J. Phys. II* **6**, 1557 (1996).
- [31] E. M. Kramer and J. Herzfeld, *Phys. Rev. E* **61**, 6872 (2000).
- [32] M. A. Bates and D. Frenkel, *J. Chem. Phys.* **109**, 6193 (1998).
- [33] A. M. Bohle, R. Holyst, and T. Vilgis, *Phys. Rev. Lett.* **76**, 1396 (1996).
- [34] J. A. C. Veerman and D. Frenkel, *Phys. Rev. A* **43**, 4334 (1991).
- [35] A. Stroobants, *Phys. Rev. Lett.* **69**, 2388 (1992).
- [36] J. V. Selinger and R. F. Bruinsma, *Phys. Rev. A* **43**, 2922 (1991).
- [37] R. Hentschke and J. Herzfeld, *Phys. Rev. A* **44**, 1148 (1991).
- [38] Z. Dogic and S. Fraden, in *Soft Matter Complex Colloidal Suspens.*, edited by G. Gomper and M. Schick (Wiley-VCH, Weinheim, 2005).
- [39] S. Fraden, in *Obs. Predict. Simul. Phase Transit. Complex Fluids*, edited by M. Baus, L. F. Rull, and J.-P. Ryckaert (Kluwer, Dordrecht, 1995), pp. 113–164.
- [40] D. A. Marvin, M. F. Symmons, and S. K. Straus, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **114**, 80 (2014).
- [41] D. A. Marvin and B. Hohn, *Bacteriol. Rev.* **33**, 172 (1969).

- [42] D. Marvin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 150 (1998).
- [43] D. A. Marvin, R. D. Hale, C. Nave, and M. H. Citterich, *J. Mol. Biol.* **235**, 260 (1994).
- [44] K. Zimmermann, H. Hagedorn, C. C. Heuck, M. Hinrichsen, and H. Ludwig, *J. Biol. Chem.* **261**, 1653 (1986).
- [45] E. Pouget, E. Grelet, and M. P. Lettinga, *Phys. Rev. E* **84**, 041704 (2011).
- [46] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (CSHL Press, 2001).
- [47] J. Rakonjac, N. J. Bennet, J. Spagnuolo, D. Gagic, and M. Russel, *Curr. Issue Mol. Biol.* **13**, 51 (2011).
- [48] K. R. Purdy and S. Fraden, *Phys. Rev. E* **70**, 061703 (2004).
- [49] W. M. Tan, R. Jelinek, S. J. Opella, P. Malik, T. D. Terry, and R. N. Perham, *J. Mol. Biol.* **286**, 787 (1999).
- [50] C. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, and A. M. Belcher, *Science* **303**, 213 (2004).
- [51] F. Huang, K. Addas, A. Ward, N. T. Flynn, E. Velasco, M. F. Hagan, Z. Dogic, and S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **102**, 108302 (2009).
- [52] *Ph.D. Phage Display Libraries - Instruction Manual* (New England Biolabs, n.d.).
- [53] E. Grelet, *Phys. Rev. X* **4**, 021053 (2014).
- [54] J. Lapointe and D. A. Marvin, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **19**, 269 (1973).
- [55] Z. Dogic and S. Fraden, *Langmuir* **16**, 7820 (2000).
- [56] E. Grelet and S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 198302 (2003).
- [57] Z. Zhang and E. Grelet, *Soft Matter* **9**, 1015 (2013).
- [58] J. P. Straley, *Phys. Rev. A* **14**, 1835 (1976).
- [59] E. Frezza, A. Ferrarini, H. Bindu Kolli, A. Giacometti, and G. Cinacchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 16225 (2014).
- [60] F. Tombolato, A. Ferrarini, and E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 258302 (2006).
- [61] A. B. Harris, R. D. Kamien, and T. C. Lubensky, *Rev. Mod. Phys.* **71**, 1745 (1999).
- [62] F. Tombolato and A. Ferrarini, *J. Chem. Phys.* **122**, 054908 (2005).
- [63] T. Odijk, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **15**, 477 (1977).
- [64] J. Skolnick and M. Fixman, *Macromolecules* **10**, 944 (1977).
- [65] J. Tang and S. Fraden, *Liq. Cryst.* **19**, 459 (1995).
- [66] K. R. Purdy, *Liquid Crystal Phase Transitions of Monodisperse and Bidisperse Suspensions of Rodlike Colloidal Virus*, Brandeis University, 2004.
- [67] J. R. Philip and R. A. Wooding, *J. Chem. Phys.* **52**, 953 (1970).
- [68] Z. Dogic and S. Fraden, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 47 (2006).
- [69] Z. Dogic and S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 2417 (1997).
- [70] K. R. Purdy and S. Fraden, *Phys. Rev. E* **76**, 011705 (2007).
- [71] E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168301 (2008).
- [72] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd edition (Academic Press, San Diego, 2008).
- [73] M. Brinkley, *Bioconjug. Chem.* **3**, 2 (1992).
- [74] G. Mattson, E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Savage, and S. Morgensen, *Mol. Biol. Rep.* **17**, 167 (1993).
- [75] *Easy Molecular Bonding - Crosslinking Technology* (Thermo scientific, n.d.).
- [76] A. Persat, R. D. Chambers, and J. G. Santiago, *Lab. Chip* **9**, 2437 (2009).
- [77] I. Rentero Rebollo and C. Heinis, *Methods* **60**, 46 (2013).
- [78] F. Sardi, B. Manta, S. Portillo-Ledesma, B. Knoop, M. A. Comini, and G. Ferrer-Sueta, *Anal. Biochem.* **435**, 74 (2013).

Chapitre 2 : Fonctionnalisation générique des virus avec des polymères thermosensibles

1. Introduction	38
1.1 Systèmes de virus fonctionnalisés avec des polymères	38
1.2 Transitions de phase par variation dynamique du diamètre dans un système colloïdal de bâtonnets	42
1.2.a) Transition isotrope-nématique	42
1.2.b) Transition nématique-smectique.....	45
1.2.c) Variation du diamètre de la particule par variation du rayon de giration d'un polymère	46
2. Protocole de greffage des polymères.....	47
2.1 Conversion des amines	47
2.2 Greffage du polymère	48
2.3 Discussion.....	49
3. Virus fonctionnalisés PNIPAM	50
3.1 Polymère et fonctionnalisation.....	50
3.2 Transition sol-gel.....	50
3.3 Discussion.....	51
4. Virus fonctionnalisés par des ELPs	54
4.1 Description et construction de la séquence	54
4.2 Fonctionnalisation et transition isotrope-nématique	56
4.3 Discussion.....	58
5. Conclusion.....	59
Bibliographie.....	62

1. Introduction

1.1 Systèmes de virus fonctionnalisés avec des polymères

Le virus fd, et ses mutants, possèdent une structure présentant un grand nombre de groupes réactifs. Il a donc fait l'objet de nombreuses fonctionnalisations permettant une étude plus approfondie des phénomènes d'auto-organisation. Ces ajouts, faits sur le corps du virus (i.e. sur la protéine p8), peuvent être principalement scindés en deux catégories.

La première est celle des composés de taille moléculaire. Un grand intérêt a été porté notamment sur les chromophores qui, grâce à la taille colloïdale du bactériophage, vont permettre une visualisation du système à l'échelle de la particule individuelle par microscopie de fluorescence. En dopant des phases de virus avec des virus recouverts de molécules fluorescentes choisies judicieusement, de nombreuses études se sont intéressées à la dynamique dans les mésophases cristal-liquides (Figure 1).

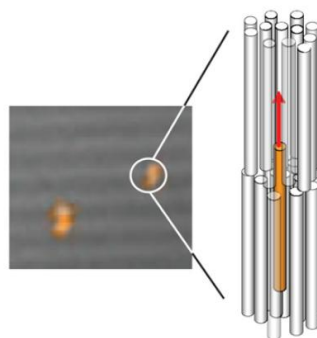


Figure 1 : Illustration du marquage en fluorescence des virus fd-wt. A gauche, superposition des images de microscopie à contraste interférentiel différentiel et de fluorescence montrant la localisation et la dynamique des particules dans la phase smectique. A droite, représentation schématique du "saut" d'un virus entre deux couches [1].

Des travaux par Lettinga *et al.* [2,3] ont commencé par s'intéresser à la diffusion dans la phase nématique puis leur poursuite dans les phases plus denses telles que le smectique a permis de mettre en évidence une diffusion par "sauts" des particules entre les couches smectiques [1,4,5]. Le même type de phénomène est observé dans la phase colonnaire à la différence que ces "sauts" dans les colonnes ne correspondent qu'à une fraction de la longueur du virus (approximativement 1/2 longueur) [6].

Le marquage en fluorescence des virus présente également un intérêt particulier dans l'étude de la chiralité. En effet, les phases cholestériques de virus dopées en particules fluorescentes permettent d'identifier l'hélicité de la mésophase. En prenant des images en microscopie de fluorescence dans des plans successifs de l'échantillon et en suivant le directeur nématique donné par l'orientation des bactériophages couverts de chromophores, il est alors possible de déterminer si celui-ci tourne vers la gauche ou vers la droite (voir Chapitre 1 – Figures 13 et 14) [7,8]. Enfin, une étude par Zhang et Grelet [9] utilise des virus fonctionnalisés avec des chromophores ou d'autres molécules venant influencer sur les propriétés de surface (charge, hydrophilicité...). La quantification de ces perturbations est un outil dans l'approfondissement de la compréhension de l'origine de la phase cholestérique du système.

La deuxième catégorie de composés ajoutés en surface du virus est celle des polymères ou macromolécules. Au-delà de la modification significative du diamètre qui en découle, la nature du polymère et sa taille vont avoir un impact sur le diagramme de phase cristal-liquide. Les premières études de ce type de système ont été faites sur un système où le virus fd-wt est recouvert avec du poly(ethylene glycol) (PEG) [10]. Le PEG est un polymère neutre et hydrophile dont l'un des principaux effets lorsqu'il est greffé sur la surface des virus est de venir créer des interactions de répulsion entre chaînes (et donc entre particules) qui vont dans certaines conditions dominer les interactions électrostatiques (Figure 2).

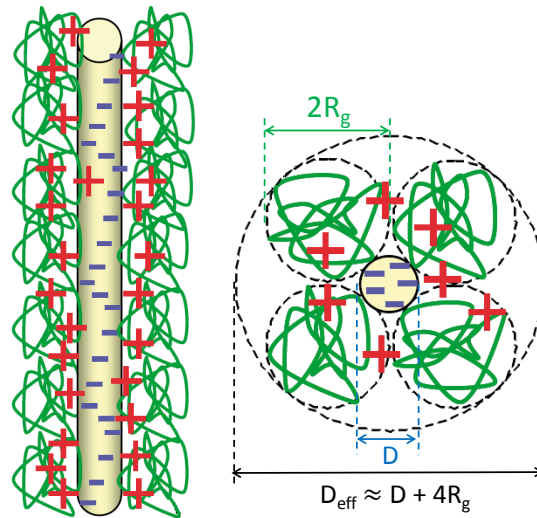


Figure 2 : Représentation schématique d'un virus recouvert d'un polymère vu de dessus (droite) et de côté (gauche). Les charges négatives du virus sont symbolisées par les symboles violets, les charges positives des contre-ions en rouge. Le polymère est représenté en vert dans une conformation globulaire [11].

La masse molaire du PEG ($M_{w,PEG}$) est directement reliée à son rayon de giration (R_g) qui pour un polymère approximé à une chaîne gaussienne correspond à la moyenne quadratique des distances entre monomères :

$$R_g^2 = \frac{1}{2N^2} \sum_{i,j} (r_i - r_j)^2 \quad (1)$$

avec N le nombre de monomères et r_i la position d'un monomère. Ce rayon correspond à celui d'une sphère imaginaire minimale contenant la chaîne polymère dans sa totalité. La relation entre la masse molaire et le rayon de giration est la loi de puissance suivante [12] :

$$R_{g,PEG} = 2.15 \times 10^{-2} \times M_{w,PEG}^{0.583} \quad nm \quad (2)$$

En utilisant des PEG de masses molaires différentes greffés sur des virus fd-wt, Dogic et Fraden vont alors étudier la transition isotrope-nématique de tels systèmes [10] et notamment montrer son indépendance envers la force ionique. L'eau faiblement salée étant un bon solvant pour le PEG, ceux-ci vont créer entre eux une répulsion à longue portée [12] qui vient s'ajouter à la répulsion électrostatique stabilisant le système de virus nus. Deux régimes, liés au diamètre effectif de la particule vont alors exister.

Dans le cas des interactions de répulsion entre polymères se trouvant en bon solvant, le diamètre effectif à prendre en compte est celui illustré sur la Figure 2 correspondant au diamètre du virus nu incrémenté de quatre fois le rayon de giration du PEG ($D_{\text{eff}} \approx D + 4R_g$). Pour les interactions électrostatiques, le diamètre effectif équivaut à celui du virus nu auquel il faut ajouter un multiple de la longueur de Debye ($D_{\text{eff}} = D + 3.7\kappa^{-1}$) [13].

La compétition entre les deux régimes est contrôlée par les variations de force ionique (I) faisant varier la longueur d'écran de Debye. Le régime dominant est celui dont le diamètre effectif est le plus important et il est donc possible, suivant la taille du polymère, de définir une force ionique critique (I^*) au-dessus de laquelle la répulsion stérique entre polymères domine dans les phénomènes d'auto-organisation. En posant les deux diamètres effectifs comme égaux, on obtient alors :

$$I^* = \frac{73.6}{R_g^2} \text{ mM} \quad (3)$$

La Figure 3 montre dans un premier temps l'évolution de la concentration à l'isotrope-nématique pour le système du fd-wt nu. A partir de ces mesures, et comme représenté sur l'axe des ordonnées à droite, il est possible de calculer le diamètre effectif de la particule en utilisant la théorie d'Onsager. La Figure 3 présente également deux systèmes de virus fonctionnalisés avec des PEG de masses molaires différentes. Dans le premier cas, celui du PEG-20k (ayant une masse molaire de 20 000 g/mol), le rayon de giration du polymère est de 6.9 nm, ce qui équivaut à une force ionique critique $I^* = 1.5 \text{ mM}$. Les mesures montrées sur la Figure 3 étant toutes faites à des forces ioniques supérieures, le diamètre effectif de la particule est donc toujours contrôlé par les polymères et ne varie donc pas avec I . En conséquence, la concentration à la transition isotrope-nématique ne varie pas non plus.

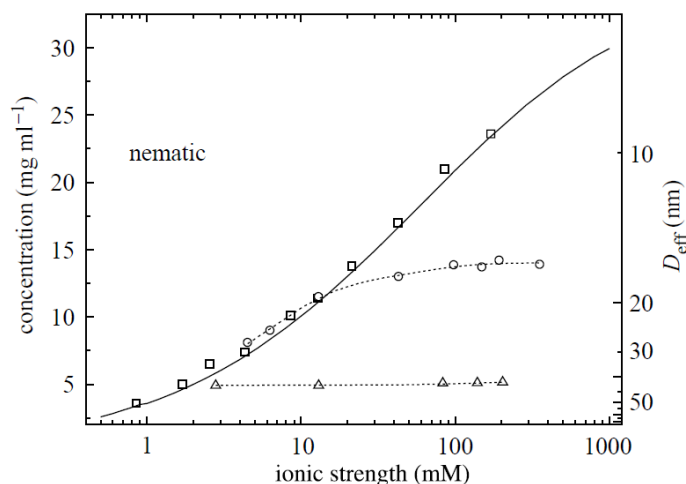


Figure 3 : Evolution de la concentration en virus fd à l'isotrope(-nématique) pour le système de virus nus (carrés), le système de virus fd greffé avec du PEG-5k (cercles) et le système fd-PEG-20k (triangles) [10].

Dans le cas du système fd-PEG-5k, le rayon de giration du polymère est plus faible ($R_g = 3.1 \text{ nm}$) et la force ionique critique plus importante ($I^* = 7.7 \text{ mM}$). Les mesures effectuées (Figure 3) couvrent cette fois-ci les forces ioniques inférieures et supérieures à I^* et les deux régimes sont observables. En dessous, lorsque le diamètre effectif de la particule est régi par l'électrostatique, la variation de I entraîne un changement de D_{eff} et la concentration à la

transition isotrope-nématique est elle aussi variable. En revanche, lorsque I^* est dépassée, le diamètre effectif atteint une valeur plateau ainsi que la concentration à l'isotrope-nématique. Expérimentalement, pour le système fd-PEG-5k, la force ionique critique se situe aux alentours de 10 mM ce qui est en accord avec la valeur théorique estimée. Il est à noter que ces systèmes fd-PEG présentent néanmoins tout de même une phase chirale nématique dont le pas cholestérique est quant à lui dépendant de la force ionique [11].

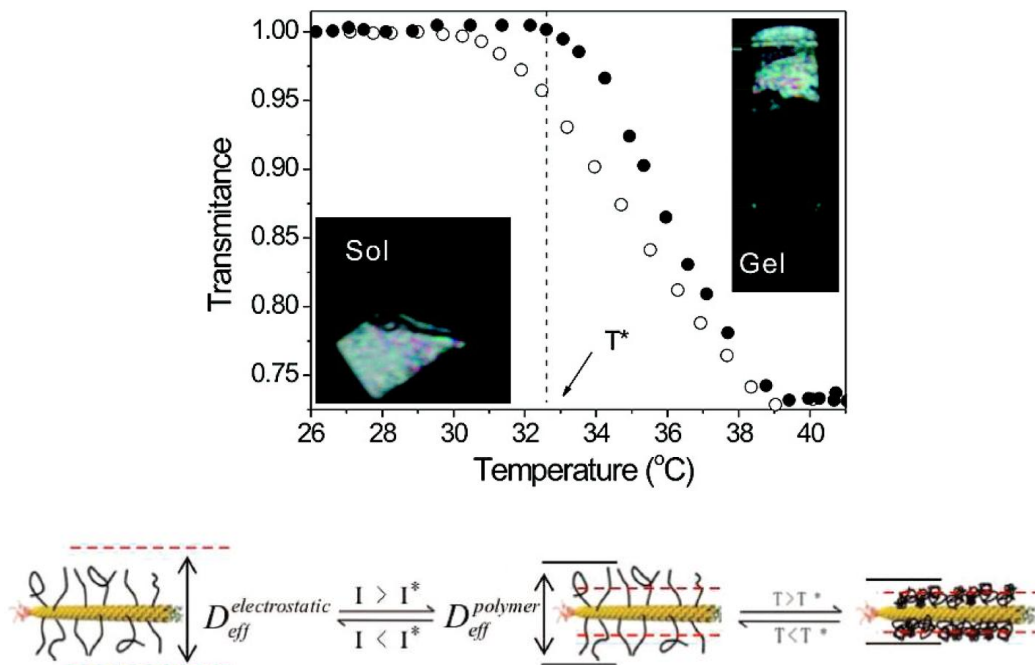


Figure 4 : Illustration du système fd-PNIPAM. En haut, la variation de transmittance avec la température mettant en évidence la transition sol-gel du système. Les deux images entre polariseurs croisés montrent respectivement l'échantillon fluide, en dessous de la LCST, et dans un état gel, au-dessus. En bas, à gauche, le système à faible force ionique où l'épaisseur de la double couche électronique est supérieure à celle de polymère greffé. Les particules sont alors stabilisées de manière électrostatique et le diagramme de phase dépend de la force ionique. Au centre, à forte force ionique, les interactions électrostatiques sont écrantées et le système est stabilisé de manière stérique par la couche de polymère en surface du virus. A droite, au-dessus de la LCST du PNIPAM, les chaînes adoptent une conformation globulaire et donnent lieu à des interactions hydrophobes (attractives) entre particules [14].

En s'appuyant sur des systèmes de virus greffés de polymères, Purdy *et al.* [15] vont mettre en évidence des phénomènes de démixtion dans des mélanges binaires de particules de différents diamètres. Ils montrent ainsi le fractionnement des particules de différentes tailles à l'isotrope-nématique ainsi que la coexistence entre deux phases nématiques, des phénomènes en accord avec les prédictions théoriques [16–18].

Le virus fd a également été fonctionnalisé par d'autres polymères que le PEG, et notamment le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM). Ce polymère présente la particularité d'être thermosensible ce qui entraîne un changement de conformation. A basse températures, il se présente sous la forme d'une chaîne étendue et hydrophile. Au-dessus d'une température critique inférieure de solubilité (ou LCST pour *Lower Critical Solubility Temperature*), il transite vers une forme à la fois globulaire et hydrophobe. Sa LCST est de 32 °C et peut être augmentée en le co-polymérisant avec d'autres monomères plus hydrophiles tels que des acrylamides [19].

Les travaux de Zhang *et al.* [14] montrent la possibilité de greffer ce polymère sur la surface du virus fd-wt en utilisant la biochimie entre les amines primaires du phage et la fonction N-hydroxysuccinimide ester (NHS ester). A température ambiante ($T < LCST$), ils observent alors un abaissement de la concentration à la transition isotrope-nématique, cohérente avec une augmentation du diamètre de la particule. Le rayon de giration du PNIPAM utilisé étant de 2.7 nm, le comportement du système avec la force ionique est similaire à celui mis en évidence dans le cas du PEG-5k. Une des caractéristique principale de ce système fd-PNIPAM est que lorsqu'il chauffé au-delà de la LCST du polymère, le changement de conformation du PNIPAM et son caractère hydrophobe entraînent une transition sol-gel pour des concentrations supérieures à 1mg/ml. Ce phénomène est totalement réversible et un liquide fluide réapparaît lors du refroidissement de l'échantillon.

1.2 Transitions de phase par variation dynamique du diamètre dans un système colloïdal de bâtonnets

Dans le domaine des cristaux liquides, les systèmes colloïdaux de bâtonnets sont dits lyotropes et leur diagramme de phase est donc associé à la fraction volumique des particules en solution donnée par :

$$\phi = \frac{N}{V} \times v_0 \quad (4)$$

où N est le nombre de particules, V le volume total et v_0 le volume de la particule défini comme :

$$v_0 = \frac{1}{4} \pi L D_{(eff)}^2 \quad (5)$$

Les transitions de phases passent nécessairement par une variation de fraction volumique qui s'effectue de manière générale en faisant varier la quantité de solvant dans le système (i.e. en le concentrant ou en le diluant). Cependant elle peut également être due à une variation dynamique du volume des particules et plus spécifiquement leur diamètre effectif.

1.2.a) Transition isotrope-nématique

La fraction volumique peut être ramenée à une fraction volumique dite réduite, associée à la transition isotrope-nématique (I- N) :

$$\phi^* = \phi \times \frac{L}{D} = \frac{N}{4V} \pi L^2 D \quad (6)$$

La transition de la phase isotrope à la phase nématique est une transition dite du premier ordre qui va donc présenter une coexistence de phase entre deux fractions volumiques caractéristiques. Lorsqu'elle est induite par une variation dynamique du diamètre de la particule, on peut alors exprimer les deux binodales comme il suit :

$$\Phi_{iso}^* = \frac{N}{4V} \pi L^2 D_{iso} \quad (7)$$

$$\Phi_{nem}^* = \frac{N}{4V} \pi L^2 D_{nem} \quad (8)$$

La variation de diamètre d est alors définie comme :

$$d = D_{nem} - D_{iso} \quad (9)$$

Ainsi, en réécrivant les équations précédentes, il est possible d'exprimer d comme étant :

$$d = \frac{4V}{N\pi L^2} \Delta\Phi_{I-N}^* \quad (10)$$

avec

$$\Delta\Phi_{I-N}^* = \Phi_{nem}^* - \Phi_{iso}^* \quad (11)$$

Dans le cas des virus, la quantité mesurable, par spectroscopie UV, est la concentration massique, donnée par :

$$C_{m, I-N} = \frac{N \times M_w}{V \times N_a} \quad (12)$$

avec M_w la masse molaire du virus et N_a le nombre d'Avogadro. L'expression finale de la variation de diamètre nous donne alors :

$$d = \frac{4M_w}{N_a C_{m, I-N} \pi L^2} \Delta\Phi_{I-N}^* \quad (13)$$

Dans le cas de particules semi-flexibles, le calcul des fractions volumiques à la coexistence se fait par des extensions réalisées par Khokhlov et Semenov [20] puis reprises par Chen [21] puis Tang et Fraden [22]. Les fractions volumiques réduites se calculent alors en utilisant les formules suivantes [22] :

$$\Phi_{iso}^* = \frac{4.1895 + 26.1020\alpha + 66.0026\alpha^2 + 117.846\alpha^3}{1 + 3.4806\alpha + 9.0331\alpha^2} * \frac{\pi}{4} \quad (14)$$

$$\omega = \frac{0.2737 + 3.0357\alpha + 3.0666\alpha^2 + 10.7859\alpha^3}{1 + 26.8263\alpha + 86.7892\alpha^2 + 143.145\alpha^3} \quad (15)$$

avec :

$$\alpha = \frac{L}{2P} \quad (16)$$

$$\omega = \frac{\Phi_{nem}^* - \Phi_{iso}^*}{\Phi_{iso}^*} \quad (17)$$

L'évolution des valeurs de Φ_{iso}^* et Φ_{nem}^* en fonction du paramètre α est donnée en Figure 5. Il est alors possible d'extraire, à partir des caractéristiques physiques du fd-Y21M ($L = 920 \text{ nm} - P = 9900 \text{ nm} - M_w = 1.63 \times 10^7 \text{ g/mol}$) et du fd-wt ($L = 880 \text{ nm} - P = 2800 \text{ nm} - M_w = 1.64 \times 10^7 \text{ g/mol}$) les fractions volumiques réduites à la transition isotrope-nématique qui sont indiquées par les lignes pointillées (en bleu et en vert pour le fd-Y21M et le fd-wt respectivement) et dont les valeurs sont reportées dans l'insert de la Figure 5.

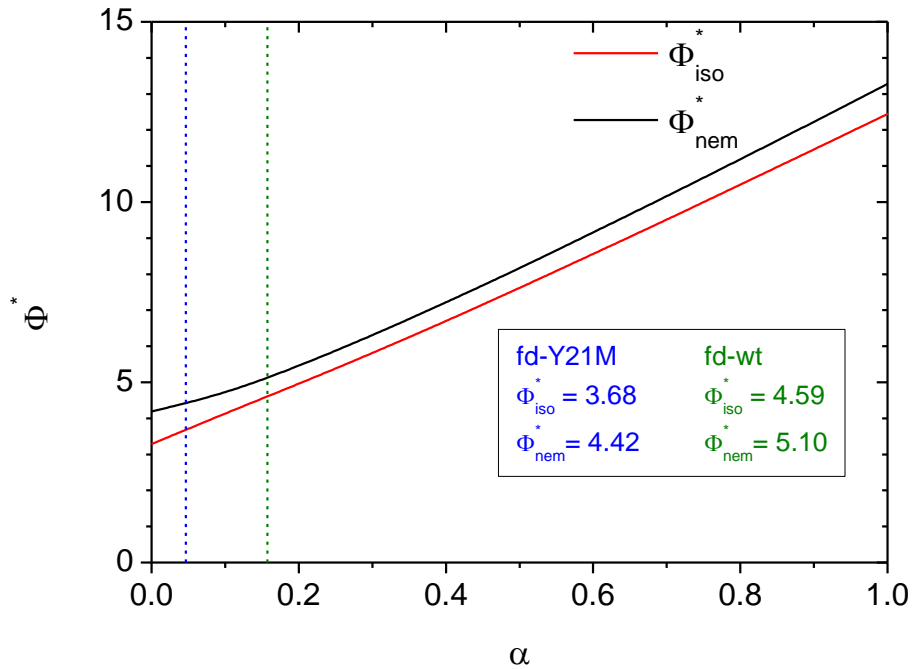


Figure 5 : Evolution des fractions volumiques réduites isotrope (Φ_{iso}^*) et nématique (Φ_{nem}^*) en fonction du ratio $\alpha = L/P$. Les lignes pointillées indiquent la position des transitions pour des valeurs de α correspondant au fd-Y21M ($L/2P = 0.046$) et au fd-wt ($L/2P = 0.157$) (en bleu et en vert respectivement). Les valeurs de Φ^* obtenues pour la transition isotrope-nématique de chaque système sont reportées dans l'insert.

Ces valeurs de fractions volumiques réduites du domaine de coexistence extraites du modèle de Chen pour le fd-Y21M et le fd-wt peuvent être alors comparées avec les domaines mesurés de manière expérimentale : 13.9 – 18.9 mg/ml pour le fd-Y21M et 19.8 – 22.6 mg/ml pour le fd-wt à une force ionique de 110 mM [8] et donc un diamètre effectif, $D_{eff} = 10 \text{ nm}$ [13]. Il est alors possible de calculer, à partir des fractions volumiques réduites théoriques présentée en Figure 5, les concentrations massiques attendues :

$$C_{m,I/N} = \frac{4 \times \Phi_{I/N}^* \times M_w}{\pi \times L^2 \times D_{eff} \times N_a} \quad (18)$$

Les valeurs pour le domaine de coexistence obtenues théoriquement sont alors de 15.0 – 18.0 mg/ml pour le fd-Y21M et 20.6 – 22.8 mg/ml pour le fd-wt et donc en bon accord avec les résultats expérimentaux.

Il est également possible, à partir des caractéristiques physiques du fd-wt et du fd-Y21M, d'obtenir la variation de diamètre nécessaire pour induire une transition isotrope-nématique :

$$d_{fd-Y21M} = \frac{30.14}{C_{m,I-N}} \text{ nm} \quad (19)$$

$$d_{fd-wt} = \frac{22.70}{C_{m,I-N}} \text{ nm} \quad (20)$$

avec $C_{m,I-N}$ en mg/ml.

1.2.b) Transition nématique-smectique

De la même manière que pour la transition isotrope-nématique, de nombreux travaux se sont portés sur la prédiction de la transition entre la phase nématique et la phase smectique [23,24]. Dans l'hypothèse d'une transition du premier ordre, il est possible d'exprimer de nouveau la fraction volumique pour les deux phases :

$$\phi_{nem} = \frac{N}{4V} \pi D_{nem}^2 L \quad (21)$$

$$\phi_{Sm} = \frac{N}{4V} \pi D_{Sm}^2 L \quad (22)$$

et d'établir de même une relation entre les deux diamètres du bâtonnet :

$$d' = D_{Sm} - D_{nem} \quad (23)$$

En substituant cette relation dans le couple d'équations précédant, on aboutit alors à une équation du second degré qu'il est possible de résoudre et qui donne deux solutions dont seulement une correspond à une réalité physique :

$$d' = 2 \sqrt{\frac{M_w}{N_a C_{m,N-Sm} \pi L}} \times (\sqrt{\phi_{Sm}} - \sqrt{\phi_{nem}}) \quad (24)$$

Dans la littérature [13,23,24], la fraction volumique réduite caractéristique de la transition nématique-smectique est donnée par :

$$\rho^* = \frac{\phi}{\phi_{CP}} = \frac{\phi}{\frac{\pi}{2\sqrt{3}}} \quad (25)$$

où ϕ_{CP} correspond à la fraction volumique d'un empilement compact hexagonal de cylindres parallèles. Polson et Frenkel [25] obtiennent alors les valeurs suivantes par simulation numériques :

$$\phi_{nem} = 0.46 \quad (26)$$

$$\phi_{Sm} = 0.47 \quad (27)$$

La variation dynamique du diamètre de la particule pour induire la transition nématique-smectique se réduit donc à :

$$d' = \frac{1.46}{\sqrt{C_{m,N-Sm}}} \text{ nm} \quad (28)$$

avec $C_{m, N-Sm}$ en mg/ml.

1.2.c) Variation du diamètre de la particule par variation du rayon de giration d'un polymère

Lorsqu'il est fonctionnalisé par un polymère, la variation du diamètre du système bâtonnet-polymère peut être induite par une variation de la taille de la macromolécule qui passe d'une conformation étendue et en bon solvant, dont on peut définir un rayon de giration (R_{gir}), à une conformation globulaire et en mauvais solvant, possédant un rayon caractéristique (R_{glob}). Dans ce cas, le diamètre effectif de la particule étant donné par $D_{eff} = D + 4R_{gir/glob}$, une variation de la taille du polymère entraîne donc que : $\Delta D_{eff} = 4 \times (R_{gir} - R_{glob}) = 4\Delta R_g$. Il en découle alors que :

$$d \text{ ou } d' = 4\Delta R_g \quad (29)$$

Il est alors possible de tracer les deux dépendances de cette variation de rayon de giration en fonction des concentrations massiques aux transitions :

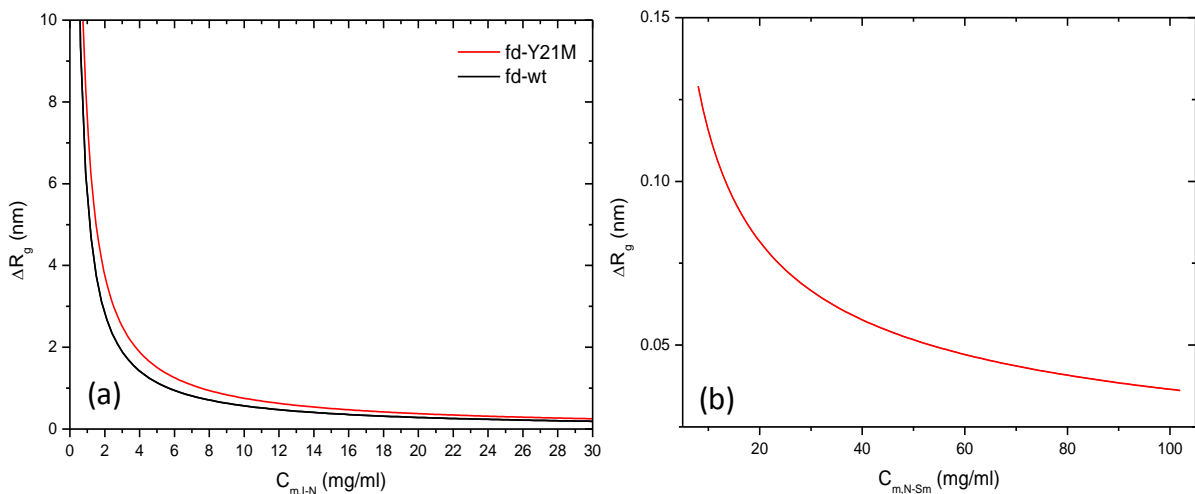


Figure 6 : Variation de taille (ΔR_g) d'un polymère recouvrant la surface du virus pour induire (a) une transition isotrope-nématique et (b) une transition nématique-smectique.

La comparaison des différents tracés montrent que la transition nématique-smectique est beaucoup plus sensible aux variations de diamètres que la transition isotrope-nématique. La flexibilité joue également un rôle puisque les systèmes utilisant du fd-wt, moins rigide que le fd-Y21M, nécessiteront des variations ΔR_g plus faibles. Cette observation est cohérente avec le domaine de coexistence observé expérimentalement et prédit théoriquement qui est moins large pour la souche sauvage que pour le mutant plus rigide.

Ce modèle doit cependant être manié avec prudence. En effet, il utilise comme base principale la théorie d'Onsager dont la principale limite est le rapport d'aspect des particules qui se doit d'être grand ($L/D \gg 1$). Bien que cette condition soit remplie pour les systèmes de virus nus ($L/D = 133$ et $L/D = 139$ pour le fd-wt- et fd-Y21M respectivement), une fois ces derniers recouverts de polymères, leur diamètre augmente. Ainsi, en prenant l'exemple des systèmes fd-PEG-5k et fd-PEG-20k, le diamètre effectif, D_{eff} , du bâtonnet va alors être de 19 nm et 34.2 nm ($D + 4 R_g$) respectivement. Les rapports d'aspect alors obtenus sont de 46 pour le PEG-5k et 26 pour le PEG-20k et ne satisfont plus strictement les limites de la théorie d'Onsager.

Dans le reste du chapitre, le virus utilisé pour la fonctionnalisation est le fd-Y21M. En effet, afin d'étudier les effets en température sur des particules greffés avec des polymères thermosensibles, il est essentiel que le système nu ne soit pas lui-même sensible à de telles variations. Du fait de la dépendance de sa longueur de persistance avec la température [22], le fd-wt n'offre pas cette possibilité et les études seront donc faites avec son mutant, plus rigide et dont les propriétés ont montré être insensibles à la température [25].

2. Protocole de greffage des polymères

Les exemples cités dans la partie introductive utilisent tous une réaction chimique entre un polymère contenant une fonction NHS ester terminale et les amines du virus afin de les greffer sur leur surface. Cette réaction présentant un certain nombre d'inconvénients, liés particulièrement à l'instabilité du NHS ester en milieu aqueux, le protocole détaillé dans cette partie propose une alternative aux méthodes "standards" et se divise en deux axes : la conversion des amines en maléimides dans un premier temps et la réaction avec un polymère fonctionnalisé par un thiol (SH) dans un second.

2.1 Conversion des amines

L'échantillon est dialysé dans du tampon phosphate (PBS) à pH 7.2 et une force ionique de 350 mM. Afin d'éviter leur possible interférence avec la réaction, l'échantillon de virus est purifié des éventuels résidus de bactéries par centrifugation (15 000 g pendant 45 minutes). Il est ensuite dilué à une concentration de 1 mg/ml. La conversion des amines en maléimides se fait en utilisant un agent de couplage hétéro-bi-fonctionnel, le N- γ -maleimidobutryl-oxysuccinimide ester (GMBS) dont la structure est donnée ci-dessous.

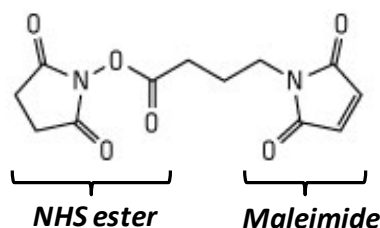


Figure 7 : Structure de l'agent de couplage hétéro-bi-fonctionnel GMBS, la fonction maléimide se trouve à droite, le NHS ester à gauche.

Ce composé est construit en 3 parties. Aux deux extrémités se trouvent une fonction NHS ester (à gauche sur la Figure 7), susceptible de réagir avec les amines du virus, et maléimide (à droite sur la Figure 7), pour une réaction avec un thiol, et sont séparés par un carbonyle. Dans les conditions de pH choisies (7.2), les deux fonctions sont suffisamment stables en milieux aqueux pour effectuer l'ensemble du protocole de fonctionnalisation (temps de demi-vie de plusieurs heures pour l'hydrolyse du NHS ester [26]).

Un excès molaire de 3 GMBS (masse moléculaire : $M_w = 280.23$ g/mol) par protéine du manteau du virus p8 (environ 3000) est ajouté à la solution. Le GMBS est pré-dissout dans du DMSO afin de faciliter son incorporation. Une attention particulière est portée sur le fait que la proportion de solvant organique ne dépasse pas 20 % du volume total afin de ne pas dénaturer le virus. Le milieu réactionnel est alors protégé de la lumière (par du papier aluminium) et laissé sous agitation pendant 40 minutes à température ambiante (23 °C).

Une fois la réaction entre les amines et la partie NHS ester du GMBS effectuée, la solution est purifiée de l'excès en solution par centrifugation : une première à 15 000 g pendant 20 minutes afin de séparer les éventuels agrégats ayant pu se former et deux autres à 200 000 g pendant 45 minutes afin de récupérer les virus. Une forme alternative de purification consiste à recueillir les virus par déplétion. Pour se faire, une solution contenant 200 g/L de PEG ($M_w = 8$ kg/mol) et 2.5 mol/L de sel est ajouté à la solution de virus (1/5^{ème} du volume total). Le tout est ensuite centrifugé à 13 500 g pendant 20 minutes puis redispersé. L'opération est répétée 2 fois.

Le culot de virus est à chaque fois séparé du surnageant et redispersé dans du tampon frais (PBS à pH 7.2 et $I = 350$ mM).

2.2 Greffage du polymère

Après purification du GMBS, la solution de virus est ensuite diluée à 0.5 mg/ml. En parallèle, le polymère, possédant un thiol comme fonction terminale, est dissout dans 8 mL d'eau distillée. L'excès molaire pris vis-à-vis des protéines du corps du virus est variable selon la nature du polymère et sera précisé dans chaque partie. L'ajout se fait ensuite de manière progressive, en quatre fois (4 x 2 mL) toutes les demi-heures afin d'éviter d'éventuels phénomènes de déplétion. Après l'ajout total, le mélange est laissé sous agitation deux heures.

Les polymères étudiés étant thermosensibles, il est essentiel que toute cette partie du protocole soit réalisée à froid (4 °C). Egalement, les polymères en question contiennent une fonction thiol unique et il n'y a donc pas de ponts disulfures nécessitant une réduction par le TCEP.

Une fois la réaction effectuée, une purification des polymères libres est nécessaire, toujours en prêtant une attention particulière à ne pas réchauffer de manière trop importante l'échantillon. Un cycle de centrifugation à froid (4 °C) à 15 000 g pendant 45 minutes afin de séparer les éventuels agrégats est fait puis le surnageant est dialysé (à 4 °C) dans un tampon moins salé (PBS à pH 7.0 et I = 110 mM). Le bain de dialyse est renouvelé deux fois en laissant l'équilibre se faire pendant au moins trois heures. Les virus sont ensuite récoltés et reconcentrés par centrifugation successives en augmentant progressivement la vitesse de centrifugation afin d'éliminer les éventuels agrégats ayant pu se former. Seule la fraction finale, après centrifugation à 170 000 g pendant 2 heures (à 4 °C), est conservée pour la suite des études.

2.3 Discussion

Cette fonctionnalisation en deux temps, bien qu'intrinsèquement plus longue et complexe qu'une réaction directe, présente néanmoins plusieurs avantages.

Le GMBS étant une espèce moléculaire, sa diffusion vers les amines terminales des protéines du virus est plus simple que pour un polymère de plusieurs kg/mol. La réaction se faisant avec un NHS ester, son hydrolyse en solution rend crucial la rapidité de cette étape. Le pH de la solution est choisi à 7.2 afin de conserver la présence d'un nombre suffisant d'amines primaires (dont le pK_a est compris entre 8 et 10) et d'optimiser la stabilité de la fonction succinimide mais également du maléimide (qui doit rester stable jusqu'à l'ajout de polymère et dont l'hydrolyse est possible pour des $pH > 8$).

L'un des principaux intérêts de cette méthode réside dans l'emploi de polymères fonctionnalisés par des thiols au lieu d'un NHS ester. La fonction SH est en effet une fonction plus stable et plus facilement intégrable en tant que fonction terminale dans une chaîne polymère lors de la synthèse. De plus, c'est également une fonction qui peut se présenter de manière naturelle puisqu'elle est contenue dans un acide aminé, la cystéine. Elle est donc trouvée dans un grand nombre de protéines mais aussi facilement incorporable dans des chaînes polypeptidiques artificielles.

Par la suite sont donc présentés deux exemples de fonctionnalisation par des composés thermosensibles du virus fd-Y21M par la méthode décrite au-dessus. Le premier est le polymère PNIPAM-SH (Polymer Source), ayant dans notre cas une masse molaire moyenne de 15 kg/mol afin d'éprouver le protocole et reproduire le même type d'observations que celles faites sur ce système dans la littérature [14].

Ensuite, une autre catégorie de composés étudiée est celle des élastines ou ELPs (*Elastin-Like Polypeptides*). Ce sont des séquences polypeptidiques présentant des propriétés thermosensibles. Celles utilisées sont des di-blocs faits de deux unités de répétition aux caractéristiques différentes. Leur intérêt réside dans la différence de LCST entre les deux blocs faisant qu'au-delà d'une certaine température, l'un va rester hydrophile alors que l'autre va adopter une forme globulaire. La variation de diamètre va alors pouvoir permettre éventuellement une transition de phase tout en évitant les phénomènes de gélation dus aux interactions hydrophobes à la périphérie des particules.

3. Virus fonctionnalisés PNIPAM

3.1 Polymère et fonctionnalisation

Le PNIPAM utilisé est fonctionnalisé à son extrémité par une fonction thiol (SH) et sa LCST est de 32 °C dans l'eau. Un excès molaire de deux polymères par protéine p8 du corps du virus est choisi dans le protocole détaillé ci-dessus.

En solution aqueuse et à 20°C, son rayon de giration (R_g) est relié à sa masse molaire par la relation [27]:

$$R_{g,PNIPAM} = 1.58 \times 10^{-2} \times M_{w,PNIPAM}^{0.58} \quad nm \quad (30)$$

Dans notre cas, nous obtenons $R_g = 4$ nm. Lorsqu'il se présente sous forme globulaire ($T > LCST$), le rayon caractéristique du polymère typiquement attendu équivaut à 50 % du rayon de giration de sa forme hydrophile [28]. La variation de taille due au changement de conformation est donc de 2 nm.

L'ajout de polymère sur la surface du virus va entraîner l'augmentation du diamètre effectif de la particule. Comme déjà montré sur des systèmes fonctionnalisés avec du PEG [11], cette variation de diamètre va s'accompagner d'une diminution de la concentration à l'isotrope-nématique.

Expérimentalement, la valeur obtenue pour l'apparition de la phase liquide isotrope à une force ionique de 110 mM est de 12.5 mg/ml qui est à comparer à celles du domaine de coexistence données dans la littérature (13.9-18.9 mg/ml) [8]. La concentration obtenue pour notre système Y21M-PNIPAM est donc bel et bien inférieure ce qui est le premier résultat confirmant le succès de la fonctionnalisation. De plus, dans ces conditions de concentration, le ΔR_g nécessaire pour induire une transition est de 0.45 nm (voir Figure 6), et est donc inférieur à celui de notre polymère. Cependant, les interactions attractives hydrophobes entre les chaînes de PNIPAM vont plutôt mener à une transition sol-gel qu'une transition isotrope-nématique.

3.2 Transition sol-gel

En dépit de l'observation d'une diminution de la concentration en virus à la transition isotrope nématique, la transition du système d'un état liquide vers un état gel telle que celle reportée dans la littérature [14] reste la seule preuve afin de confirmer sans équivoque le greffage des polymères sur la surface du virus et donc la validité du protocole employé.

Pour ce faire, l'échantillon, à la concentration isotrope-nématique, est placé dans un pilulier en verre à température ambiante et, lorsque le pilulier est retourné, le liquide coule sur les parois. Il est ensuite placé sur une plaque chauffante ($T = 40$ °C) pendant une à deux minutes. Le pilulier est alors retiré de la plaque et retourné. La Figure 8 illustre le résultat de l'expérience.

Le système ayant été chauffé au dessus de la LCST du PNIPAM (32 °C), ce dernier va adopter une forme globulaire hydrophobe. Lorsque le pilulier est retiré de la plaque

chauffante et retourné, le système se trouve alors dans un état gel, dû à l'attraction hydrophobe entre polymères, et va adhérer aux parois en verre (Figure 8, à gauche).

L'échantillon reste ainsi une dizaine de secondes, durant lesquelles, puisqu'il n'est plus chauffé, sa température redescend. Elle repasse alors en-dessous de la LCST, et le PNIPAM change de nouveau de conformation, redevenant hydrophile. Le système transite alors vers un état liquide, qui est mis en évidence par l'écoulement se faisant sur la paroi du pilulier (Figure 8, à droite).

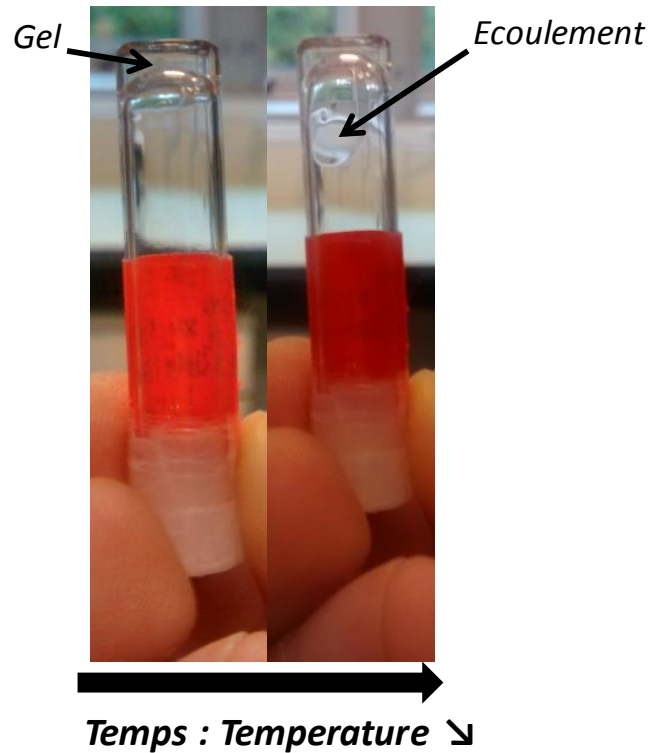


Figure 8 : Illustration de la transition sol-gel du système fd-Y21M-PNIPAM. Après chauffage, le pilulier est placé à l'envers et l'échantillon sous forme gel reste bloqué au sommet (gauche). Après quelques instants durant lesquels la température redescend sous la LCST, le liquide coule sur les parois (droite).

Cette transition sol-gel est complètement réversible. S'il est de nouveau chauffé, l'échantillon présentera encore une fois un état gel avant de revenir vers l'état liquide en refroidissant.

3.3 Discussion

Ce premier système fd-Y21M-PNIPAM montre le succès de la méthodologie employée afin de greffer des polymères activés par des thiols sur la surface du virus. Dans un premier temps, l'abaissement de la concentration à l'isotrope-nématique traduit l'augmentation du diamètre effectif des particules, comme cela a pu être déjà montré dans la littérature [11]. Dans un second temps, et de manière plus spécifique au polymère employé, le PNIPAM, la transition sol-gel observée concorde avec les expériences précédentes menées par Zhang *et al.* [14] sur le système fd-wt-PNIPAM (Figure 4).

Cependant, dans l'idée présentée précédemment d'une transition de phase induite par une variation dynamique du diamètre effectif de la particule, les applications de ce

système restent très limitées. En effet, bien que le changement de conformation du PNIPAM induise une variation de diamètre suffisante, il induit également un changement drastique dans son hydrophilicité.

Ainsi, même si dans les conditions de concentrations proches de l'isotropie-nématique du système la variation de taille subie par le polymère suffit pour observer une transition cristal-liquide, celle-ci est rendue impossible par l'apparition d'interactions hydrophobes attractives entre les chaînes de polymères et donc entre les virus. Cette attraction entre particules va entraîner une transition de type sol-gel dans le système.

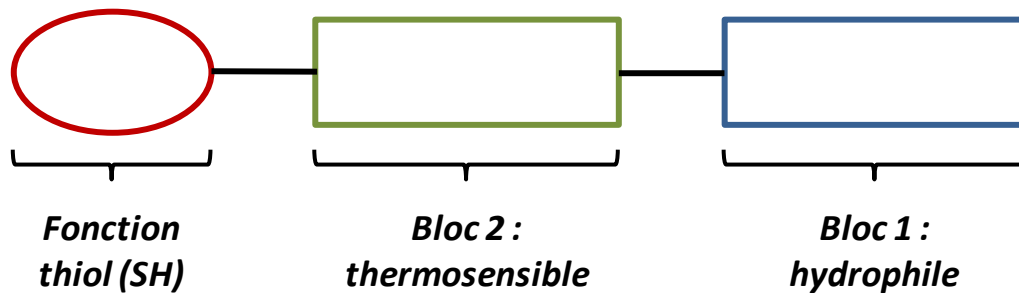


Figure 9 : Illustration de la construction du polymère di-bloc afin d'observer une transition de phase après greffage sur les virus. La variation de diamètre effectif est engendré par le bloc thermosensible (Bloc 2, le plus proche du virus) et le bloc hydrophile (Bloc 1) a pour fonction d'éviter une transition sol-gel dans le système.

Afin de contourner cette difficulté, il convient alors de s'intéresser à des polymères plus complexes. L'idée est alors de construire un di-bloc, le premier bloc, lié au virus, étant thermosensible de la même manière que le PNIPAM et le second restant hydrophile (Figure 9).

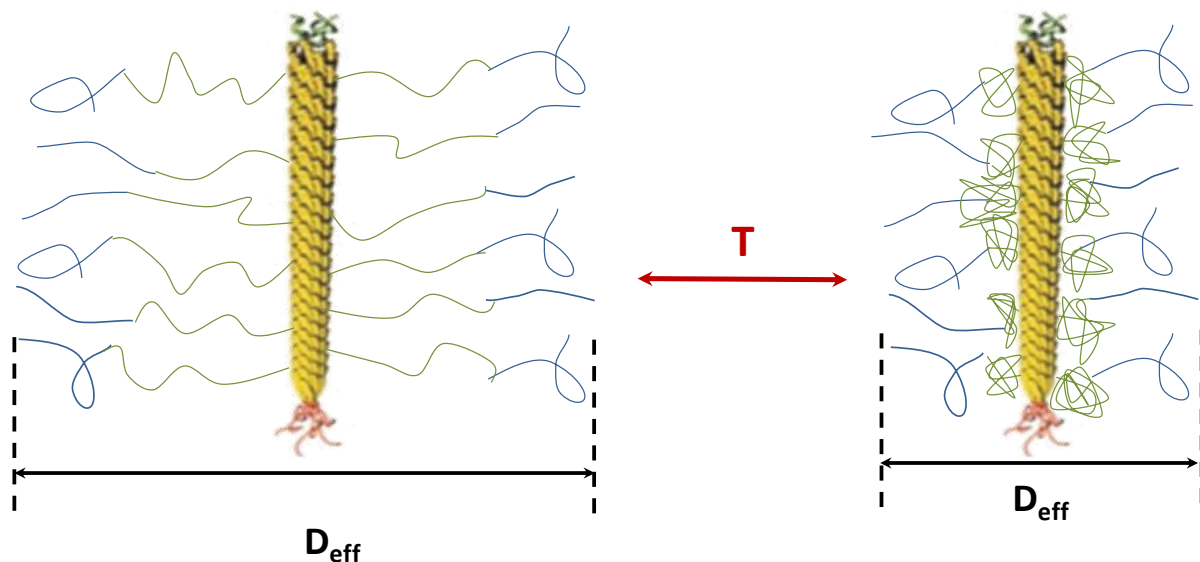


Figure 10 : Illustration de la variation de diamètre effectif d'un virus greffé avec un di-bloc tel que celui présenté en Figure 9. En dessous de la LCST du bloc thermosensible (Bloc 2), le diamètre effectif est maximal puisque les deux parties sont hydrophiles et en conformation étendue. Lorsque la température augmente, le bloc thermosensible adopte une forme globulaire qui entraîne une diminution de D_{eff} . Le bloc hydrophile (Bloc 1) ne subit pas de changement de la sorte et reste en bon solvant.

Une fois greffé sur le virus, le changement de conformation du bloc thermosensible (Bloc 2) avec la température va toujours entraîner une variation du diamètre effectif du virus. Le bloc hydrophile (Bloc 1) quant à lui ne subit pas de modification (Figure 10).

Le changement de conformation du bloc thermosensible pour les températures supérieures à sa LCST s'accompagne également de l'apparition d'un caractère hydrophobe. Le rôle du bloc hydrophile, se situant à l'interface entre la particule et le solvant, est donc de maintenir l'hydrophilicité du système et d'empêcher les interactions attractives entre particules entraînant une transition sol-gel comme cela peut être le cas pour le PNIPAM seul. Ainsi, comme illustré en Figure 11, la variation dynamique du diamètre effectif du virus permet à priori la transition réversible d'une phase nématique vers un liquide isotrope à masse de virus constante.

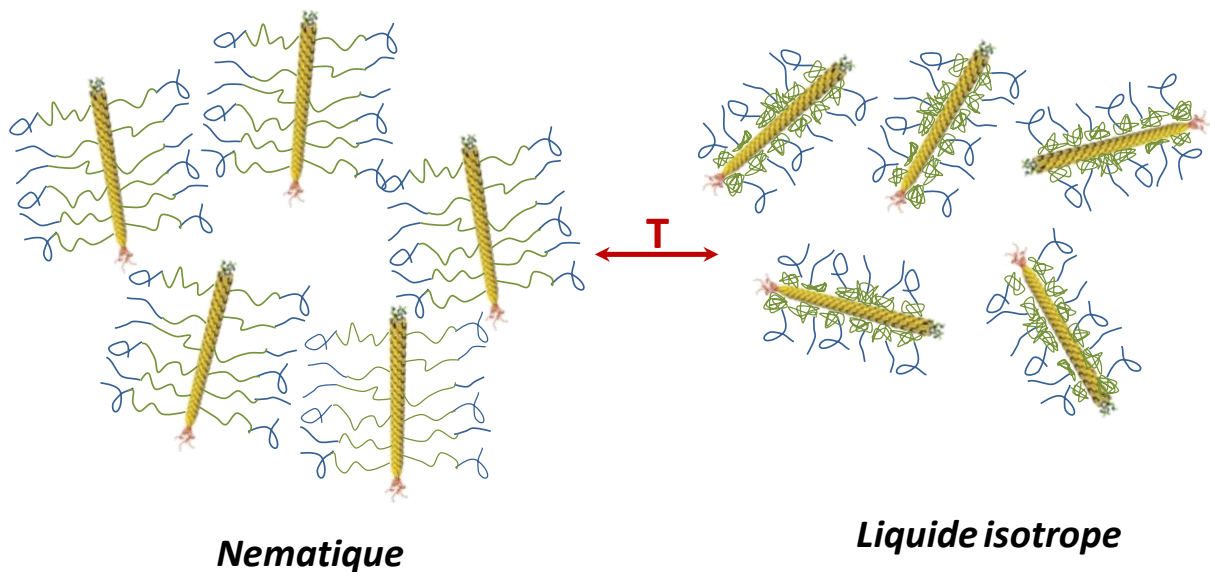


Figure 11 : Illustration de la transition d'une phase nématique vers un liquide isotrope par variation de diamètre effectif de virus greffés avec un polymère di-bloc. A gauche, en dessous de la LCST du bloc thermosensible, D_{eff} est maximal et les particules s'organisent en phase nématique. A droite, lorsque la température est supérieure à la LCST du bloc hydrophobe, celui-ci adopte une conformation globulaire entraînant une diminution de D_{eff} . Le bloc hydrophile lui ne change pas de conformation et empêche les interactions hydrophobes d'entraîner le système vers une phase gélifiée, le maintenant alors dans une phase liquide isotrope.

Ce type de polymère nécessite une synthèse complexe, d'autant plus qu'il est nécessaire d'y incorporer une fonction terminale essentielle au greffage sur le virus. Ici nous nous intéresserons à des séquences polypeptidiques construites à partir d'unités de répétitions connues pour leur caractère thermosensibles. Ces séquences d'acides aminés, synthétisées sur mesure, permettent également l'intégration d'une cystéine en bout de chaîne, et le thiol qu'elle contient va donc permettre le greffage sur le virus en suivant le protocole détaillé précédemment.

4. Virus fonctionnalisés par des ELPs

Les élastines utilisées dans cette partie nous ont été gracieusement fournies par Elisabeth Garanger (LCPO – Université de Bordeaux) et synthétisées lors d'une collaboration avec le groupe d'Ashutosh Chilkoti (Duke Univeristy).

4.1 Description et construction de la séquence

Les ELPs (*Elastin-Like Polypeptides*) sont des séquences d'acides aminés présentant des propriétés thermosensibles. Ce sont des bio-polymères constitués de la répétition du pentapeptide $-(Val-Pro-Gly-Xaa-Gly)-$ avec Xaa correspondant à n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline (Pro). De la même manière que pour le PNIPAM, l'une des caractéristiques principales de ces constructions polypeptidiques est leur caractère thermosensible en solution aqueuse. Au-delà d'une certaine température (également nommée LCST), les chaînes d'ELPs jusque là solubles et complètement hydratées vont changer de conformation pour former des globules insolubles et hydrophobes.

Plusieurs méthodes sont possibles pour la construction et la synthèse de telles séquences polypeptidiques et se sont perfectionnées avec les nombreuses avancées faites en biologie moléculaire. Ces perfectionnements ont été poussés par l'élargissement des domaines d'applications de ces bio-polymères s'étendant des matériaux biocompatibles à la création de vésicules de transport de médicaments [29,30]. L'une des plus récentes est la ligation directionnelle récursive par reconstruction de plasmide qui permet la construction de di-blocs d'ELPs tout en contrôlant de manière précise la taille de chaque partie [29,31]. Des plasmides sont alors introduits dans des bactéries compétentes qui sont ensuite cultivées pendant 24h produisant ainsi les bio-polymères qui sont ensuite purifiés [31].



Figure 12 : Séquence du di-bloc ELP utilisé. En rouge la cystéine terminale nécessaire à la fonctionnalisation avec un maléimide, en vert la répétition du pentapeptide (VPGVG) aux propriétés thermosensibles et en bleu le bloc hydrophile. La seconde extrémité est terminée par une séquence GPGGS et l'ensemble de la chaîne est neutre.

La séquence type du di-bloc utilisé est donnée en Figure 12 sur laquelle trois zones particulières sont à distinguer. Le bloc hydrophile est surligné en bleu et correspond à m répétitions de l'unité $-(VPGAGVPGGG)-$ (Bloc 1). C'est en réalité également une séquence présentant un caractère thermosensible, mais il est choisi de manière à ce que sa LCST soit supérieure à celle du second bloc, surligné en vert. Celui-ci est composé d'une séquence typique d'ELP $-(VPGVG)-$ (Bloc 2) et apporte le principal caractère thermosensible au bio-polymère. Enfin, l'extrémité du peptide contient une cystéine, surlignée en rouge, qui va donc contenir un thiol et permettre le greffage sur la surface du virus. L'ensemble de la chaîne, y compris la séquence finale (GPGGS) à son extrémité est neutre d'un point de vue électrolytique.

Les températures de transition des deux séquences sont essentiellement dépendantes du nombre de répétitions du monomère [29–31]. Afin de se placer dans des conditions similaires au PNIPAM, la longueur de chaîne du bloc 2 est fixée à 60 ($n = 60$), ce qui lui confère une LCST de 33 °C. Celle du bloc hydrophile est fixée à 30 ($m = 30$) et sa LCST est quant à elle supérieure à 55 °C, ce qui permet donc de travailler dans une plage de température suffisamment confortable pour laquelle l'élastine présente un caractère amphiphile.

Les masses molaires des deux blocs peuvent être calculées à partir des masses molaires individuelles de chaque acide aminé. Les masses molaires totales alors obtenues sont similaires : 29.974 kg/mol pour le bloc 2 et 27.870 kg/mol pour le bloc 1. Au total, l'élastine utilisée a une masse molaire $M_{w,ELP} = 58.955$ kg/mol.

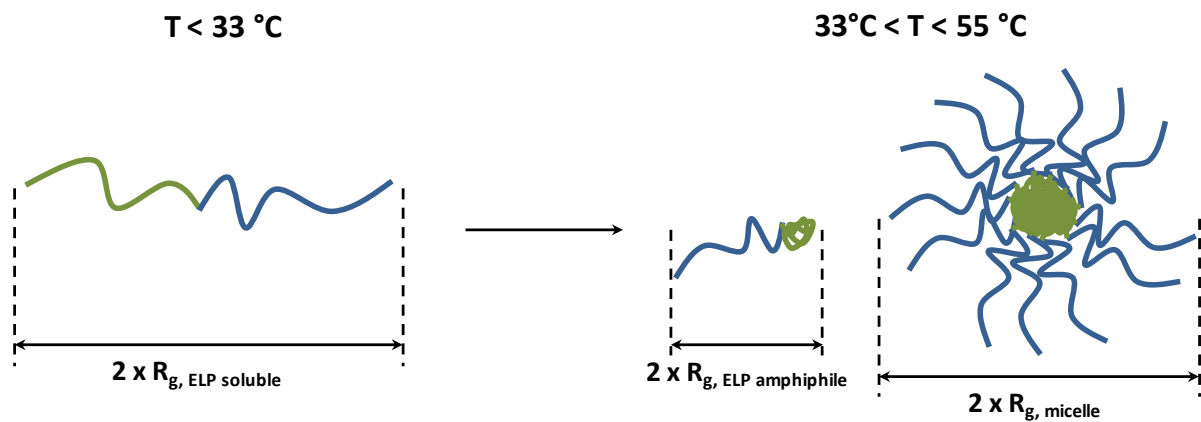


Figure 13 : Illustration des différents rayons de giration des ELPs. A gauche ($T < 33\text{ °C}$) les deux blocs sont hydrophiles et le rayon de giration mesurable en diffusion de la lumière est donc directement $R_{g, ELP\ soluble}$. A droite, lorsque la température est intermédiaire entre les LCST des deux blocs ($33\text{ °C} < T < 55\text{ °C}$), seul le bloc thermosensible (bloc 2) va changer de conformation faisant ainsi varier le rayon de giration de l'ELP qui vaut alors $R_{g, ELP\ amphiphile}$. Du fait du caractère amphiphile des élastines, elles vont alors former des micelles en solution dont le rayon de giration, $R_{g, micelle}$, est celui mesurable en diffusion de la lumière [31].

A basse température (en dessous de la LCST du premier bloc), lorsque celle-ci est complètement soluble, le rayon de giration (R_g) de l'ELP en solution est donné par la relation [31]:

$$R_{g,ELP\ soluble} = 5.05 \times 10^{-2} \times M_{w,ELP}^{0.486} \quad nm \quad (31)$$

Dans le cas de l'ELP décrite plus haut le rayon de giration obtenu est : $R_{g, ELP\ soluble} = 10.5$ nm.

Entre les deux températures critiques ($33\text{ °C} < T < 55\text{ °C}$), le bloc 2 va se trouver sous sa forme globulaire hydrophobe tandis que le bloc 1 sera maintenu hydrophile. Le caractère amphiphile du polypeptide va donc entraîner la formation de micelles dispersées en solution. Le rayon de giration de ces micelles est mesurable expérimentalement par diffusion de la lumière et correspond empiriquement au rayon de giration de l'élastine en bon solvant multiplié d'un facteur 1.5 [31]:

$$R_{g,micelle} = 1.5 \times R_{g,ELP\ soluble} \quad (32)$$

Le rayon de giration d'une ELP amphiphile libre peut donc être approximé comme étant ce rayon de giration de micelle divisé par deux, ce qui donne au final :

$$R_{g,ELP\ amphiphile} = 3.79 \times 10^{-2} \times M_{w,ELP}^{0.486} \quad nm \quad (33)$$

Dans le cas de notre séquence polypeptidique, le rayon de giration obtenu est : $R_{g,ELP, amphiphile} = 7.9$ nm. La variation de rayon de giration (ΔR_g) ainsi obtenue est d'environ 2.6 nm, ce qui sera à comparer aux valeurs de la Figure 6 une fois la concentration à l'isotrope-nématique du système de virus greffé avec des ELPs connue. Il est à noter tout de même que ce ΔR_g correspond à environ 50 % de la taille du bloc 2 (représentant la moitié de l'ELP totale), ce qui est cohérent avec les observations faites pour des polymères thermosensibles classiques tels que le PNIPAM [28].

4.2 Fonctionnalisation et transition isotrope-nématique

Dans le protocole détaillé en partie 2, un excès de 1 ELP par protéine est pris afin de fonctionnaliser le virus fd-Y21M. Après purification, le système est dilué jusqu'à se trouver dans le domaine de concentration correspondant à sa transition isotrope-nématique qui est mesurée à 8 mg/ml.

Il est important de noter que cette mesure correspond en réalité à une surestimation de la concentration en virus. En effet, au contraire de polymères tels que le PEG ou le PNIPAM, les élastines sont des polypeptides et vont donc absorber dans le même domaine de longueur d'onde que les virus (maximum à 269 nm pour les virus et à 280 nm pour les ELPs). Une fraction de l'absorption UV lue lors de la mesure de concentration correspond également aux ELPs et pas seulement au signal du fd-Y21M.

L'apparition de la phase liquide isotrope dans le système fd-Y21M-ELP se situe donc à une concentration maximale de 8 mg/ml. A cette concentration, une variation de 0.7 nm du rayon de giration du polymère est nécessaire afin d'induire la transition (Figure 6). Cependant, la surestimation lors de la mesure ne permet pas d'affirmer que le ΔR_g de l'ELP (2.6 nm) soit suffisant.

Sachant que le rayon de giration de l'ELP seule (10.5 nm) est supérieure à celui du PEG-20k seul (7 nm), on peut légitimement s'attendre à ce que la concentration à l'isotrope-nématique du système fd-Y21M-ELP soit proche de celle du fd-wt-PEG-20k, se situant aux alentours de 5 mg/ml (Figure 3) [11] et pour laquelle la variation du rayon de giration nécessaire est d'environ 1.1 nm.

De manière purement théorique, l'amplitude entre les deux rayons de giration est donc suffisante pour induire une transition isotrope-nématique. Expérimentalement, un échantillon à 8mg/ml est introduit dans un capillaire plat de 100 μ m d'épaisseur, scellé à la flamme. Sous un microscope à lumière polarisée, celui-ci est placé dans un four puis chauffé progressivement et l'évolution de sa texture est enregistrée. Les observations son montrées en Figure 14.

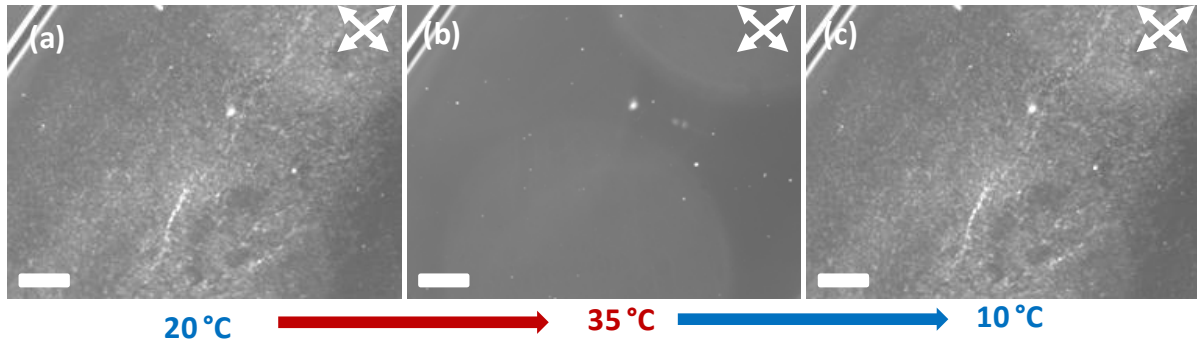


Figure 14 : Image de microscopie à lumière polarisée d'un échantillon de fd-Y21M-ELP à l'isotrope-nématique (8 mg/ml) et à une force ionique $I = 110$ mM (a) après préparation à 20°C, (b) après chauffage au dessus de la LCST du bloc thermosensible et (c) après refroidissement sous la LCST. Les barres d'échelle représentent 10 μm .

Après préparation et à température ambiante, l'échantillon présente une texture biréfringente (Figure 14-(a)) et se trouve donc à l'isotrope-nématique. Lorsqu'il est chauffé au-dessus de la LCST (Figure 14-(b)), la texture disparaît laissant place donc à une phase liquide isotrope pure. A l'inverse, une fois refroidi en-dessous de la LCST, la texture biréfringente est de nouveau visible (Figure 14-(c)).

Le système fd-Y21M-ELP subit donc bien un passage d'une phase nématique vers une phase liquide isotrope (et vice-versa) avec la température. L'enregistrement du phénomène, qui est synchronisé avec la rampe de chauffage ou de refroidissement du four (± 0.2 °C/min), permet de mesurer de manière précise les températures de transition (Figure 15).

Le phénomène présente une hystérèse large (environ 10 °C) ainsi qu'un décalage avec la LCST des élastines libres en solution. La fonctionnalisation des ELPs sur la surface des virus crée une augmentation de leur concentration locale et la diminution observée (de 33 °C pour les ELPs libres à 27 °C pour le système greffé) est donc cohérente avec les mesures de LCST diminuant avec l'augmentation de la concentration en élastines [29,30].

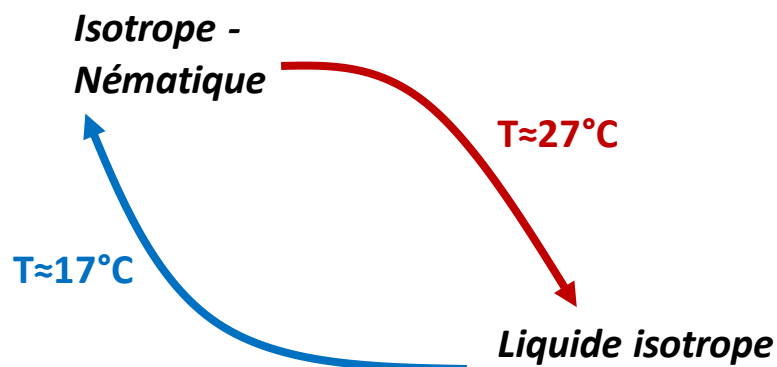


Figure 15 : Illustration schématique de l'hystérèse de la transition isotrope-nématique induite avec la température dans le système de fd-Y21M-ELP.

L'hystérèse quant à elle peut être simplement due à un phénomène cinétique, la relaxation des ELPs vers l'état hydrophile étant potentiellement ralentie par une gêne stérique entre chaînes. Ce type de comportement a déjà été observé dans le cas du PNIPAM

qu'il soit libre en solution ou bien greffé sur une surface [32–36]. L'hystérèse provient alors de l'enchevêtrement des chaînes polymères lorsqu'elles s'agrègent sous forme globulaire ou bien de la présence de liaisons hydrogènes inter-chaînes.

4.3 Discussion

Le système fd-Y21M-ELP montre donc les premiers signes de la possibilité d'induire une transition isotrope-nématique par la variation dynamique du diamètre effectif d'un bâtonnet par le changement de conformation d'un polymère greffé sur sa surface.

Le polymère en question est construit de manière particulière, en deux parties distinctes, celle la plus éloignée de la particule ayant pour rôle de rester constamment hydrophile afin d'éviter une transition sol-gel (ce qui est le cas avec le PNIPAM seul). L'utilisation ici d'élastines permet la construction de tels di-blocs par biologie moléculaire de manière simple ainsi que l'intégration directe du groupement thiol nécessaire à la fonctionnalisation.

L'abaissement significatif de la concentration à l'isotrope-nématique prouve le succès du greffage des ELPs sur la surface des virus. Une preuve supplémentaire de cette fonctionnalisation serait la réalisation de mesures de l'augmentation de l'indice de réfraction avec la concentration (dn/dc) [11] permettant de quantifier le nombre moyen d'élastines greffées par virus.

La comparaison entre la variation de rayon de giration attendue expérimentalement et celle nécessaire pour induire la transition isotrope-nématique est néanmoins approximative du fait de l'absorption des élastines dans le même domaine de longueur d'onde que les virus, causant une surestimation de la concentration de l'échantillon.

La montée en température s'accompagne du passage d'une phase nématique à un liquide isotrope et vice-versa lors de la descente. La mesure des températures de transition montre un décalage avec la LCST des ELPs libres ainsi qu'une hystérèse, deux phénomènes qui ont néanmoins déjà été relevés dans la littérature.

Cette transition est un phénomène reproductible et plusieurs cycles de chauffage/refroidissement sur le même échantillon vont amener aux mêmes observations. Cependant, l'échantillon est sensible au vieillissement et l'on observe au cours du temps la formation d'un état gélifié pouvant être attribué à de l'attraction progressive entre particules.

Des tentatives afin de reproduire le greffage de différentes ELPs sur le fd-Y21M ont été effectuées. Le succès de la fonctionnalisation repose principalement sur deux facteurs :

- la charge de l'élastine et notamment celle de son extrémité (*GPGGS* sur la Figure 12, qui est une séquence neutre). D'autres essais ont été effectués notamment avec des ELPs chargées positivement sans pour autant qu'il ait été possible de reproduire le comportement décrit précédemment, ni même d'être certain d'obtenir une fonctionnalisation qui soit chimique des particules et non pas due à des interactions électrostatiques (les virus étant chargés négativement).
- La conversion des amines des protéines du manteau du bactériophage en maléimides à l'aide d'un agent de couplage (le GMBS). La réaction doit être rapide

et des essais ont été effectués avec du sulfo-GMBS directement ajouté en solution aqueuse, sans être pré-dissout dans un solvant organique. Sa solubilité diminuant avec la force ionique rend cependant incertain sa dispersion dans le milieu réactionnel et l'utilisation du GMBS pré-dissout dans le DMSO s'est avérée plus efficace.

Même lorsque le greffage apparaît être un succès, l'obtention d'une transition de phase avec la température n'est pas pour autant garantie. Lors de nombreuses tentatives, pour lesquelles l'abaissement de la concentration à l'isotrope-nématique était net, le phénomène observé n'était pas une transition complète. Au contraire, uniquement une baisse de la biréfringence, cohérente avec une transition vers la phase isotrope, est visible puis le système reste figé au-delà d'une certaine température. Ces observations suggèrent une gélification du système avant l'apparition de la phase isotrope.

La perspective générale est donc de poursuivre avec l'utilisation d'élastines qui ont montré des résultats prometteurs. La construction de nouveaux di-blocs, plus spécifiques dans la taille de chacun des blocs et leurs charges, permettant d'éviter notamment les effets de gélification observés (au cours de la transition ou du vieillissement), pourrait alors mener à l'obtention d'un système plus fiable et d'étudier plus en détails le phénomène de transition. Son dopage avec des virus marqués en fluorescence ouvrirait également l'opportunité d'étudier la transition isotrope-nématique de manière dynamique à l'échelle de la particule individuelle.

Une seconde perspective à ces travaux est l'extension aux systèmes flexibles, tels que le fd-wt. En effet, le fd-Y21M a été utilisé ici préférentiellement du fait de sa plus grande longueur de persistance et de son indépendance vis-à-vis de la température. Cependant, le caractère semi-flexible du fd-wt lui confère une largeur du domaine de coexistence entre les phases isotrope et nématique plus faible et situé à des concentrations plus élevées et donc une transition plus sensible aux variations de diamètre effectif.

Même s'il conviendrait de décorrélérer les deux phénomènes avec la température (changement de flexibilité et de diamètre effectif), les variations de rayon de giration nécessaires pour induire la transition isotrope-nématique sont plus faibles que celles requises pour le fd-Y21M (Figure 6). Ainsi, l'utilisation du fd-wt permettrait de diminuer la taille des élastines à utiliser et ainsi d'éventuellement réduire les effets sol-gels observés.

5. Conclusion

Ce chapitre porte sur l'étude de la fonctionnalisation de virus avec des polymères thermosensibles. L'idée principale est ainsi de générer une variation dynamique du diamètre effectif de la particule pouvant ainsi mener à une transition entre deux phases cristallines (notamment les phases liquide isotrope et nématique).

Afin de réaliser la fonctionnalisation de tels composés sur la surface du fd-Y21M, nous adoptons une réaction en deux étapes successives. Dans un premier temps, l'utilisation d'un agent de couplage hétéro-bi-fonctionnel, le GMBS, permet la conversion des amines du manteau en maléimides. Les fonctions maléimides vont alors permettre la réaction avec les thiols (SH) présents comme fonction terminale sur les polymères.

Cette méthode présente l'avantage principal d'utiliser des polymères dont la fonction réactive est un thiol. Celui-ci est plus facilement intégrable lors de la synthèse de polymères complexes qu'un succinimide ester (NHS), qui est principalement utilisé pour les réactions impliquant des amines. De plus, les thiols sont présents naturellement puisque contenus dans un acide aminé, la cystéine. Ainsi, on les retrouve dans de nombreuses protéines et ils sont facilement intégrables dans des séquences de polypeptides artificielles. Un autre avantage est la stabilité plus importante et la facilité de conservations des composés activés par un thiol vis-à-vis de leurs homologues contenant un NHS ester dont la sensibilité à l'hydrolyse nécessite en effet un stockage sous atmosphère contrôlée (préférentiellement sous boîte à gants).

Les premiers essais ont été effectués sur un polymère bien connu, le PNIPAM, dont la fonctionnalisation avait déjà fait l'objet d'une étude dans la littérature. Le succès du greffage a été montré par l'abaissement de la concentration à la transition isotrope-nématique, cohérente avec une augmentation du diamètre effectif de la particule. Egalement, la transition sol-gel du système déjà observée a été reproduite. Bien que ces résultats valident le protocole utilisé, la gélification du système ne permet pas d'observer une transition de phase.

Pour surmonter ce problème, nous nous sommes donc intéressés à une nouvelle catégorie de polymères : les élastines (ELPs). Ces séquences polypeptidiques permettent l'obtention d'un bio-polymère en deux blocs dont l'un a pour vocation à rester hydrophile afin d'éviter l'effet sol-gel observé dans le cas du PNIPAM. L'abaissement significatif de la concentration à l'isotrope nématique montre une nouvelle fois le succès de la fonctionnalisation.

Cette fois-ci, le chauffage d'un échantillon proche de la transition isotrope-nématique aboutit à l'observation de la disparition de la texture biréfringente et sa réapparition lors du refroidissement. Il est à noter tout de même l'abaissement des températures de transition en comparaison des élastines ainsi qu'une large hystérèse, deux phénomènes déjà reportés dans la littérature.

Du fait du vieillissement de l'échantillon qui mène à la formation d'agrégats et une gélification partielle, ces résultats sont complexes à reproduire. D'autres tentatives de greffage ont été effectuées, mettant en évidence les principaux leviers pour son succès, notamment la charge de la chaîne polypeptidique ainsi que le succès de la conversion des amines en maléimides. Bien que des variations de biréfringence aient pu être observées lors d'autres essais, aucun n'a aboutit de nouveau à une transition isotrope-nématique complète.

Ces résultats sont néanmoins encourageants pour la poursuite de telles études en s'attachant principalement à optimiser ce système d'élastines. Il est également possible de réaliser la fonctionnalisation sur le fd-wt, au caractère semi-flexible, pour lequel les variations nécessaires du rayon de giration du polymère sont moins importantes. Cela permettrait alors d'étudier de nouveau le phénomène de transition en y apportant de nouveaux éclairages tels qu'une étude en microscopie de fluorescence afin de s'attacher à la dynamique du phénomène, sans oublier une étude similaire sur la transition nématique-smectique lorsqu'un système ayant une stabilité colloïdale sera obtenu.

Enfin, les élastines étant des séquences polypeptidiques, il est possible de les intégrer directement au virus en procédant à une modification par *phage display* de la protéine p8. Des travaux par Hathorne et Bermudez [37,38] ont réalisé l'ajout de séquences d'ELP similaires à celle que nous avons utilisée tout en conservant l'intégrité du phage et sa stabilité dans la limite cependant où la taille du bloc inséré est courte. Il serait néanmoins intéressant d'étudier de tels systèmes, en choisissant soigneusement la séquence insérée, qui permettraient alors peut-être de s'affranchir de toutes les étapes de fonctionnalisation chimique.

Bibliographie

- [1] E. Grelet, M. P. Lettinga, M. Bier, R. van Roij, and P. van der Schoot, *J. Phys. Condens. Matter* **20**, 494213 (2008).
- [2] M. P. Lettinga, Z. Dogic, H. Wang, and J. Vermant, *Langmuir* **21**, 8048 (2005).
- [3] M. P. Lettinga, E. Barry, and Z. Dogic, *Europhys. Lett. EPL* **71**, 692 (2005).
- [4] E. Pouget, E. Grelet, and M. P. Lettinga, *Phys. Rev. E* **84**, 041704 (2011).
- [5] M. P. Lettinga and E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **99**, 197802 (2007).
- [6] S. Naderi, E. Pouget, P. Ballesta, P. van der Schoot, M. P. Lettinga, and E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **111**, 037801 (2013).
- [7] F. Tombolato, A. Ferrarini, and E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 258302 (2006).
- [8] E. Barry, D. Beller, and Z. Dogic, *Soft Matter* **5**, 2563 (2009).
- [9] Z. Zhang and E. Grelet, *Soft Matter* **9**, 1015 (2013).
- [10] Z. Dogic and S. Fraden, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **359**, 997 (2001).
- [11] E. Grelet and S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 198302 (2003).
- [12] K. Devanand and J. C. Selser, *Macromolecules* **24**, 5943 (1991).
- [13] E. Grelet, *Phys. Rev. X* **4**, 021053 (2014).
- [14] Z. Zhang, N. Krishna, M. P. Lettinga, J. Vermant, and E. Grelet, *Langmuir* **25**, 2437 (2009).
- [15] K. R. Purdy, S. Varga, A. Galindo, G. Jackson, and S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 057801 (2005).
- [16] P. J. Flory and A. Abe, *Macromolecules* **11**, 1119 (1978).
- [17] H. N. W. Lekkerkerker, P. Coulon, R. Van Der Haegen, and R. Deblieck, *J. Chem. Phys.* **80**, 3427 (1984).
- [18] T. M. Birshtein, B. I. Kolegov, and V. A. Pryamitsyn, *Polym. Sci. USSR* **30**, 316 (1988).
- [19] C. K. Chiklis and J. M. Grasshoff, *J. Polym. Sci. Part -2 Polym. Phys.* **8**, 1617 (1970).
- [20] A. R. Khokhlov and A. N. Semenov, *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* **112**, 605 (1982).
- [21] Z. Y. Chen, *Macromolecules* **26**, 3419 (1993).
- [22] J. Tang and S. Fraden, *Biopolymers* **39**, 13 (1996).
- [23] J. M. Polson and D. Frenkel, *Phys. Rev. E* **56**, R6260 (1997).
- [24] P. Bolhuis and D. Frenkel, *J. Chem. Phys.* **106**, 666 (1997).
- [25] T. Gibaud, E. Barry, M. J. Zakhary, M. Henglin, A. Ward, Y. Yang, C. Berciu, R. Oldenbourg, M. F. Hagan, D. Nicastro, R. B. Meyer, and Z. Dogic, *Nature* **481**, 348 (2012).
- [26] G. Mattson, E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Savage, and S. Morgensen, *Mol. Biol. Rep.* **17**, 167 (1993).
- [27] K. Kubota, K. Hamano, N. Kuwahara, S. Fujishige, and I. Ando, *Polym. J.* **22**, 1051 (1990).
- [28] L. Feng, B. Laderman, S. Sacanna, and P. Chaikin, *Nat. Mater.* **14**, 61 (2015).
- [29] J. R. McDaniel, J. A. MacKay, F. G. Quiroz, and A. Chilkoti, *Biomacromolecules* **11**, 944 (2010).
- [30] A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, and D. Raucher, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 613 (2002).
- [31] E. Garanger, S. MacEwan, O. Sandre, A. Brûlet, L. Bataille, A. Chilkoti, and S. Lecommandoux, (To be published).
- [32] R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, M. J. H. C. Jochems, B. M. van Lankvelt, M. W. M. Fijten, and U. S. Schubert, *Chem. Commun.* 5758 (2008).
- [33] H. Cheng, L. Shen, and C. Wu, *Macromolecules* **39**, 2325 (2006).

- [34] P. Heinz, F. Brétagne, I. Mannelli, D. Gillil, H. Rauscher, and F. Rossi, *J. Phys. Conf. Ser.* **100**, 012033 (2008).
- [35] X. Wang, X. Qiu, and C. Wu, *Macromolecules* **31**, 2972 (1998).
- [36] X. Qiu, M. Li, C. M. S. Kwan, and C. Wu, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **36**, 1501 (1998).
- [37] A. P. Hathorne and H. Bermudez, *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1822 (2013).
- [38] H. Bermudez and A. P. Hathorne, *Faraday Discuss.* **139**, 327 (2008).

Chapitre 3 : Bio-fonctionnalisation régio-sélective du M13-C7C

1. Introduction à la bio-fonctionnalisation régio-sélective	66
2. Protocole de fonctionnalisation	67
2.1 Présentation du M13-C7C.....	67
2.2 Conditions générales de réaction	67
2.3 Réduction du pont disulfure	68
2.4 Fonctionnalisation avec un composé activé par un maléimide	68
3. Preuve de principe : fonctionnalisation avec des chromophores	69
3.1 Choix du chromophore et fonctionnalisation.....	69
3.2 Observation en phase smectique	69
3.3 Interactions hydrophobes et conséquences sur le diagramme de phase.....	70
3.4 Dislocations de la phase smectique.....	75
3.5 Résumé, conclusion et perspectives de la fonctionnalisation du M13-C7C avec des chromophores.....	78
4. Fonctionnalisation régio-spécifique du M13-C7C avec la biotine : formation d'auto-assemblages.....	79
4.1 Le couple biotine/avidine	79
4.2 Fonctionnalisation du M13-C7C avec la biotine	81
4.3 Formation de structures	81
4.3.a) Zoologie des auto-assemblages	81
4.3.b) Optimisation des conditions de réaction.....	83
4.4 Greffage de nanoparticules	85
5. Conclusions sur la fonctionnalisation chimique du M13-C7C.....	86
Bibliographie.....	90

1. Introduction à la bio-fonctionnalisation régio-sélective

Les divers travaux sur le virus fd et ses mutants ont montré le caractère modèle qu'ils représentent dans le domaine des cristaux liquides colloïdaux [1–3]. Les études structurales [4–6] et dynamiques [5,7–11] menées ont ainsi permis d'établir les limites du diagramme de phase ainsi que la diffusion à l'échelle de la particule individuelle tout en montrant un accord qualitatif avec les prédictions théoriques [1,6].

L'une des évolutions du système réside dorénavant dans son intégration en tant que brique de base dans la construction de nouveaux auto-assemblages [12–14]. Cette idée repose principalement sur l'ajout de fonctions sur la particule et ce de manière régio-sélective.

Pour cela, une voie biochimique peut être explorée et consiste à exploiter la particularité d'un des mutants du fd-wt, le M13-C7C. Comme expliqué dans le Chapitre 1, ce mutant a été isolé par des techniques de *phage display* par New England Biolabs et sa particularité est de posséder une séquence composée de 7 acides aminés aléatoires flanqués de deux cystéines [15]. Cette séquence est exprimée sur les 5 protéines p3 situées à l'une des extrémités du virus.

Parmi la vingtaine d'acides aminés existant, la cystéine se distingue des autres puisqu'il est le seul à posséder une fonction thiol (SH). Les deux cystéines ainsi exprimées sur la protéine p3 sont alors reliées par un pont disulfure. Ces ponts sont très communs dans les protéines et permettent notamment de fixer leurs conformations. L'apparition de 10 fonctions thiols (2 pour les 5 protéines p3 du phage) uniquement présentes à l'extrémité du bactériophage va alors ouvrir la voie pour une chimie régio-sélective du fait de la spécificité de la chimie associée au thiol.

Le maléimide notamment est un composé connu pour former, dans des conditions particulières de pH, une liaison thioether stable par une réaction d'alkylation (voir Chapitre 1) [16]. Cette chimie spécifique, détaillée par la suite, va donc permettre l'ajout de groupes fonctionnels de manière localisée sur le virus et sur lesquels il va être possible de s'appuyer dans la construction de nouveaux auto-assemblages.

Ce chapitre va donc présenter cette approche biochimique, avec le détail des étapes aboutissant à la fonctionnalisation de l'extrémité du M13-C7C. Le premier système étudié sera celui de phages dont l'extrémité a été greffée par des chromophores, apportant dans un premier temps une preuve de principe du fonctionnement du protocole mis au point. Ensuite, un diagramme de phase complet sera présenté, influencé par l'apparition d'interactions entre particules, en s'appuyant notamment sur des observations en microscopie de fluorescence ainsi que la mise en évidence des défauts de la phase smectique.

La même méthodologie est ensuite appliquée pour greffer cette fois-ci de la biotine (activée par un maléimide), un composé moléculaire dont l'affinité avec la protéine avidine (et ses dérivés) donne lieu à l'interaction non-covalente connue la plus forte. Ces dérivés présentent quatre sites de fixation et vont alors permettre l'interaction entre plusieurs virus et la formation de structures auto-assemblées.

2. Protocole de fonctionnalisation

2.1 Présentation du M13-C7C

Le M13-C7C est un mutant isolé par des techniques de *phage display* par New England Biolabs [15] et disponible commercialement. Une représentation de sa structure est donnée en Figure 1.



Figure 1 : Structure du mutant M13-C7C avec la séquence d'acides aminés insérée sur la protéine p3. Le X₇ correspond à une série aléatoire de 7 acides aminés séparant les deux cystéines (C) liées de manière cyclique [15].

Le M13-C7C est un vecteur phage qui ne nécessite donc aucun phage auxiliaire pour sa production qui s'effectue par des méthodes biologiques standards [17] (voir description du *phage display* dans le Chapitre 4). L'expression de la séquence d'acides aminés sur la protéine p3 présentée en Figure 1 est donc totale et peut être vérifiée par séquençage de l'ADN. Aussi, la protéine p3 étant celle servant à la fixation du phage sur la bactérie lors de l'infection, il est important de noter que sa modification peut engendrer une diminution du rendement des productions. L'un des facteurs importants (avec la charge, le caractère hydrophobe, etc... de la séquence) est la taille de l'insert, et pour des séquences dépassant les cinquante acides aminés, l'infectiosité du phage est alors nulle [15]. Dans le cas du M13-C7C (voir Figure 1), l'insert possède 14 acides aminés ce qui permet au virus de conserver son caractère infectieux.

2.2 Conditions générales de réaction

La réalisation d'une fonctionnalisation spécifique à l'extrémité du virus se fait par la réaction entre les thiols (SH) des cystéines présentes sur la p3 du M13-C7C et un composé activé par un maléimide. Afin qu'elle soit efficace et sélective, plusieurs conditions sont nécessaires.

Le pH est un point essentiel. En effet, le maléimide est un composé susceptible de réagir également avec les amines primaires (NH₂) qui sont présentes en large majorité sur le corps du virus. Le choix du pH est donc un compromis entre efficacité et spécificité de la réaction (voir Chapitre 1) et dans notre cas, nous faisons le choix de la sélectivité, et nous choisissons donc un tampon phosphate (PBS) à un **pH de 6.5**.

Le deuxième paramètre est la force ionique (I) qui permet de contrôler la portée de la répulsion électrostatique entre virus et la longueur de Debye qui fixe la taille de la double couche électrique autour des particules. Quelle que soit la fonctionnalisation, il est en général souhaitable de rendre la particule le plus accessible possible et donc de maximiser la force ionique, dans les limites où cela n'impacte pas la stabilité colloïdale des phages ou la

solubilité des espèces moléculaires. Dans notre cas, elle est donc ajustée par ajout de chlorure de sodium (NaCl) et fixée à **I = 350 mM**.

L'une des considérations essentielles repose également sur la nature des thiols présents sur les protéines p3. Ils se trouvent sous forme pontée (Figure 1) et non réactive et la première étape de la fonctionnalisation consiste donc en la rupture de ces ponts disulfures. Cette réaction de réduction est cependant réversible et la présence d'oxydants en solution peut permettre la reformation des liaisons entre soufres les rendant ainsi inactifs.

Les conditions de réactions sont donc choisies afin de minimiser la présence d'espèces oxydantes et ce de diverses manières. Premièrement, les tampons sont **dégazés** afin d'éliminer l'oxygène dissout pouvant agir comme oxydant [18]. Pour les mêmes raisons, l'ajout **d'1 mM d'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA)** permet de complexer et neutraliser d'éventuels ions métalliques en solution [18]. Enfin, certains composés nécessitent d'être dissouts dans un solvant organique afin de faciliter leur incorporation en solution, et dans ce cas, le **diméthylsulfoxyde (DMSO)** au caractère oxydant [19] **est proscrit** et le **N,N-diméthylformamide (DMF)** lui est préféré.

2.3 Réduction du pont disulfure

La réduction du pont disulfure se fait par l'utilisation du Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) qui présente l'avantage d'être un composé ne possédant lui-même aucune fonction thiol (au contraire d'autres molécules couramment utilisés tels que le dithiothréitol (DTT) ou le 2-mercaptoethanol (2-ME)) ce qui minimise donc les possibilités de contamination pour les étapes suivantes [18].

La concentration en virus est choisie aux alentours de 2 mg/ml et la quantité de TCEP n'est pas choisie comme un excès vis-à-vis du nombre de virus à fonctionnaliser mais sa concentration est fixée à **10 mM**. Le mélange est placé sous argon, protégé de la lumière et est ensuite incubé pendant un minimum d'1 heure (dans notre cas environ 3 heures) dans un bain marie à 42 °C [18].

A la fin de l'incubation, les virus sont purifiés par déplétion en ajoutant au mélange 1/5^{ème} de son volume d'une solution de PEG/NaCl (200 g/L de Poly(ethylene glycol) ($M_w = 8$ kg/mol) et 2.5 M de chlorure de sodium). Après centrifugation à 13 500 g pendant 20 minutes, ils sont ensuite redispersés dans un tampon identique (PBS – pH = 6.5 – I = 350 mM + 1 mM d'EDTA). Le tampon et la solution déplétante sont tous les deux dégazés avant leur utilisation et le cycle est répété deux fois.

2.4 Fonctionnalisation avec un composé activé par un maléimide

Après purification des excès de TCEP, la solution de virus est diluée entre 1 et 2 mg/ml. Le composé activé par un maléimide est pré-dissout dans le tampon ou dans du DMF. L'excès molaire est un paramètre à ajuster (typiquement entre 1 et 100), et la quantité nécessaire de produit est rajoutée goutte à goutte. Le mélange est ensuite placé sous argon, protégé de la lumière et agité à température ambiante (fixée à 23 °C par climatisation) pendant 2 heures.

La réaction est alors stoppée par l'ajout d'un excès de 2-mercaptoéthylamine (2-ME) (excès molaire de 2 par rapport à la quantité de maléimides ajoutés). Les thiols présents sur la molécule de 2-ME vont ainsi venir saturer les maléimides, les rendant ainsi inactifs et empêchant la réaction de se poursuivre, ou d'autres réactions parasites (avec les amines notamment) de se produire lors des étapes de purification.

Après 5 minutes d'incubation, la solution est dialysée extensivement (à 4°C) contre un tampon moins salé (PBS – pH = 7.0 – 7.5 – I = 5 – 200mM) afin d'éliminer les excès de réactifs et conserver la stabilité colloïdale. Après dialyse, une purification est effectuée (centrifugation à 15 000 g pendant 45 minutes) afin de séparer les éventuels agrégats ayant pu se former et/ou les bactéries ayant pu se développer. Enfin, la solution peut également être reconcentrée par ultracentrifugation (200 000 g pendant 3 heures).

3. Preuve de principe : fonctionnalisation avec des chromophores

3.1 Choix du chromophore et fonctionnalisation

Le chromophore utilisé est le Dylight550 activé par un maléimide ($M_w = 1065$ g/mol) fourni par Life Technologies. Le composé n'est pas directement soluble en solution aqueuse et il est donc dissout dans du DMF afin de faciliter son incorporation à la solution. Un excès molaire de **20** chromophores par SH présent sur le M13-C7C est choisi (soit 200 par virus).

Après dialyse, l'échantillon est purifié par centrifugation et ultracentrifugation jusqu'à ce que le surnageant apparaisse clair, signe de l'élimination des chromophores libres en solution.

3.2 Observation en phase smectique

Afin d'observer la localisation des chromophores sur le virus, ceux-ci sont reconcentrés jusqu'à ce que la phase smectique soit atteinte. En effet, l'organisation en couches dans cette phase va faciliter l'identification des zones du virus sur lesquels la fonctionnalisation s'est effectuée (Figure 2).

Puisqu'uniquement l'extrémité du virus est fonctionnalisée, c'est donc l'espace inter-couches qui va ressortir lors des observations en microscopie de fluorescence. Ces observations peuvent être également couplées avec des observations en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC), faisant ressortir les gradients d'indice de réfraction et donc soulignant les interfaces virus/solvant i.e. les espaces entre les couches.

La Figure 3 illustre la comparaison des clichés effectués en fluorescence ou en DIC sur une même région de l'échantillon et qui montrent une structure lamellaire identique. L'espace inter-couche apparaît de manière claire en fluorescence (Figure 3 – à gauche) attestant donc de la localisation spécifique des chromophores à l'extrémité des bâtonnets comme illustré en Figure 2.

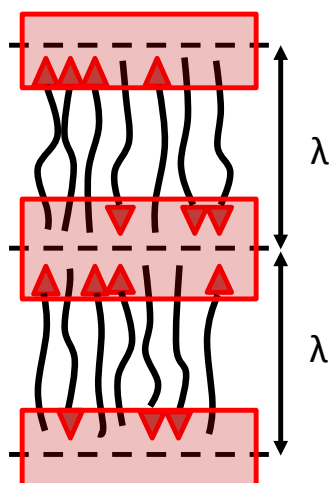


Figure 2 : Illustration schématique de la localisation des chromophores dans le cas d'une phase smectique (λ représente la périodicité de la phase lamellaire). Puisque seule l'extrémité du M13-C7C a réagi à la fonctionnalisation, l'organisation lamellaire des virus va donc faire ressortir les espaces inter-couches qui seront les seules zones à apparaître lors de l'observation en microscopie de fluorescence.

Cette expérience est donc, dans un premier temps, une preuve de principe visuelle du protocole détaillé précédemment montrant donc la possibilité de conjuguer des espèces moléculaires de manière régio-sélective sur le virus.

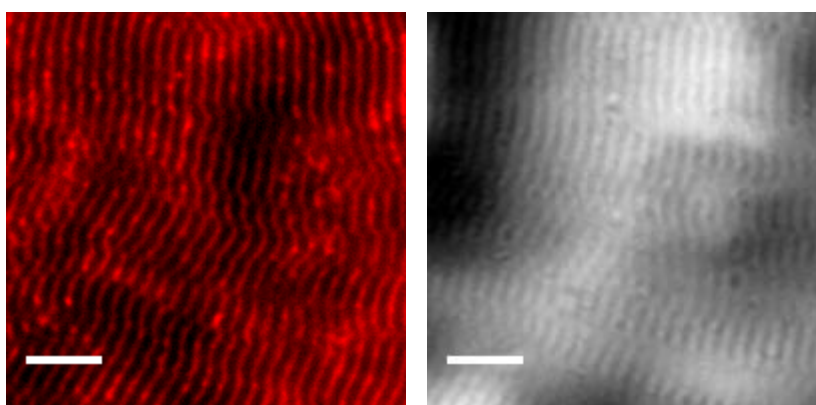


Figure 3 : Cliché de microscopie de fluorescence (à gauche) et de microscopie DIC (à droite) d'une même zone d'un échantillon de M13-C7C fonctionnalisé avec un chromophore en phase smectique. Les couches observables en DIC sont également observables en fluorescence grâce aux chromophores localisés dans l'espace inter-couches (comme explicité sur la Figure 2). La comparaison des deux clichés montre donc la régio-localisation des molécules greffées sur le virus. Les barres d'échelle représentent 5 μm .

La comparaison de la résolution des deux techniques (DIC et fluorescence) peut également être comparée en traçant l'évolution de l'intensité suivant une ligne tracée perpendiculaire aux couches. Le résultat est montré en Figure 4.

Il est alors possible d'observer des pics, permettant d'identifier la périodicité de la phase smectique, et que ces derniers sont plus fins en microscopie de fluorescence qu'en microscopie DIC (largeur à mi-hauteur typique de $\sim 0.35 \mu\text{m}$ en fluorescence contre $\sim 0.7 \mu\text{m}$ en DIC) et plus amples. La résolution lors de l'observation de la phase smectique est donc améliorée en microscopie de fluorescence en comparaison avec le contraste interférentiel.

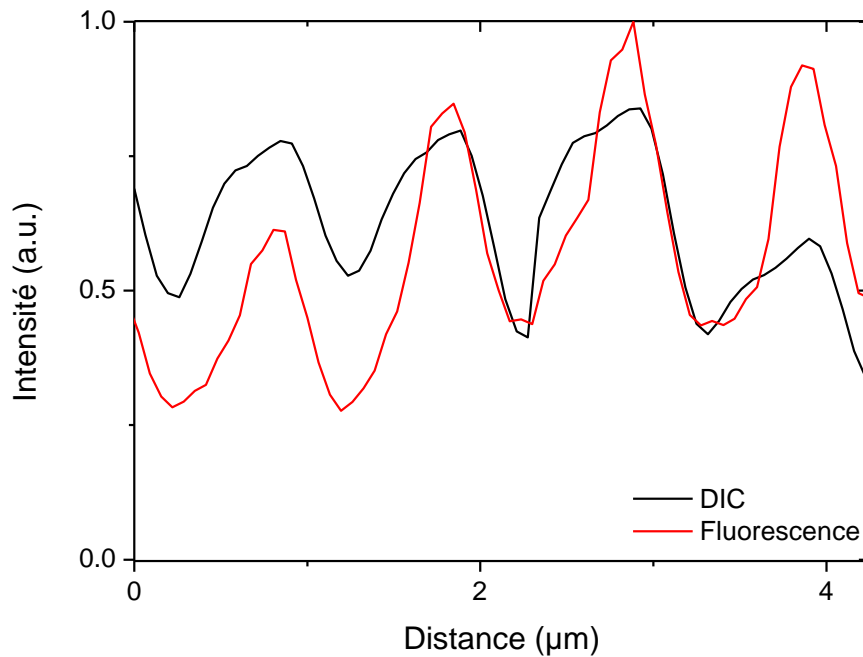


Figure 4 : Comparaison de l'évolution de l'intensité suivant une ligne perpendiculaire aux couches smectiques entre la microscopie DIC et la microscopie de fluorescence.

3.3 Interactions hydrophobes et conséquences sur le diagramme de phase

Les chromophores, du fait de la présence de cycles aromatiques, ne sont de manière générale pas solubles en solution aqueuse (d'où leur dissolution dans un solvant organique afin de permettre leur incorporation lors de la fonctionnalisation), et leur présence à l'extrémité des particules est susceptible d'agir comme un *patch* hydrophobe et donc de créer des interactions attractives entre les extrémités des phages.

Il est possible de visualiser ces interactions en observant les virus en Microscopie Electronique à Transmission (MET). Les virus en conditions diluées (10^{-3} mg/ml) sont alors déposés sur une grille Formvar/Carbone rendue hydrophile par traitement plasma puis contrasté par l'utilisation d'acétate d'uranyle (solution à 2% en masse).

Au contraire des virus purs qui sont bien isolés et répartis sur la surface de la grille, les échantillons fonctionnalisés et préparés dans les mêmes conditions vont présenter également une population de structures telles que celle montrée en Figure 5. La proportion de virus se trouvant dans ces agrégats représente un tiers de l'échantillon (statistique effectuée sur une population de $N = 196$ phages). De manière assez claire, les particules sont reliées par leurs extrémités et forment un agrégat dont la géométrie illustre également le caractère régio-sélectif de la fonctionnalisation.

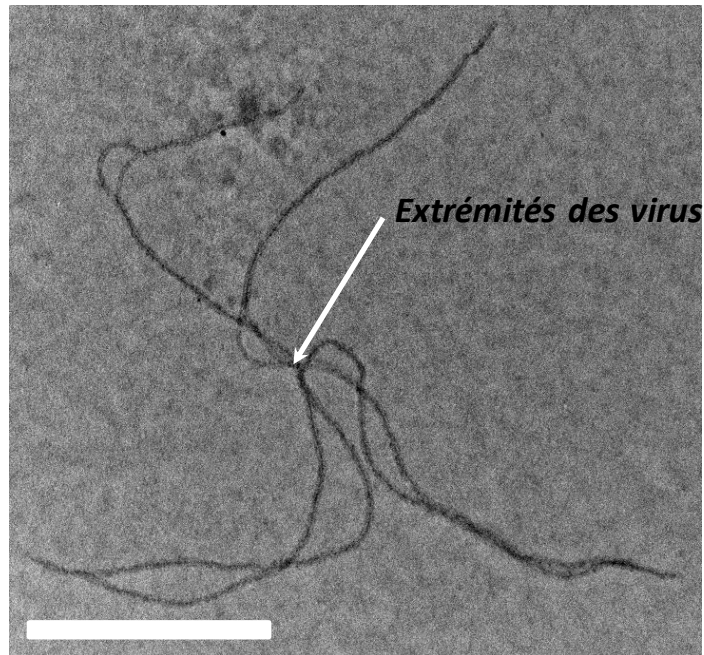


Figure 5 : Cliché MET de virus liés par leur extrémité fonctionnalisée par des chromophores partiellement hydrophobes (indiquée par une flèche). La barre d'échelle représente 500 nm.

Ces interactions sont inévitablement également présentes dans les phases concentrées de virus (dans lesquelles elles sont plus susceptibles de se produire du fait de la plus grande proximité des phages) et vont donc certainement avoir une influence sur leur auto-organisation. Lors de la dilution progressive du système depuis la phase smectique, des observations régulières en microscopie de fluorescence vont permettre de mettre en évidence ce phénomène.

L'échantillon est dialysé dans un tampon TRIS-HCl contenant de l'azoture de sodium NaN_3 (afin de prévenir le développement de bactéries) ($\text{pH} = 7.5 - I = 12.5 \text{ mM}$). Dans ces conditions de force ionique, le domaine d'existence de la phase smectique se situe entre 90 et 120 mg/ml pour le virus fd-wt [6]. Le diagramme de phase du M13-C7C fonctionnalisé par des chromophores est illustré par des clichés de microscopie en Figure 6.

La fonctionnalisation régio-sélective du virus et l'observation en microscopie de fluorescence mettent alors en évidence la persistance d'une organisation lamellaire jusqu'à un domaine de concentration dilué (30 – 40 mg/ml). La microscopie DIC quant à elle ne permet pas la visualisation de cette structure périodique au-delà de la phase smectique, ce qui peut être attribué au caractère perturbé de l'organisation lamellaire dans l'épaisseur totale de l'échantillon qui diminue ainsi le contraste apporté par cette technique.

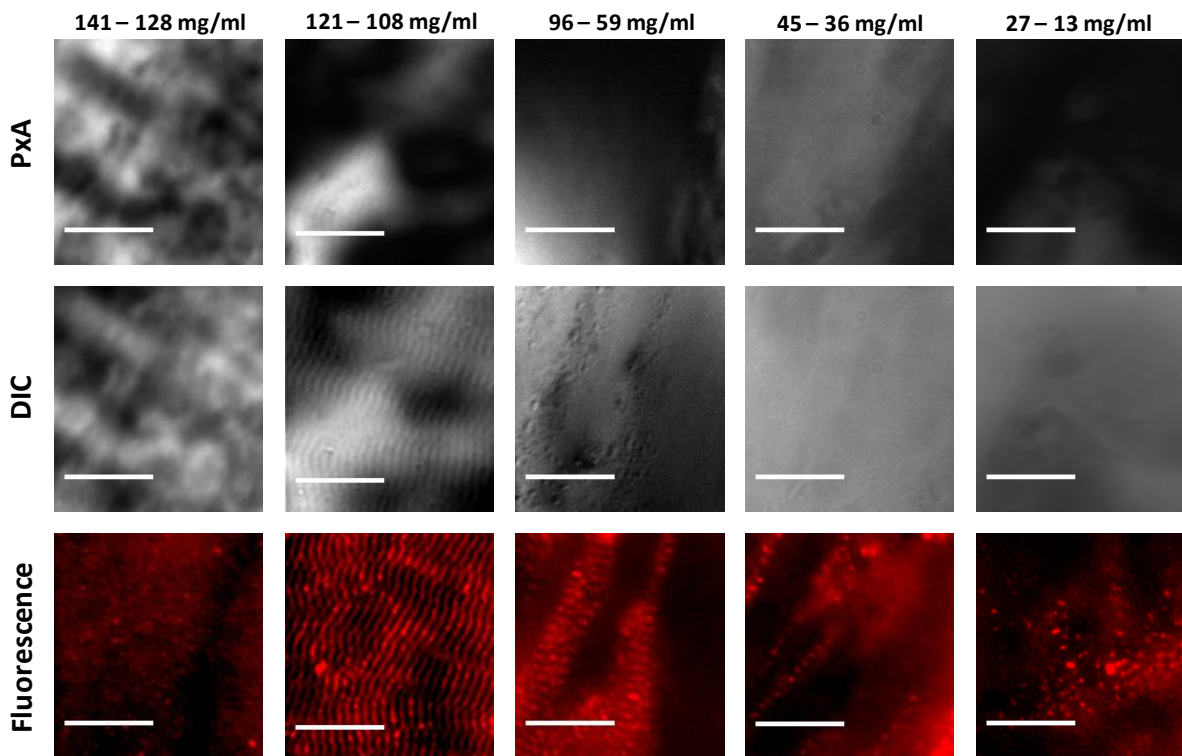


Figure 6 : Illustration du diagramme de phase du M13-C7C fonctionnalisé par le Dylight550. Pour chaque domaine de concentration le résultat de l'observation de la même zone est montré en microscopie entre polariseur et analyseur croisés (PxA – en haut), en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC – au centre) et en microscopie de fluorescence (en bas). Les barres d'échelle représentent 10 μm .

Il est possible d'analyser les clichés réalisés afin de mesurer la périodicité de l'organisation lamellaire à chaque concentration. Le résultat de ces mesures est présenté en Figure 7.

Comme déjà observé dans les phases smectiques du fd-wt et du fd-Y21M [6], la périodicité de l'arrangement lamellaire augmente lorsque la concentration diminue. Ce gonflement continue au-delà de la phase smectique (identifiée en microscopie DIC et dont le domaine d'existence est indiqué par les lignes verticales sur la Figure 7) jusqu'à la disparition complète des couches en dessous de 35 mg/ml. Il est à noter également qu'une périodicité peut être observée uniquement en fluorescence au-delà de 125 mg/ml, lorsque le système se rapproche de la transition entre le colonnaire hexagonal et le smectique.

Afin de visualiser la structure de cette organisation lamellaire persistante à des concentrations inférieures au domaine de la phase smectique, une fraction de M13-C7C fonctionnalisés à leur extrémité par du Dylight550 est à nouveau marquée en fluorescence mais cette fois sur le corps du virus (protéine p8) et par de la fluorescéine. Cette réaction s'appuie donc sur la chimie entre les amines et de la fluorescéine activée par un succinimide ester (Fluorescéine-NHS, Thermo Scientific) et est réalisée dans un tampon phosphate à pH 7.8 (PBS – pH = 7.8 – I = 350 mM) pendant 2 heures. Les virus sont ensuite purifiés par dialyse et par déplétion et redispersés dans un tampon TRIS-HCl (pH = 7.5 – I = 12.5 mM).

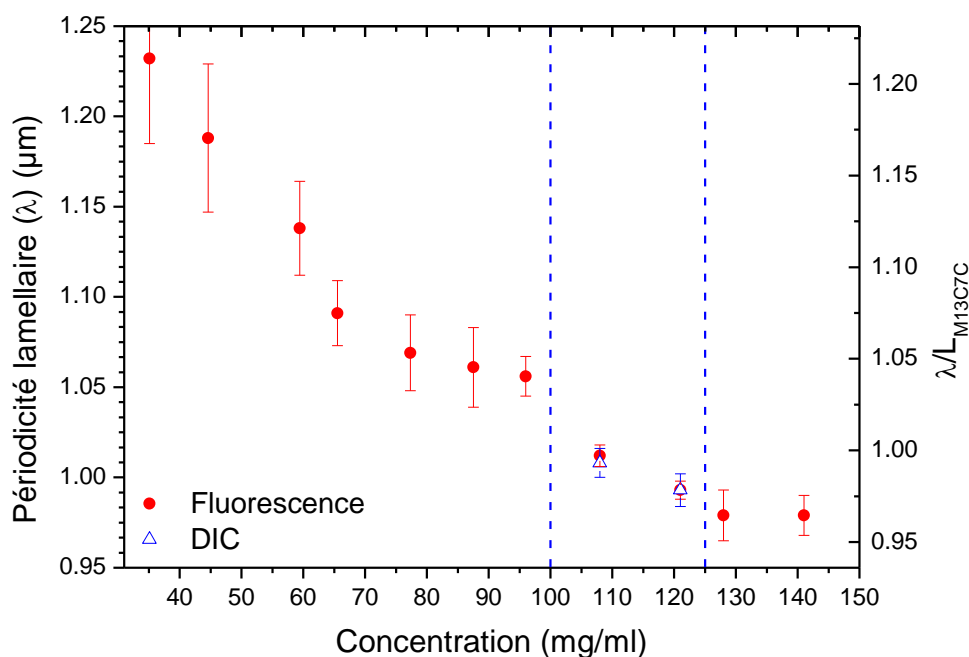


Figure 7 : Mesure de la périodicité lamellaire (λ) en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC) (triangles) et de fluorescence (cercles) pour différentes concentrations. Le domaine de concentration de la phase smectique tel qu'identifié en microscopie DIC, est indiqué par les lignes verticales.

Une fraction des phages doublement marqués (fluorescéine sur le corps / Dylight550 à l'extrémité) est alors utilisée pour doper la matrice de M13-C7C-Dylight550. L'observation successive aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission spécifique à chaque chromophore permet d'obtenir la superposition montrée en Figure 8.

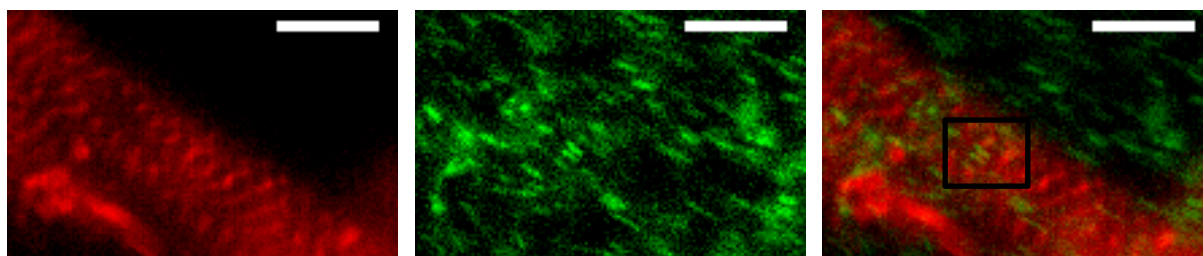


Figure 8 : Clichés de microscopie de fluorescence dans les conditions de longueur d'onde d'excitation et d'émission du Dylight550 (à gauche), de la fluorescéine (au centre) et leur superposition (à droite) montrant la localisation des phages dans la phase lamellaire observée à une concentration $C = 77.3$ mg/ml dans un échantillon de M13-C7C-Dylight550 (couleur rouge) dopé par une fraction de virus marqués avec de la fluorescéine (couleur verte). Il est alors possible d'identifier l'orientation des virus qui se trouve être perpendiculaire aux couches (encadré noir). Les barres d'échelle représentent $5 \mu\text{m}$.

De manière assez nette, les virus marqués par de la fluorescéine (visibles en vert sur la Figure 8) sont orientés de manière perpendiculaire aux couches dessinées par la matrice de phages dont uniquement l'extrémité est fonctionnalisée par le Dylight550 (en rouge sur la Figure 8). Cette observation va donc dans le sens d'une persistance de la phase smectique à des concentrations inférieures à son domaine d'existence. La périodicité de l'organisation lamellaire augmente au fur et à mesure que la concentration diminue jusqu'à ce qu'elle ne soit plus observable. Quelques événements de diffusion par "sauts" dans la phase lamellaire sont visibles comme cela a pu être reporté dans la littérature [11].

L'origine de ce phénomène réside principalement dans la nature du chromophore utilisé. Le Dylight550 possède une structure proche de la rhodamine et donc contient plusieurs cycles aromatiques le rendant donc potentiellement hydrophobe. Sa forte concentration locale à l'extrémité du virus (au maximum 10 chromophores) est alors susceptible d'y créer un "patch" hydrophobe amenant alors une affinité accrue et localisée entre les phages et la probabilité d'interactions va peu à peu diminuer lorsque l'échantillon est dilué.

A l'extrémité du diagramme de phase, la concentration à laquelle s'effectue la transition entre le liquide isotrope et le nématique (I-N) a également été déterminée. Sur un échantillon macroscopiquement séparé de phase, la mesure du domaine I-N donne : 12.0 – 12.8 mg/ml pour le M13-C7C-Dylight550. A titre de comparaison, un échantillon pur de M13-C7C dilué dans le même tampon (TRIS-HCl – pH = 7.5 – I = 12.5 mM) possède un domaine de coexistence similaire : 12.8 – 13.4 mg/ml. Les interactions attractives hydrophobes n'ont donc plus d'influence significative sur l'auto-organisation du système.

3.4 Dislocations de la phase smectique

Comme illustré en Figure 3 et Figure 6, la fonctionnalisation régio-sélective des M13-C7C à leur extrémité par des chromophores nous offre une visualisation de la phase smectique en microscopie de fluorescence. La localisation très spécifique des chromophores dans l'espace inter-couches permet d'obtenir une résolution suffisamment importante qui nous permet alors de nous intéresser aux défauts de l'organisation lamellaire.

Pour ce faire, un empilement d'images dans la profondeur (z) d'un échantillon de M13-C7C-Dylight550 à une concentration $C = 108$ mg/ml (tampon TRIS-HCl – pH = 7.5 – I = 12.5 mM) est réalisé en microscopie de fluorescence confocale. Il est alors possible d'identifier deux types de dislocations.

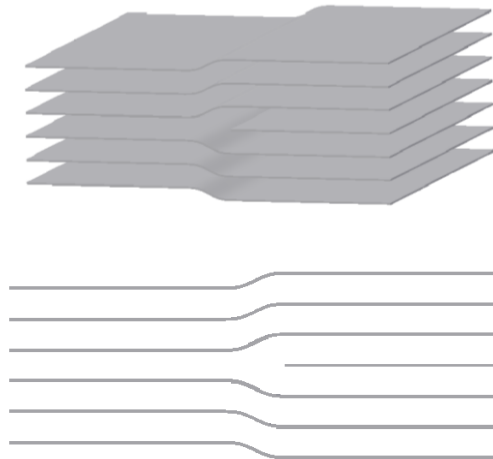


Figure 9 : Illustration d'une dislocation de type coin dans une phase smectique obtenue grâce au logiciel AutoDesk. Ce défaut consiste en l'ajout d'une couche supplémentaire dans la structure lamellaire.

Dans un premier temps, les dislocations de type coin correspondent à une rupture de la symétrie de translation de la structure lamellaire par l'addition d'une couche supplémentaire (Figure 9).

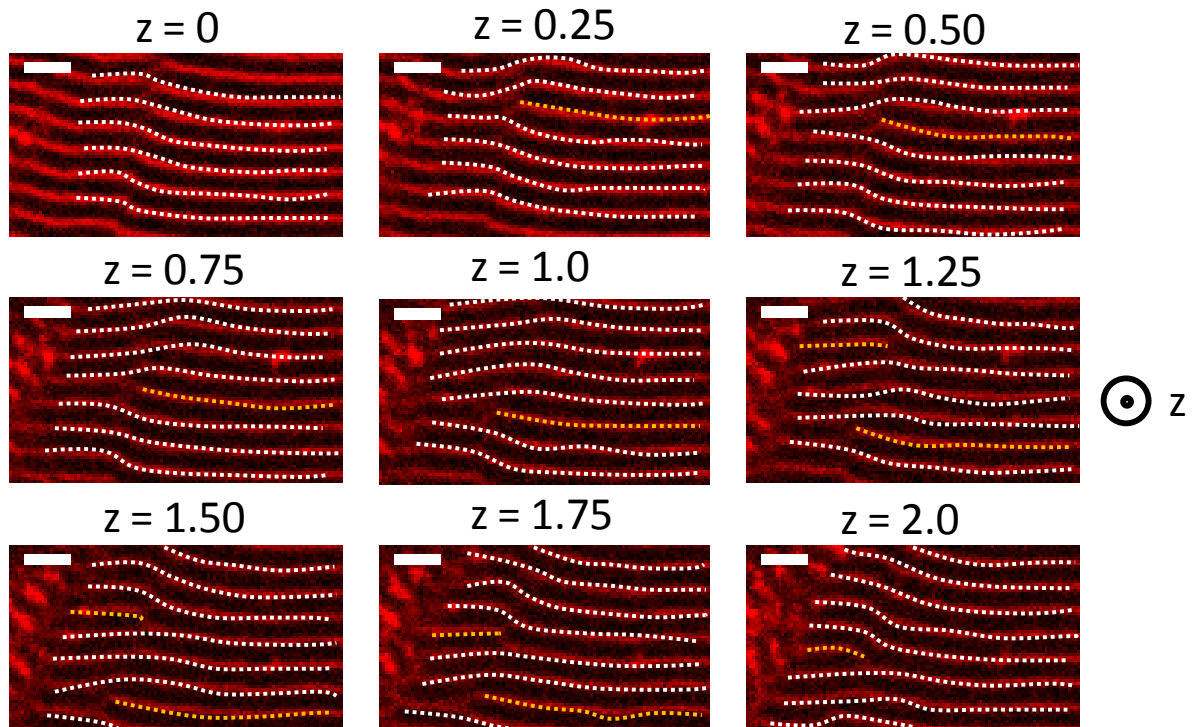


Figure 10 : Clichés de microscopie de fluorescence confocale montrant l'apparition d'une succession de dislocations de type coin dans la structure lamellaire : les couches supplémentaires sont surlignées en orange. La profondeur à laquelle les images ont été prises dans l'échantillon (z) est indiquée en μm . Les barres d'échelle représentent $2\ \mu\text{m}$.

La Figure 10 montre un empilement de clichés de microscopie de fluorescence confocale réalisé dans notre échantillon d'une zone où la structure lamellaire présente une succession de dislocations de type coin. Au fur et à mesure du déroulement des images, il est en effet possible de mettre en évidence l'apparition d'une couche supplémentaire (surlignée en orange) dans l'empilement lamellaire.

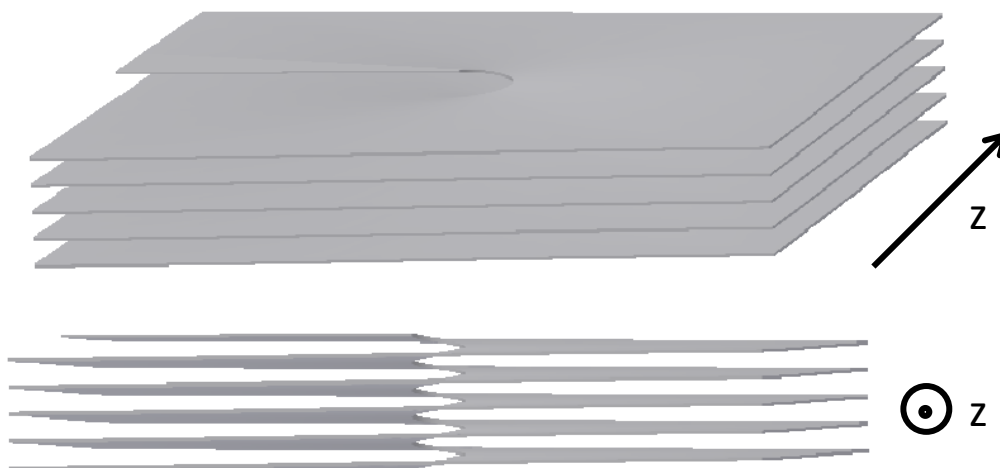


Figure 11 : Illustration d'une dislocation de type vis (hélicité droite) dans une organisation lamellaire obtenue grâce au logiciel AutoDesk. Ce défaut correspond à un arrangement hélicoïdal des couches smectiques autour d'un défaut central.

Le deuxième type de dislocations qu'il est possible d'observer sont les dislocations de type vis. Ces défauts correspondent quant à eux à un arrangement hélicoïdal des couches smectiques autour d'un défaut central (Figure 11).

Ce type de dislocation présente également la caractéristique de posséder un sens de rotation, gauche ou droite, qu'il va être possible d'identifier en observant les plans successifs pris dans la profondeur de l'échantillon (z) (Figure 12).

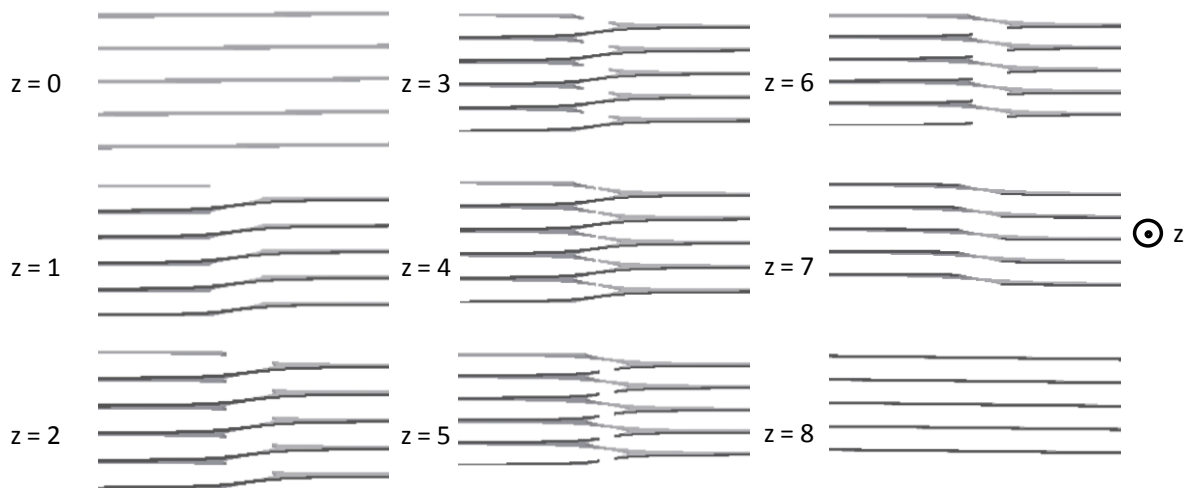


Figure 12 : Plans de coupe successifs pris dans la profondeur de l'échantillon (z) à partir de la représentation schématique de la Figure 11 pour une dislocation de type vis et d'hélicité gauche. Les parties sombres correspondent à ce qui se trouve au premier plan et les parties apparaissant en gris clair ce qui se trouve à l'arrière plan. Les valeurs de z indiquées sont arbitraires et servent uniquement à la compréhension de l'ordre de succession des différents plans.

La Figure 13 illustre les dislocations de ce type dans notre échantillon. La pile de clichés de microscopie de fluorescence met alors en évidence le caractère hélicoïdal de l'organisation et permet également d'en identifier l'hélicité : droite (en haut) ou gauche (en bas). Le vecteur de Burgers associé aux deux dislocations de la Figure 13, dont la norme traduit l'amplitude de la déformation amenée par la dislocation, est de $b = 1$ (i.e. d'une amplitude correspondant à 1 unité de la taille caractéristique du réseau (ici la périodicité lamellaire λ)). Il est à noter également que notre système se trouvant dans un smectique de type A, aucune des deux hélicités (gauche ou droite) n'est favorisée.

La fonctionnalisation régio-sélective du M13-C7C avec des chromophores aboutissant à leur localisation uniquement dans l'espace inter-couches de la phase smectique (Figure 2) offre donc, une perspective unique. En effet, au-delà de l'observation d'une structure lamellaire, il est également possible d'en visualiser les défauts tels que les deux types de dislocations présentés plus haut (coin et vis) qui sont alors facilement identifiables et reconnaissables.

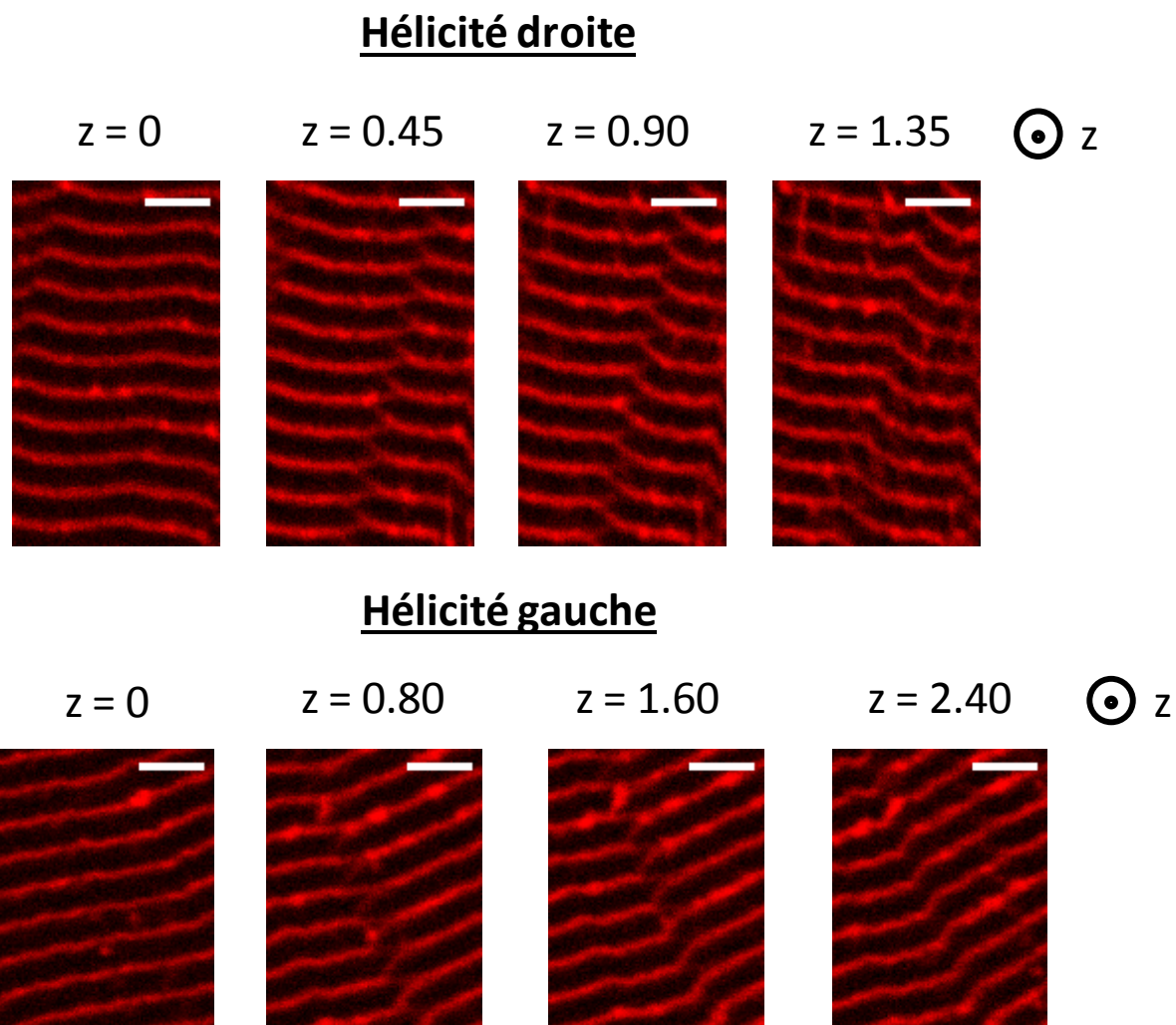


Figure 13 : Clichés de microscopie de fluorescence confocale montrant des dislocations de type vis, en haut d'hélicité droite et en bas d'hélicite gauche. La profondeur à laquelle les images ont été prises dans l'échantillon est indiquée en μm . Les barres d'échelle représentent $2 \mu\text{m}$.

3.5 Résumé, conclusion et perspectives de la fonctionnalisation du M13-C7C avec des chromophores

Afin d'éprouver le protocole de fonctionnalisation de l'extrémité du M13-C7C, le choix a été fait d'effectuer le greffage de chromophores.

Lors de l'observation de la phase smectique, l'organisation lamellaire permet de mettre en évidence l'espace entre les couches qui est la zone dans laquelle les chromophores vont se retrouver confinés. La comparaison des observations en microscopie à contraste interférentiel différentiel et de fluorescence révèle alors deux textures concordant parfaitement apportant donc la preuve de principe du protocole de fonctionnalisation décrit ci-dessus.

Le succès de cette fonctionnalisation régio-sélective du virus donne également naissance à des interactions spécifiques entre particules. Le caractère hydrophobe du

chromophore et sa concentration locale élevée aboutit à la création d'un "patch" amenant plusieurs particules à se lier les unes aux autres par leurs extrémités.

Ces interactions vont notamment avoir une influence sur le diagramme de phase cristal-liquide. La phase smectique favorisant le rapprochement des extrémités des virus, la probabilité de leur occurrence est alors très forte. Lors de la dilution progressive de l'échantillon, l'observation en microscopie de fluorescence montre alors qu'une organisation lamellaire persiste jusqu'à des concentrations faibles, bien en dessous du domaine d'observation de la phase smectique en microscopie DIC.

La caractérisation de cette phase lamellaire montre une augmentation progressive de sa périodicité lorsque la concentration diminue et la double fonctionnalisation de certains phages (Dylight550 à l'extrémité et fluorescéine sur le corps) apporte l'information sur leur orientation perpendiculaire vis-à-vis de l'organisation en couches, en particulier à faible concentration. A l'extrémité du diagramme de phase, la concentration à la transition entre le liquide isotrope et la phase nématique est mesurée et est en accord avec celle relevée dans le cas d'un système non-fonctionnalisé.

Enfin, le caractère régio-localisé des chromophores dans la phase smectique est exploité afin d'observer les défauts dans la structure lamellaire. Deux types de défauts sont particulièrement identifiés grâce à la réalisation d'un empilement d'images dans la profondeur de l'échantillon en microscopie de fluorescence confocale : la dislocation coin (i.e. l'ajout d'une couche dans l'organisation lamellaire) et la dislocation vis (i.e. un arrangement hélicoïdal des couches autour d'un défaut).

L'établissement du protocole de régio-fonctionnalisation et son succès avec des chromophores ouvre donc la possibilité de l'étendre à d'autres espèces moléculaires ou macromoléculaires. Dans l'idée d'un système à *patch* plus contrôlable, il est envisageable de greffer du PNIPAM dont la conformation et le caractère hydrophile/hydrophobe est modulable avec la température. Cependant, le PNIPAM est une espèce macromoléculaire dont le greffage se révélera très certainement plus complexe que pour un chromophore. De plus, au contraire du M13-C7C fonctionnalisé par le Dylight550, l'absence de fluorescence rend plus complexe la mise en évidence de son influence sur le diagramme de phase cristal-liquide.

Dans l'optique de se tourner vers la formation d'auto-assemblages, la partie suivante va présenter la fonctionnalisation de l'extrémité du M13-C7C avec de la biotine, une molécule connue pour son interaction spécifique avec l'avidine et ses dérivés.

4. Fonctionnalisation régio-spécifique du M13-C7C avec la biotine : formation d'auto-assemblages

4.1 Le couple biotine/avidine

La biotine, aussi connue sous divers noms tels que vitamine B₈ ou vitamine H, est une molécule trouvée dans divers aliments et nécessaire au bon fonctionnement de plusieurs métabolismes du corps humain notamment le cycle de Krebs qui permet la production de l'énergie lors de la respiration aérobie. Sa structure chimique est donnée en Figure 14.

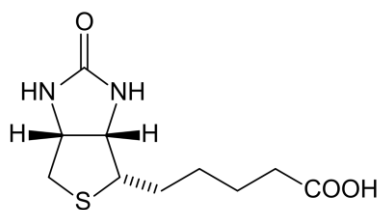


Figure 14 : Structure chimique de la biotine.

Dans le domaine des biotechnologies, elle est principalement utilisée dans le cadre de l'exploitation de son interaction spécifique avec l'avidine [20,21]. La liaison résultante est l'interaction non-covalente la plus forte connue dans la nature [20,21]. Cette force est mesurée par la constante de dissociation, K_d , associée comme son nom l'indique à la réaction de dissociation d'un complexe (sa définition est introduite dans le prochain chapitre (voir Chapitre 4 : équation (1))). Plus la valeur du K_d est faible plus l'interaction ayant mené au complexe et donc l'affinité entre les deux parties est forte. Dans le cas du couple biotine-avidine, le K_d vaut 10^{-15} M [20,21].



Figure 15 : Représentation dans un modèle simplifié de la structure de la protéine avidine illustrant son caractère tétravalent.

L'avidine est une protéine tétramérique (Figure 15), ce qui signifie qu'elle possède quatre sites d'ancrage pour la biotine. Son poids moléculaire est de 67 000 g/mol et son point isoélectrique (pI) est de 10 [21–23]. A pH physiologique, l'avidine est donc chargée positivement ($\text{pH} \ll \text{pI}$) alors que le virus étant quant à lui chargé négativement ($\text{pI} = 4.3$) [24]. Cette charge opposée est à l'origine de nombreuses interactions non-spécifiques (principalement électrostatiques) défavorables à la formation d'auto-assemblages contrôlés.

La streptavidine, purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii* est un dérivé de l'avidine présentant un point isoélectrique beaucoup plus bas ($\text{pI} \approx 5$) et un poids moléculaire de 53 000 g/mol [21]. La différence principale entre les deux protéines réside notamment dans l'absence de groupements carboxyles abaissant de manière significative le point isoélectrique sans pour autant modifier l'affinité avec la biotine [21,22]. L'interaction entre la streptavidine et la biotine est plus spécifique que celle avec l'avidine, l'abaissement du pI éliminant la possibilité d'autres interactions de type électrostatique.

Un second dérivé de l'avidine est la neutravidine qui est obtenue directement à partir de l'avidine que l'on modifie afin d'éliminer les groupements carbohydrates. La protéine résultante a un point isoélectrique presque neutre ($\text{pI} = 6.3 \pm 0.3$), un poids moléculaire de 60 000 g/mol et une affinité conservée pour la biotine [25].

L'interaction entre la biotine et l'une de ces trois protéines est donc l'une des plus fortes interactions non-covalentes connues. Elle est résistante à de nombreuses attaques extérieures, telles que les solvants organiques [16,23], les dénaturants (tels que le chlorure de guanidium) [26], les surfactants [16,23] ou même des conditions extrêmes de pH [23] ou température [27].

4.2 Fonctionnalisation du M13-C7C avec la biotine

Le protocole décrit précédemment est utilisé pour fonctionnaliser le M13-C7C avec de la Maléimide-PEG₂-Biotine (Figure 16). Ce composé, disponible commercialement chez Thermo Scientific, a une masse molaire de 525.62 g/mol et possède un groupement PEG favorisant la solubilité en solution aqueuse et permettant d'éviter l'agrégation du composé avec le temps. La longueur totale de la molécule est de 2.91 nm et sa solubilité est de 25 mg/ml dans l'eau.

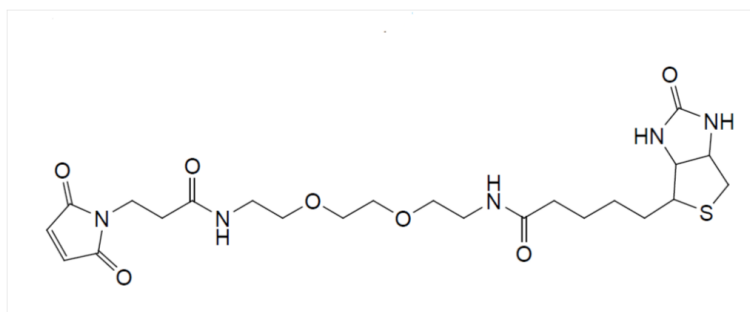


Figure 16 : Structure chimique de la Maléimide-PEG₂-Biotine.

Un excès molaire de **20** Maléimide-PEG₂-Biotine est pris par SH présents sur le M13-C7C (soit 200 par virus). L'échantillon est ensuite dialysé extensivement et transféré dans un tampon moins salé (PBS – pH = 7.5 – I = 20 mM).

4.3 Formation de structures

4.3.a) Zoologie des auto-assemblages

La neutravidine (fournie par Thermo Scientific) est mise en solution dans un mélange de tampon phosphate (PBS – pH = 7.5 – I = 20 mM) et de 10 % de glycérol afin d'aider sa solubilisation initiale. La solution est ensuite filtrée à 0.2 µm et sa concentration est mesurée par spectroscopie UV (la neutravidine a un coefficient d'absorption de 1.66 cm²/mg à 280 nm). De l'azote de sodium (NaN₃) est ajouté à la solution (0.05 %) afin d'empêcher la croissance de bactéries dont les sécrétions peuvent mener à la protéolyse de la protéine.

La solution mère de phages M13-C7C fonctionnalisés par de la biotine est purifiée par centrifugation à 20 000 g pendant 30 minutes. Les échantillons sont alors formulés en mélangeant les virus avec différents excès molaires de neutravidine. Les quantités nécessaires sont prélevées de chacune des solutions mères et sont ensuite diluées séparément dans des volumes égaux avant d'être mélangés afin d'éviter de trop grandes concentrations locales lors de l'ajout direct de l'un des deux composés.

La neutravidine ayant au total quatre sites de fixation pour la biotine, les observations en MET donnent alors lieu à l'identification de plusieurs structures correspondant à l'assemblage de plusieurs virus. Ces structures sont dites "contrôlées" lorsque le nombre de particules liées ne dépasse pas 4 (correspondant à la valence de la neutr/strept-avidine) et "non-contrôlées" lorsque c'est le cas (Figure 17).

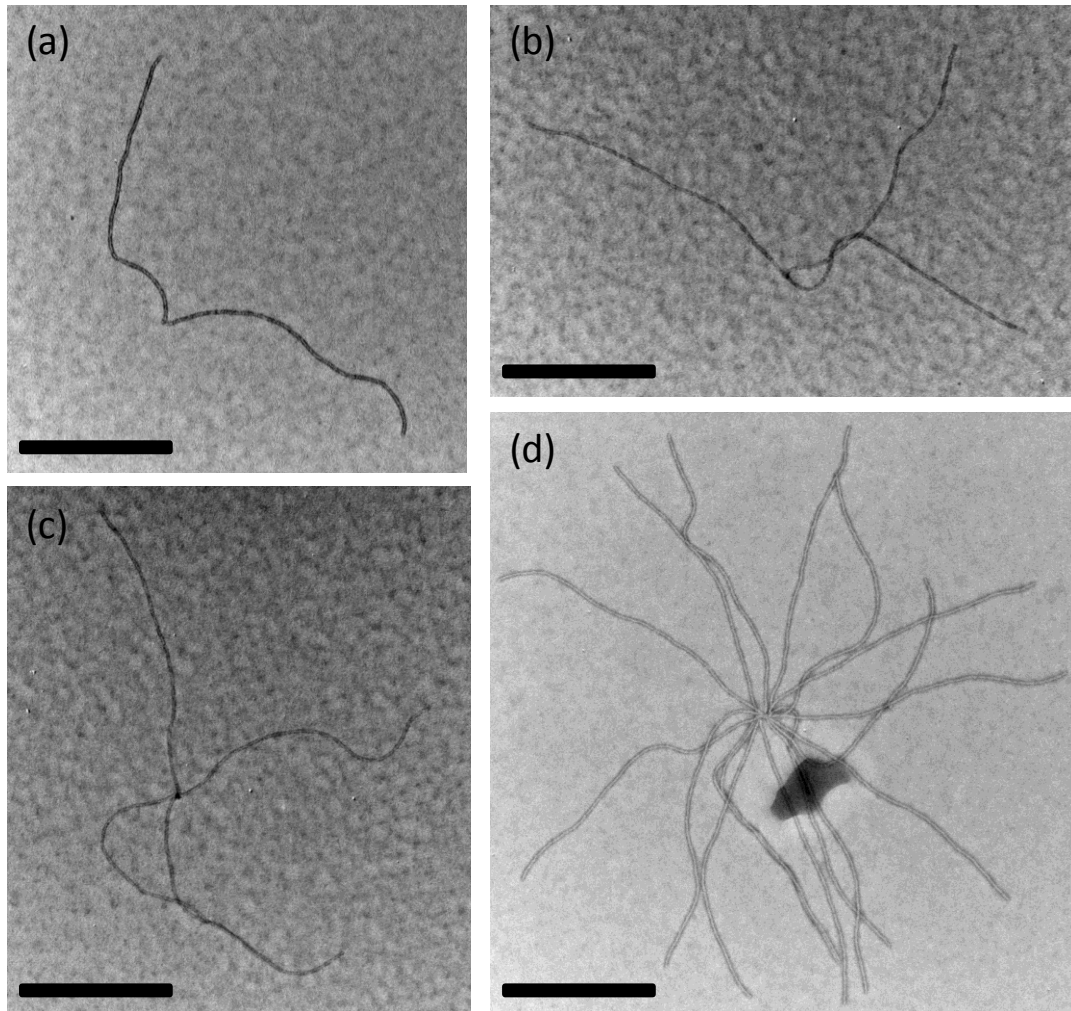


Figure 17 : Différentes structures observées en MET de virus M13-C7C fonctionnalisés à leurs extrémités par de la biotine et mis en présence d'une dispersion de neutravidine. Les auto-assemblages à (a) 2, (b) 3 ou (c) 4 virus sont des structures dites "contrôlées". Lorsque 5 particules ou plus sont présentes ((d)), l'auto-assemblage est alors dit "non-contrôlé" et résulte d'interactions non-spécifiques. Les barres d'échelles représentent 500nm.

La zoologie présentée en Figure 17 montre les différentes structures obtenables à l'issue du mélange de virus M13-C7C fonctionnalisés à leurs extrémités par de la biotine avec une dispersion de neutravidine. L'assemblage par les extrémités apparaît de manière nette sur les clichés de microscopie électronique, chaque structure présentant un point central autour duquel sont liés plusieurs virus.

Du fait de la nature tétramérique de la neutravidine, les auto-assemblages contenant de 2 à 4 virus (Figure 17 – (a), (b) et (c)) sont susceptibles de ne résulter uniquement que de l'interaction entre la biotine présente à l'extrémité des phages et la protéine en solution. Cependant, ceux contenant plus de 4 virus (Figure 17 – (d)) ne peuvent trouver leur origine

que dans l'existence d'interactions non-spécifiques (entre biotines) ou dans la formation d'agrégats de plusieurs neutravidines autour desquels pourraient venir se greffer un nombre plus important de phages.

La confirmation de l'existence d'interaction entre biotines est réalisée en observant en MET la solution mère de virus M13-C7C fonctionnalisés (n'ayant donc jamais été mis en contact avec de la neutravidine). Il est alors possible de remarquer la présence d'une proportion de particules formant déjà des structures, contrôlées ou non. L'émergence de telles interactions est susceptible de provenir de la solubilité limitée de la biotine en solution aqueuse. La fonctionnalisation du virus peut aboutir au greffage maximal de 10 Maléimide-PEG₂-Biotine à son extrémité. Il est alors possible de calculer la concentration locale en biotine (10 biotines dans un cylindre de 6.6 nm de diamètre et 2.91 nm de hauteur soit 0.1 Biotine/nm³) qui se trouve être du même ordre de grandeur que sa solubilité (25-50 mg/ml soit 0.03-0.1 Biotine/nm³) [28].

Le caractère hydrophobe de la biotine qui en résulte est l'une des explications les plus probables pour l'apparition d'interactions biotine-biotine et donc la formation de structures dans la solution mère de M13-C7C fonctionnalisés (sans ajout de neutravidine) et de structures non-contrôlées (contenant plus de 4 particules). Afin d'éviter au maximum le rapprochement entre phages, et donc limiter les interactions non-spécifiques, les solutions sont conservées diluées (aux alentours de 1 mg/ml ou moins) et la force ionique est maintenue basse ($I \leq 20$ mM) afin d'augmenter la portée des répulsions électrostatiques.

L'observation de la solution mère en MET confirme que la grande majorité des virus est isolée, une faible proportion forme déjà des structures dites "*contrôlées*" et très peu de structures non-contrôlées. 24 h après l'ajout de neutravidine, son interaction avec la biotine entraîne alors l'augmentation du nombre de ces structures contenant 5 particules ou plus dans lesquelles va se trouver la majorité des phages.

L'augmentation significative de cette population est donc la preuve du succès du greffage de la biotine sur le M13-C7C. La totalité des assemblages formés le sont par la liaison de plusieurs virus par l'une de leurs extrémités montrant donc que cette fonctionnalisation est réellement régio-sélective.

4.3.b) Optimisation des conditions de réaction

Les essais de formation de structures ont été principalement effectués à une concentration de 10⁻³ mg/ml, afin de minimiser les interactions non-spécifiques. Les formulations réalisées à des concentrations plus élevées (10⁻¹ – 1 mg/ml) mènent à la formation quasi-exclusive de structures non-contrôlées.

La quantité de neutravidine est le premier paramètre qu'il est possible de faire varier afin de tenter de privilégier la formation de l'une des structures vis-à-vis des autres. L'excès molaire par virus est varié de 0.1 à 1 000 et le résultat est observé en microscopie électronique après 24 heures sous agitation à 4°C afin d'évaluer les proportions de virus isolés, de structures contrôlées et non contrôlées. Le résultat est montré en Figure 18.

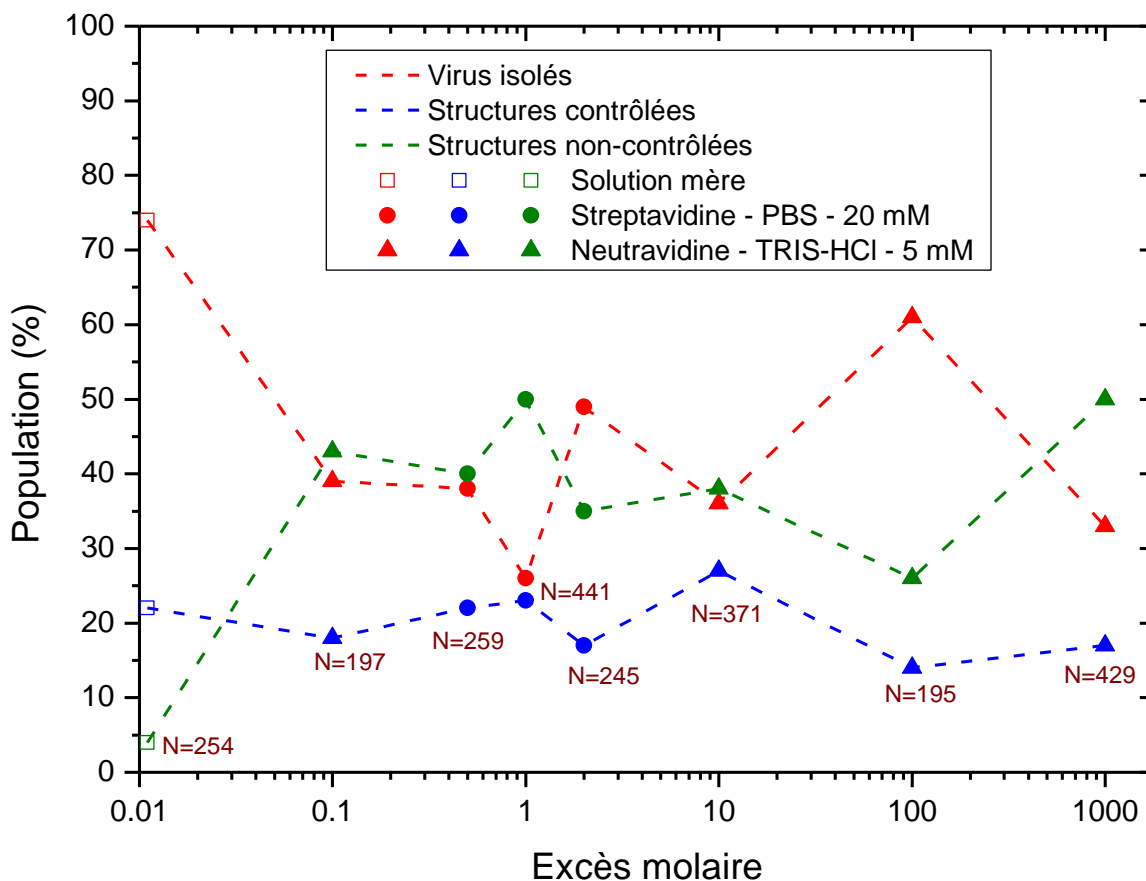


Figure 18 : Répartition des virus dans les différentes structures pour plusieurs mélanges de M13-C7C fonctionnalisés par de la biotine et des dérivés d'avidine lors de l'observation en MET après 24 heures à 4°C. Les structures contrôlées sont celles ne dépassant pas 4 virus tandis que les structures non-contrôlées sont celles comprenant 5 particules ou plus. Ces dernières sont comptabilisées en ne comptant que 5 virus par structure. Les carrés ouverts correspondent à l'observation faite sur la solution mère, les ronds à celles pour les mélanges avec de la streptavidine dans du tampon phosphate à $I = 20$ mM ($\text{pH} = 7.5$) et les triangles aux échantillons formulés avec de la neutravidine dans du tampon TRIS-HCl à $I = 5$ mM ($\text{pH} = 7.5$). Le nombre de virus comptabilisé dans la statistique (N) est indiqué pour chaque excès.

De manière générale, l'excès molaire de neutravidine ne semble influencer que très peu le résultat final observé. La totalité des échantillons préparés présentent les mêmes proportions des différentes populations (~ 40 % de virus isolés – ~ 20 % de virus dans des structures contrôlées – ~ 40 % de virus dans des structures non-contrôlées). Il est à noter que le nombre de virus dans des structures non-contrôlées a été calculée en ne comptant que 5 virus par structures observées et qu'il est donc sous-estimé et correspond à une valeur minimale. Aussi, les clichés MET ne permettent pas de distinguer les virus ayant réagi avec une neutravidine sans réagir avec d'autres virus de ceux n'ayant pas réagi du tout. Les deux cas sont comptabilisés comme des virus isolés bien qu'il soit possible d'imaginer que dans le cas des gros excès molaires, il s'agisse en réalité de virus complexés avec une protéine de type avidine.

La présence des assemblages de plus de 5 virus dans des proportions similaires pour des excès molaires de neutravidine très différents suggère que les interactions non-spécifiques biotine-biotine sont prédominantes. Différentes conditions de force ionique (5 mM au lieu de 20 mM), de tampon (TRIS-HCl – $\text{pH} = 7.5$ au lieu de PBS – $\text{pH} = 7.5$) ont

également été testées ainsi que l'utilisation de streptavidine en remplacement de la neutravidine. Comme cela est montré en Figure 18, les proportions des différentes populations restent inchangées.

La nature des auto-assemblages obtenus par cette méthode est donc complexe à maîtriser du fait d'un nombre trop important d'interactions non-spécifiques. Un travail en amont, au moment de la fonctionnalisation elle-même pourrait permettre de réduire le nombre de biotines situées à l'extrémité des virus et éviter l'effet de *patch* hydrophobe de survenir.

4.4 Greffage de nanoparticules

La fonctionnalisation des virus par de la biotine présente également l'intérêt de pouvoir venir dans un second temps y greffer des nanoparticules dont la surface a été activée par un dérivé d'avidine.

Les nanoparticules choisies ont un cœur en oxyde de fer ayant un diamètre moyen de 30 nm et ont été achetées chez Ocean NanoTech. Elles sont stabilisées d'un point de vue colloïdal par une couche de polymères de quelques nanomètres et sont recouvertes d'en moyenne 25 streptavidines par billes.

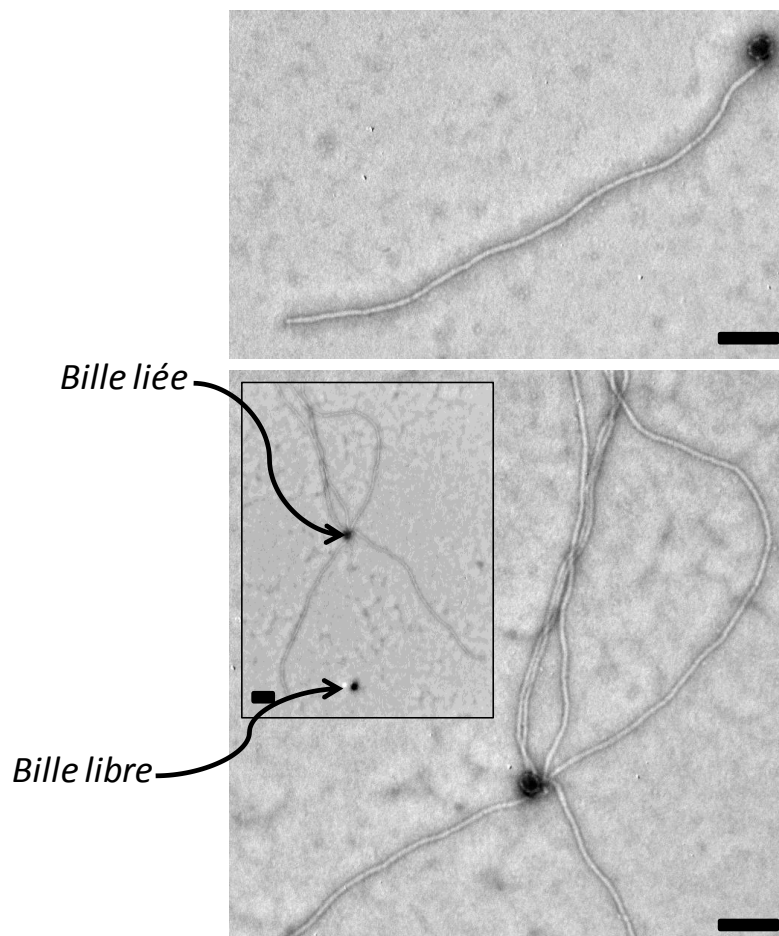


Figure 19 : Clichés de microscopie électronique de virus liés à des nanoparticules couvertes de streptavidine. L'insert dans l'image du bas correspond à la structure vue dans son ensemble. Les barres d'échelles représentent 100 nm.

Dans un premier temps, les billes sont placées en défaut vis-à-vis des virus (1 bille pour 41 virus) afin de tester leur affinité pour la biotine. L'échantillon est alors formulé pour une concentration finale de 10 mg/ml de virus et observé en MET après 24 h de réaction à température ambiante.

La statistique qui nous intéresse alors est le nombre de billes liées à au moins un virus (Figure 19) en comparaison du nombre de billes toujours libres en solution. La proportion de billes ayant réagi est dans notre cas de 95 % (103 billes sur un total de 108), ce qui est cohérent avec la très grande affinité entre la biotine et la streptavidine.

L'intérêt d'un tel greffage est cependant de minimiser le nombre de virus par nanoparticule (idéalement un virus par nanoparticule) afin que les phages conservent leur capacité d'auto-organisation et de visualiser l'influence des billes sur le diagramme de phase cristal-liquide ou bien de l'exploiter dans la construction de matériaux fonctionnels (les billes étant ici magnétiques).

Dans cette optique, des essais avec de plus grands excès de billes ont été réalisés (1 ou 4 billes par virus). Pour de tels excès, la concentration en virus est également diminuée (entre 1 et 10^{-3} mg/ml). Cependant, les observations en microscopie électronique montrent qu'il est difficile de former des complexes uniquement composés d'une bille et d'un virus. Dans ces conditions, le nombre de virus greffés par bille est alors important et bien que la quasi-totalité des phages ait réagi, un grand nombre de nanoparticules reste libre en solution (pour tous les excès allant de 1 à 4). Aussi, alors qu'il est relativement complexe de maîtriser le nombre de virus greffés par bille aux plus fortes concentrations, il est également compliqué de conserver une réactivité suffisante entre les nanoparticules et les phages à faible concentration (du fait probablement des longs temps de diffusion de ces objets colloïdaux par rapport à des espèces moléculaires).

5. Conclusions sur la fonctionnalisation chimique du M13-C7C

La fonctionnalisation chimique du M13-C7C semble donc être une voie prometteuse dans la construction de nouveaux assemblages utilisant les virus comme brique élémentaire.

L'élaboration d'un protocole fiable et reproductible a permis le greffage à l'extrémité du virus dans un premier temps de chromophores (Dylight550) établissant ainsi une preuve de principe pour cette fonctionnalisation régio-sélective apportée par l'observation en microscopie de fluorescence de la phase smectique. Dans un second temps, nous avons également été capables de greffer de la biotine, afin d'exploiter son interaction spécifique avec les dérivés d'avidine.

Dans le cas des chromophores, nous avons pu observer le caractère régio-sélectif du greffage en nous intéressant à la phase smectique. Dans cette mésophase, l'organisation lamellaire des virus et la fonctionnalisation uniquement de leur extrémité permet en effet de souligner uniquement l'espace entre les couches. Grâce à cela, nous avons également été capables d'identifier différents défauts de la phase smectique, les dislocations coin et vis.

Dans le cas de la biotine, le mélange des M13-C7C fonctionnalisés avec de la neutravidine laissée libre en solution amène à la création de structures où les phages sont

auto-assemblés uniquement par leurs extrémités. L'utilisation de nanoparticules dont la surface est modifiée par de la streptavidine montre également la possibilité de les greffer de manière spécifique à l'extrémité des virus.

Ces deux systèmes montrent donc la robustesse du protocole de fonctionnalisation établi ainsi que son caractère régio-sélectif. Cependant, l'ajout de ces espèces moléculaires à l'extrémité du phage s'accompagne d'une trop forte concentration locale qui engendre alors la création d'un *patch* hydrophobe. Les interactions attractives qui en découlent sont alors visibles en microscopie électronique, par la formation d'auto-assemblages contenant un nombre de virus supérieur à la valence de la neutravidine, ou en microscopie optique, avec l'observation en fluorescence d'une organisation lamellaire persistante au-delà du domaine d'existence de la phase smectique.

Afin de diminuer ce couplage non-spécifique des phages, l'une des voies à explorer serait de réduire le nombre de composés moléculaires ajouté par virus. Dans le cas de la biotine par exemple, chaque M13-C7C serait idéalement fonctionnalisé par une seule biotine, permettant alors de limiter sa concentration locale et l'apparition d'un caractère hydrophobe. De manière pratique, cette solution passe par la variation de l'excès molaire de biotine introduit lors de la réaction de fonctionnalisation, sachant que ce dernier ne peut pas être descendu en dessous de 1 molécule par SH (en comparaison de l'excès de 20 choisi ici) afin de ne pas risquer d'observer la présence de phages non fonctionnalisés.

Ce type de système *patchy* est néanmoins prometteur dans l'idée de créer un système similaire dont l'effet pourrait être modulable et contrôlable. L'utilisation d'un polymère comme le PNIPAM est l'une des voies à explorer bien que certaines questions restent en suspens, notamment les certitudes sur le greffage d'une espèce macromoléculaire ou la technique à adopter afin d'observer l'influence du polymère sur l'auto-organisation des particules.

Une des alternatives à la méthodologie utilisée ici pour le greffage de nanoparticules serait de s'affranchir de l'étape de fonctionnalisation avec de la biotine et d'utiliser directement des billes dont la surface est activée par un nombre contrôlé de maléimides. Ainsi, l'absence de biotines éviterait l'apparition d'interactions non-spécifiques et la spécificité de la réaction entre le maléimide et le thiol, démontrée au long de cette partie, pourrait être directement exploitée afin de créer un greffage covalent des virus sur les nanoparticules. Les caractéristiques des billes (taille, nombre de fonctions par bille) ainsi que les conditions de réaction (concentration en virus) permettraient alors de contrôler d'avantage la nature des assemblages formés.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont la preuve de la possibilité d'une biofonctionnalisation uniquement de l'extrémité du virus, bien qu'elle soit ici très certainement trop excessive. Le système du M13-C7C fonctionnalisé à son extrémité par de la biotine présente une grande réactivité et semble prometteur pour l'utilisation du virus dans la construction de nouveaux auto-assemblages.

De manière générale, ce système M13-C7C-Biotine en lui-même ne permet également pas d'aboutir à des structures hétéro-fonctionnelles. En effet, la suite logique à cette fonctionnalisation régio-sélective est de réaliser une double-fonctionnalisation du virus (corps (protéine p8) et extrémité (protéine p3)) et de venir ensuite assembler par leurs

extrémités deux particules ayant des fonctionnalisations du corps différentes (Figure 20). Les mélanges tels que ceux présentés dans cette partie, avec de la neutravidine libre en solution, ne permettent pas un tel contrôle.

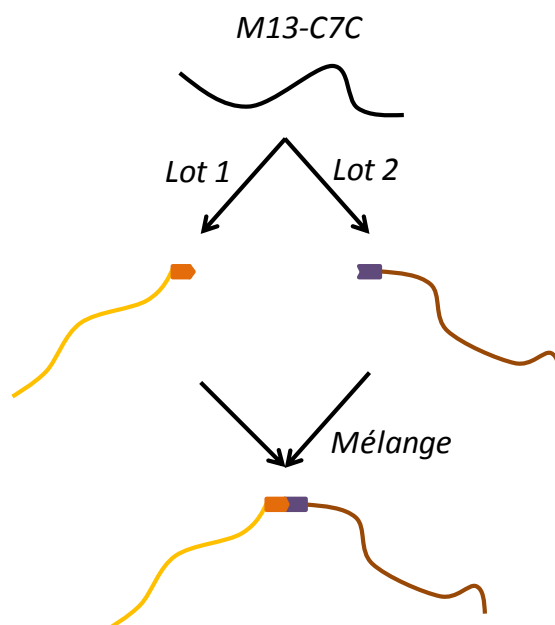


Figure 20 : Illustration de la création de dimères artificiels hétéro-fonctionnels. En partant de M13-C7C nu, deux lots sont alors créés ayant chacun une fonctionnalisation du corps (protéine p8) différente et une fonctionnalisation de l'extrémité (protéine p3) différente également mais complémentaire. Lors du mélange des deux lots, l'assemblage des particules deux-à-deux se fait alors de telle sorte qu'il en résulte uniquement des dimères bi-fonctionnels.

Afin de réaliser de tels assemblages, une des solutions à explorer serait la fonctionnalisation du M13-C7C avec de la neutravidine afin de réaliser des mélanges stœchiométriques avec les virus fonctionnalisés par de la biotine. La neutravidine est cependant une protéine et son greffage sur l'extrémité du virus est donc plus complexe que celui de la biotine qui est une espèce moléculaire. De plus, la neutravidine activée par le maléimide disponible commercialement (Thermo Scientific) contient entre 4 et 7 maléimides par protéine et la question se pose alors de la formation de structures dès l'étape de fonctionnalisation.

L'utilisation d'autres molécules complémentaires fonctionnant sur le principe de la "chimie clic" est envisageable mais la stabilité temporelle limitée de ces composés organiques en solution aqueuse reste un grand inconvénient. Des essais préliminaires sur des composés commerciaux (MHPH et MTFB fournis par Solulink) ont déjà été réalisés. Cependant, le greffage de ces molécules a été réalisé en amont des résultats avec le Dylight550 et la biotine présentés ci-dessus lorsque le protocole n'était pas encore bien établi. Notamment, les conditions dans lesquelles s'effectuaient la rupture du pont disulfure étaient insuffisantes (température ambiante au lieu de 42 °C et concentration de 10^{-3} mM de TCEP au lieu de 10 mM) et le pH choisi à 7.0 n'assurait pas nécessairement d'une spécificité maximale. Les résultats des observations qui ont alors été faites sont présentés en Figure 21.

Dans ces conditions, nous avons alors pu constater qu'une faible proportion de structures formées, parmi lesquelles certaines (en "T" ou en "X") correspondent à des réactions impliquant une fonctionnalisation des protéines p8 (Figure 21-(b) et (c)). La présence de tels auto-assemblages s'explique par la réaction des maléimides avec les amines primaires du fait des conditions non-spécifiques (pH trop élevé) et de la faible présence de thiols à l'extrémité des phages (rupture insuffisante des ponts disulfures par le TCEP). Les systèmes que nous avons présenté dans ce chapitre (M13-C7C-Dylight550 et M13-C7C-Biotine) sont dépourvus de telles structures ce qui est une preuve supplémentaire du caractère régio-sélectif du protocole que nous avons pu établir qu'il serait donc intéressant d'exploiter pour ces espèces moléculaires complémentaires.

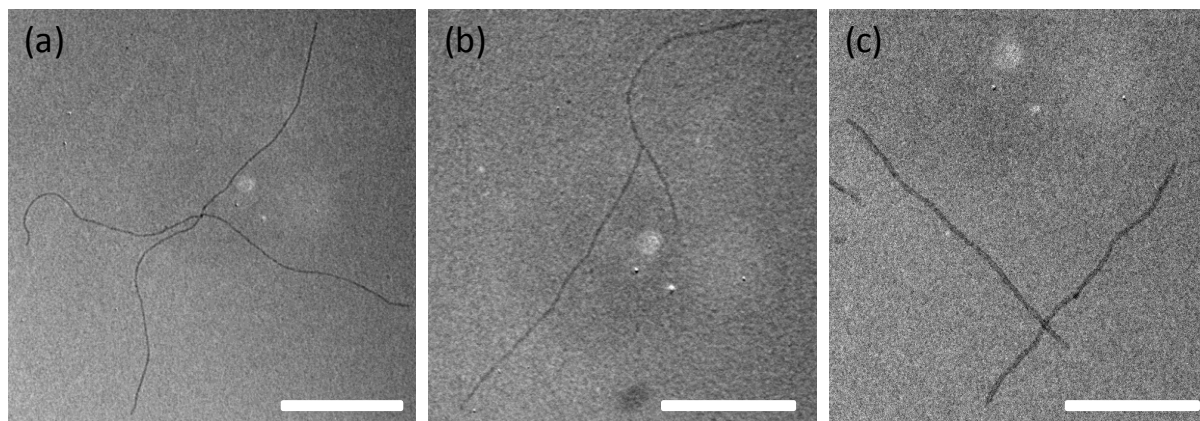


Figure 21 : Clichés de MET illustrant les résultats obtenus en utilisant des molécules complémentaires fournies par Solulink.. Bien qu'il soit possible d'observer des structures montrant une fonctionnalisation de l'extrémité des particules ((a)), d'autres auto-assemblages en "T" (correspondant à un virus fonctionnalisé sur la protéine p3 et un autre sur la protéine p8) ou en "X" (correspondant à 2 virus fonctionnalisés sur la protéine p8) montrent la non-spécificité du protocole utilisé.

Dans la suite du manuscrit nous allons nous intéresser à une autre voie, dite biologique, utilisant des mutants dont l'ADN modifié permet directement l'expression sur la protéine p3 de diverses séquences polypeptidiques. Nous nous intéresserons notamment au M13-Antistreptavidine dont l'insert contient une séquence Histidine-Proline-Glutamine (HPQ) complémentaire de la streptavidine. De la même manière, nous étudierons alors l'affinité de ce virus pour la streptavidine ainsi que les diverses structures formées lors des mélanges avec la protéine en solution.

Bibliographie

- [1] Z. Dogic and S. Fraden, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **359**, 997 (2001).
- [2] Z. Dogic and S. Fraden, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 47 (2006).
- [3] Z. Dogic and S. Fraden, in *Soft Matter Complex Colloidal Suspens.*, edited by G. Gomper and M. Schick (Wiley-VCH, Weinheim, 2005).
- [4] E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168301 (2008).
- [5] E. Grelet, M. P. Lettinga, M. Bier, R. van Roij, and P. van der Schoot, *J. Phys. Condens. Matter* **20**, 494213 (2008).
- [6] E. Grelet, *Phys. Rev. X* **4**, 021053 (2014).
- [7] M. P. Lettinga, E. Barry, and Z. Dogic, *Europhys. Lett. EPL* **71**, 692 (2005).
- [8] M. P. Lettinga, Z. Dogic, H. Wang, and J. Vermant, *Langmuir* **21**, 8048 (2005).
- [9] M. P. Lettinga and E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **99**, 197802 (2007).
- [10] S. Naderi, E. Pouget, P. Ballesta, P. van der Schoot, M. P. Lettinga, and E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **111**, 037801 (2013).
- [11] E. Pouget, E. Grelet, and M. P. Lettinga, *Phys. Rev. E* **84**, 041704 (2011).
- [12] N.-M. D. Courchesne, M. T. Klug, P.-Y. Chen, S. E. Kooi, D. S. Yun, N. Hong, N. X. Fang, A. M. Belcher, and P. T. Hammond, *Adv. Mater.* **26**, 3398 (2014).
- [13] C. E. Flynn, S.-W. Lee, B. R. Peelle, and A. M. Belcher, *Acta Mater.* **51**, 5867 (2003).
- [14] S.-W. Lee, S. k. Lee, and A. m. Belcher, *Adv. Mater.* **15**, 689 (2003).
- [15] *Ph.D. Phage Display Libraries - Instruction Manual* (New England Biolabs, n.d.).
- [16] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd edition (Academic Press, San Diego, 2008).
- [17] J. Sambrook and D. W. Russell, in *Mol. Cloning Lab. Man.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (New-York, 2001).
- [18] I. Rentero Rebollo and C. Heinis, *Methods* **60**, 46 (2013).
- [19] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, and J. W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6657 (1991).
- [20] O. H. Laitinen, V. P. Hytönen, H. R. Nordlund, and M. S. Kulomaa, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **63**, 2992 (2006).
- [21] E. P. Diamandis and T. K. Christopoulos, *Clin. Chem.* **37**, 625 (1991).
- [22] J. Korpela, *Med. Biol.* **62**, 5 (1984).
- [23] N. M. Green, in *Adv. Protein Chem.*, edited by J. T. E. and F. M. R. C.B. Anfinsen (Academic Press, 1975), pp. 85–133.
- [24] K. Zimmermann, H. Hagedorn, C. C. Heuck, M. Hinrichsen, and H. Ludwig, *J. Biol. Chem.* **261**, 1653 (1986).
- [25] *Neutravidin Biotin-Binding Protein User Guide* (Thermo scientific, n.d.).
- [26] J.-N. Rybak, S. B. Scheurer, D. Neri, and G. Elia, *PROTEOMICS* **4**, 2296 (2004).
- [27] M. González, C. E. Argaraña, and G. D. Fidelio, *Biomol. Eng.* **16**, 67 (1999).
- [28] *EZ-Link™ Maleimide-PEG2-Biotin* (Thermo scientific, n.d.).

Chapitre 4 : Ajout régio-sélectif de fonction par *phage display* et formation d'auto-assemblages

1. Introduction au phage display	92
2. Evaluation de l'affinité du M13AS pour la streptavidine	94
3. Modèle prédictif et simplifié pour la formation de complexes	98
4. Formation d'auto-assemblages	99
4.1 Influence des concentrations.....	102
4.1.a) Excès molaire de streptavidine	102
4.1.b) Concentration en virus.....	105
4.2 Influence de l'électrostatique	106
4.2.a) Influence du pH	106
4.2.b) Influence de la force ionique	108
5. Conclusions sur la formation d'auto-assemblages avec le M13-AS.....	109
Bibliographie.....	111

1. Introduction au phage display

En comparaison de l'approche biochimique présentée dans le chapitre précédent, une approche purement biologique est introduite ici par l'ajout de fonction de manière régio-sélective sur le virus par *phage display*.

La technologie du *phage display* a été introduite en 1985 par Smith [1]. Elle consiste en l'isolation, par un procédé de sélections successives, des séquences polypeptidiques agissant comme des ligands pour des protéines, des macromolécules ou d'autres cibles [2–4].

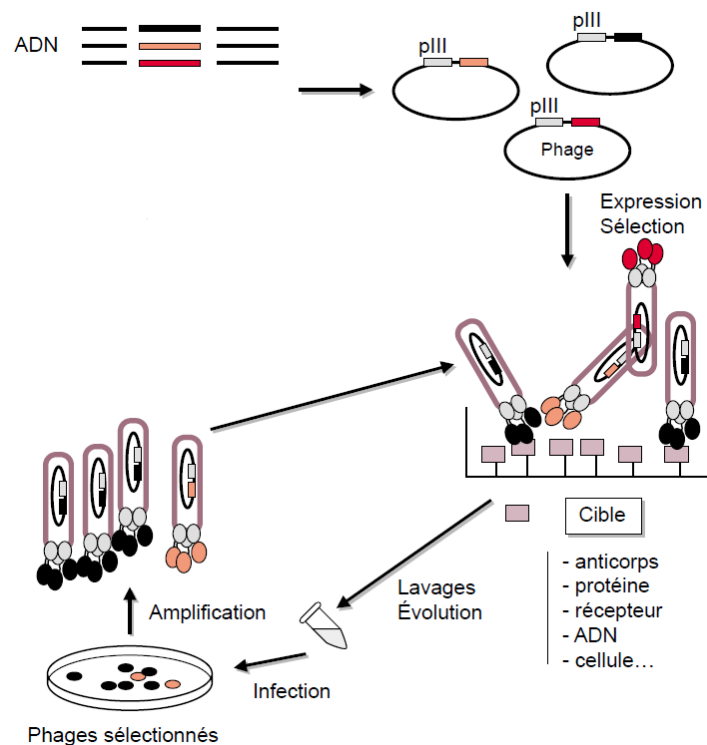


Figure 1 : Schéma résumant le principe du phage display. L'ADN inséré à l'extrémité du gène 3 permet l'expression d'une séquence de peptides fusionnée à la protéine p3. Une fois produits, les phages sont ensuite mis en contact avec un substrat activé par une cible sur lequel viennent se fixer les séquences suivant leur affinité. Après lavages et élimination, les virus ainsi sélectionnés sont de nouveau amplifiés et le cycle est répété afin d'affiner la sélection [4].

Comme montré en Figure 1, un oligonucléotide aléatoire est inséré dans l'ADN du virus en terminaison, par exemple, du gène 3. Le *phage display* qui en résulte est alors spécifique à la protéine p3, mais il est également possible de la décliner sur les autres protéines du virus (en modifiant le gène 8 par exemple pour un *phage display* spécifique à la protéine p8). Une fois inséré dans un hôte bactérien par transduction, l'ADN ainsi modifié va entraîner la production de phages dont la protéine p3 va être fusionnée avec une séquence polypeptidique aléatoire [2–4]. Cette méthodologie permet alors la production de phages possédant différentes séquences. Un substrat recouvert d'une cible est alors mis en contact avec le mélange de virus produit. Suivant leur affinité ou non avec la cible, les séquences polypeptidiques vont être sélectionnées par leur fixation sur ce substrat et isolées des autres par de multiples rinçages. Une fois élués (par variation de pH et/ou ajout d'un excès de ligand connu pour la cible), les phages sont de nouveau produits et le cycle est répété afin

d'améliorer la sélection et de déterminer la séquence ayant la plus grande affinité pour la cible souhaitée.

Une fois le dernier lavage effectué, le séquençage de l'ADN permet alors d'identifier la ou les séquences polypeptidiques présentant la plus grande affinité pour la cible choisie qui vient alors s'ajouter à la librairie des séquences déjà identifiées [2–4].

Deux grandes catégories de *phage display* sont à distinguer suivant les vecteurs qu'elles utilisent. La première utilise un plasmide comme vecteur, c'est-à-dire une copie du gène 3 du virus complétée par l'oligonucléotide aléatoire. C'est ce plasmide qui est inséré par transduction dans la bactérie, mais il ne peut cependant pas suffire à l'obtention de phages en lui-même. Cette méthode utilise donc également un phage auxiliaire, qui vient infecter les bactéries contenant le plasmide et qui apporte alors le génome correspondant aux protéines manquantes (p8, etc...) afin de permettre la production de virus. La deuxième méthode quant à elle consiste à utiliser un phage complet comme vecteur dont l'ADN contient la version modifiée du gène 3. Une fois l'ADN inséré dans les bactéries, le phage auxiliaire n'est alors plus nécessaire à la production de virus.

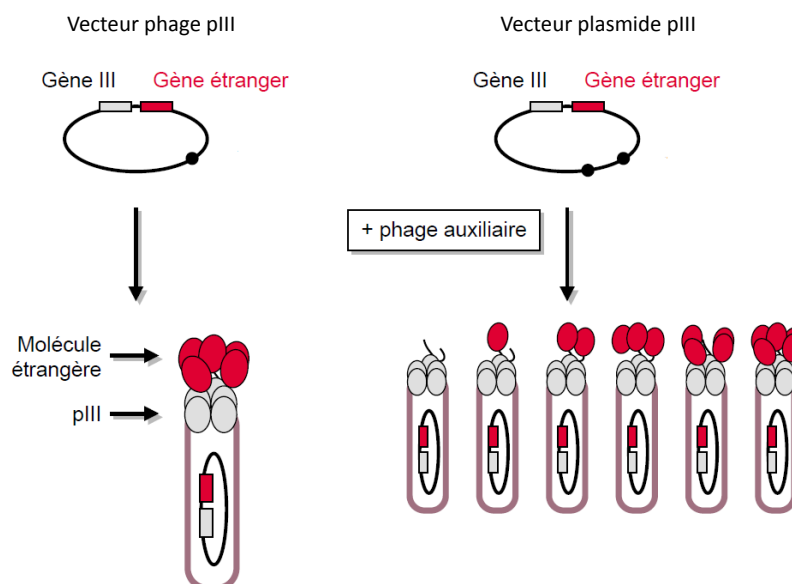


Figure 2 : Illustration des différences entre la méthode du vecteur phage et celle du vecteur plasmide. Dans le premier cas, le gène étranger est inséré directement dans l'ADN du phage ce qui amène à son expression totale sur la protéine p3 de tous les virus produits. Dans le cas du vecteur plasmide, le gène étranger est uniquement inséré sur une portion de l'ADN du phage, celle contenant le gène 3. Avec l'aide d'un phage auxiliaire, cet ADN est complété afin de produire les protéines manquantes. La séquence codée par le gène insérée n'est alors exprimée que partiellement sur les protéines p3 des virus produits (de 0 à 5 fois) [4].

La principale différence entre ces deux méthodes, au-delà de l'utilisation d'un phage auxiliaire, réside surtout dans le taux d'expression de l'insert peptidique sur la protéine p3. Dans le cas où le vecteur est un phage, les virus produits sont des clones rigoureusement identiques au vecteur initial et l'insert est donc présent sur la totalité des protéines p3 de tous les phages (Figure 2). A l'inverse, la méthode utilisant un vecteur plasmide ne fournit qu'une portion d'ADN modifié (celui contenant le gène 3) qui est complété par celui fourni par le phage auxiliaire. L'assemblage du phage lors de son expulsion de la bactérie aboutit alors à un mélange de populations, issu des différentes combinaisons entre les protéines p3 contenant l'insert (codées par l'ADN du plasmide) et celles ne le contenant pas (codées par

l'ADN du phage auxiliaire). La séquence polypeptidique souhaitée n'est alors exprimée que partiellement sur les virus produits (de 0 à 5 fois) (Figure 2). Même s'il n'aboutit qu'à une expression partielle, l'utilisation du vecteur plasmide présente néanmoins l'avantage d'être plus simple d'utilisation. Il est en effet beaucoup plus complexe de modifier l'ADN complet du virus (ce qui est nécessaire dans le cas du vecteur phage) sans en perturber complètement la structure et l'infectiosité. De ce fait, les séquences qu'il est possible d'insérer sont plus limitées, notamment en taille, et l'utilisation de vecteurs plasmides offre un plus grand nombre de possibilités.

Nous allons nous intéresser à un mutant en particulier, le M13-Antistreptavidin (M13AS). La modification de son ADN entraîne l'insertion d'une séquence WDPYSHLLQHPQ [5] sur chacune des protéines p3. Le motif Histidine-Proline-Glutamine (HPQ) va alors présenter une affinité pour la streptavidine [6] (un dérivé de l'avidine) mais cependant bien moindre en comparaison avec la biotine. Plusieurs travaux ont déjà montré la possibilité de coupler ce virus avec des nanoparticules d'or couvertes de streptavidine [5] ou bien la formation de structure annulaires en exprimant un deuxième insert peptidique sur la protéine p9 (située sur l'autre extrémité que la protéine p3) [7]. Nous nous intéresserons ici à l'interaction avec la protéine laissée libre en solution afin d'observer les diverses structures formées.

Ce virus appartient à la catégorie des vecteurs phages et ne nécessite donc aucun apport d'un phage auxiliaire pour sa production. Un échantillon de M13AS nous a été gracieusement fourni par S.W. Lee de l'Université de Berkeley et a été amplifié par des protocoles biologiques standards [8].

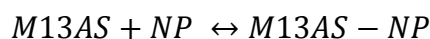
Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Marie Trévisan dans le cadre de son post-doctorat au CRPP.

2. Evaluation de l'affinité du M13AS pour la streptavidine

La détermination de l'affinité entre le M13AS et la streptavidine consiste donc à l'évaluation de la constante de dissociation, K_d , du complexe. Cette mesure s'est effectuée en utilisant les nanoparticules d'oxyde de fer décrites dans le chapitre précédent (fournies par Ocean NanoTech).

Afin de permettre une comparaison, l'échantillon est formulé dans les mêmes conditions que lors des tests effectués avec le M13-C7C fonctionnalisé par de la biotine, soit 10 mg/ml et un excès de 1 nanoparticule pour 41 virus.

La réaction d'équilibre correspondante est alors la suivante :



qui est donc associée à la constante de dissociation suivante :

$$K_d = \frac{[M13AS]_{libre} \times [NP]_{libre}}{[M13AS - NP]_{complexe}} \quad (1)$$

où $[M13AS]_{libre}$ est la concentration en phages libres, $[NP]_{libre}$ celle en nanoparticules libres et $[M13AS-NP]_{complexe}$ celle en complexes formés en solution. La conservation de la masse nous donne alors les relations suivantes :

$$[M13AS]_0 = [M13AS]_{libre} + [M13AS - NP]_{complexe} \quad (2)$$

$$[NP]_0 = [NP]_{libre} + [NP]_{liées} \quad (3)$$

avec $[M13AS]_0$ et $[NP]_0$ les concentrations initiales en virus et en nanoparticules respectivement et $[NP]_{liées}$ la concentration en nanoparticules ayant réagi avec au moins un virus. Il est également possible de définir le nombre moyen de virus par bille, n , comme étant :

$$n = \frac{[M13AS - NP]_{complexe}}{[NP]_{liées}} \quad (4)$$

Les fractions de nanoparticules ou de virus liés peuvent alors s'exprimer comme :

$$f(M13AS) \equiv \frac{[M13AS - NP]_{complexe}}{[M13AS]_0} = \frac{[NP]_{libre}}{K_d + [NP]_{libre}} \quad (5)$$

$$f(NP) \equiv \frac{[NP]_{liées}}{[NP]_0} = \frac{[M13AS]_{libre}}{n \times K_d + [M13AS]_{libre}} \quad (6)$$

Les conditions d'observations du système ne nous permettent qu'un accès partiel aux informations sur son équilibre. En effet, la différence de concentration entre les virus et les nanoparticules nous oblige à observer l'échantillon en microscopie électronique à transmission (MET) à deux dilutions différentes. La première dilution nous permet d'évaluer la fraction de nanoparticules liées ($f(NP)$) mais ne nous donne pas accès à la proportion de virus libres. Inversement, la seconde nous permet d'évaluer la fraction de M13AS liés ($f(M13AS)$) mais ne nous donne pas accès à la concentration de NP libres. En utilisant les définitions des deux fractions données dans les équations (5) et (6) et l'équation (4) nous pouvons alors formuler que :

$$f(NP) = \frac{[M13AS]_0}{n \times [NP]_0} \times f(M13AS) = \frac{[M13AS]_0}{n \times [NP]_0} \times \frac{[NP]_{libre}}{K_d + [NP]_{libre}} \quad (7)$$

$$f(M13AS) = \frac{n \times [NP]_0}{[M13AS]_0} \times \frac{[M13AS]_{libre}}{n \times K_d + [M13AS]_{libre}} \quad (8)$$

ce qui permet donc d'exprimer la constante de dissociation comme étant :

$$K_d = [NP]_{libre} \times \left(\frac{[M13AS]_0}{n \times [NP]_0 \times f(NP)} - 1 \right) \quad (9)$$

$$K_d = [M13AS]_{libre} \times \left(\frac{[NP]_0}{[M13AS]_0 \times f(M13AS)} - \frac{1}{n} \right) \quad (10)$$

Les observations en MET permettent alors d'évaluer les concentrations en nanoparticules libres ou liées sur une population représentative de l'échantillon (N = 941) et l'hypothèse est faite que la dilution réalisée et le temps nécessaire (5 minutes) pour faire la grille n'affecte pas l'équilibre. La distribution du nombre de virus greffé par bille est donnée en Figure 3.

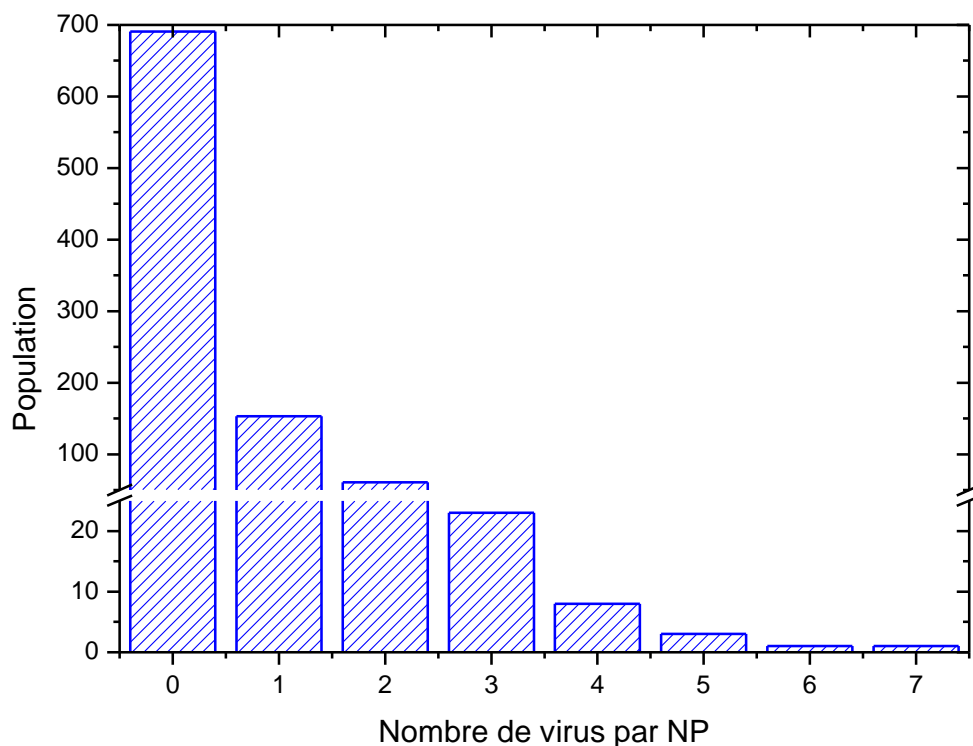


Figure 3 : Distribution du nombre de virus par NP observée dans un échantillon formulé à une concentration initiale en M13AS de 10 mg/ml (5.41×10^{-7} M) et un excès de 1 bille pour 41 virus pour l'évaluation de $f(NP)$.

Le résultat de l'observation est donné dans le tableau ci-dessous :

$[M13AS]_0$	5.41×10^{-7} M
$[NP]_0$	1.32×10^{-8} M
$f(NP)$	0.27
n	1.62
$[NP]_{libres}$	9.68×10^{-9} M
$[NP]_{liées}$	3.50×10^{-9} M

La fraction de nanoparticules liées ($f(NP)$) et le nombre de virus moyen par bille sont déduits de la distribution présentée en Figure 3. La concentration $[NP]_{liées}$ est alors obtenue en utilisant l'équation (6) et $[NP]_{libres}$ à partir de l'équation (3).

Les valeurs obtenues permet donc d'évaluer la constante de dissociation (équation (9)) comme étant : $K_d = 9.15 \times 10^{-7}$ mol/L. L'ordre de grandeur obtenu est similaire à celui rapporté dans la littérature pour différentes étiquettes biologiques spécifiques à la streptavidine [9,10].

Une seconde évaluation du K_d a également été effectuée à une concentration plus faible en virus (1 mg/ml) et un excès de nanoparticules différent (1 nanoparticule pour 10

virus). De la même manière que précédemment, l'observation en MET sur une population de billes représentative de l'échantillon (N = 1513) donne la distribution du nombre de virus greffé par bille présentée en Figure 4.

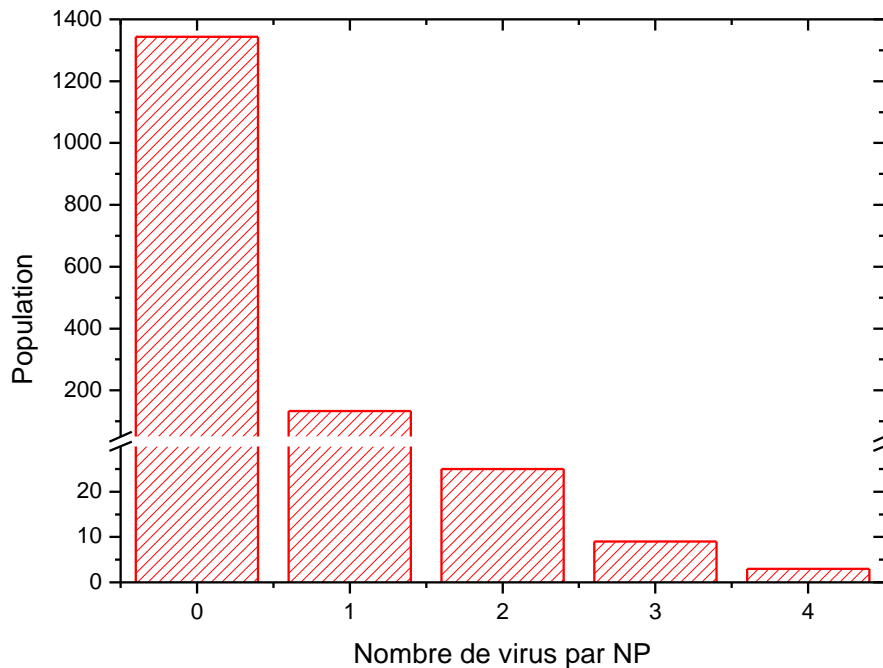


Figure 4 : Distribution du nombre de virus par NP observée dans un échantillon formulé à une concentration initiale en M13AS de 1 mg/ml (5.41×10^{-8} M) et un excès de 1 bille pour 10 virus pour l'évaluation de $f(\text{NP})$.

Le résultat est présenté dans le tableau ci-dessous :

[M13AS]₀	5.41×10^{-8} M
[NP]₀	5.41×10^{-9} M
f(NP)	0.11
n	1.31
[NP]_{libres}	4.80×10^{-9} M
[NP]_{liées}	6.07×10^{-10} M

Les valeurs obtenues permettent de calculer la constante de dissociation comme étant : $K_d = 3.22 \times 10^{-7}$ M , similaire à celle obtenue précédemment.

Sur le même échantillon, l'évaluation de K_d a également été réalisée se basant cette fois sur la fraction de virus liés ($f(\text{M13AS})$) en effectuant une statistique sur une population représentative de l'échantillon (N = 226). Encore une fois, la distribution du nombre de virus par bille est donnée en Figure 5.

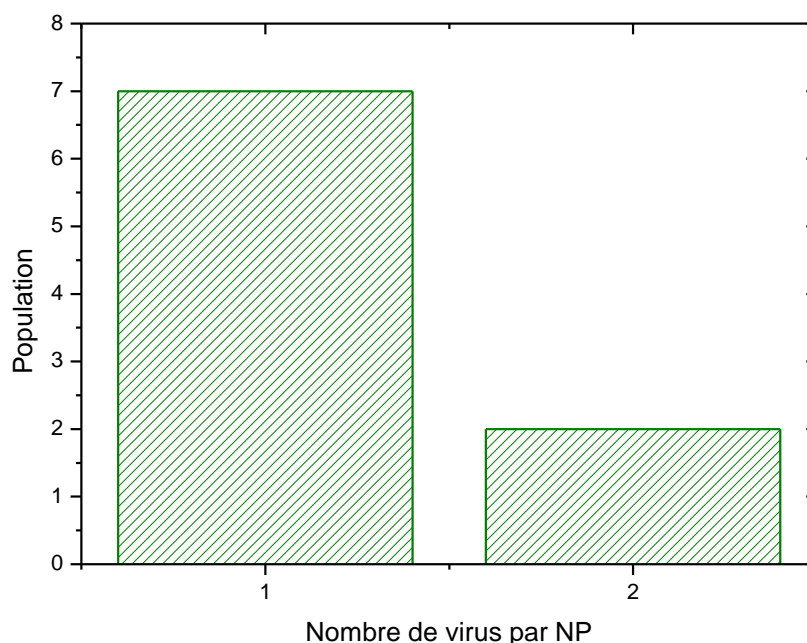


Figure 5 : Distribution du nombre de virus par NP observée dans un échantillon formulé à une concentration initiale en M13AS de 1 mg/ml (5.41×10^{-8} M) et un excès de 1 bille pour 10 virus pour l'évaluation de $f(\text{M13AS})$.

Le résultat est présenté dans le tableau ci-dessous. La fraction de virus liés ($f(\text{M13AS})$) et le nombre de virus moyen par bille sont déduits de la distribution présentée en Figure 5. La concentration $[\text{M13AS}]_{\text{liées}}$ est alors obtenue en utilisant l'équation (5) et $[\text{NP}]_{\text{libres}}$ à partir de l'équation (2).

$[\text{M13AS}]_0$	5.41×10^{-8} M
$[\text{NP}]_0$	5.41×10^{-9} M
$f(\text{M13AS})$	0.05
n	1.22
$[\text{M13AS}]_{\text{libres}}$	5.14×10^{-8} M
$[\text{M13AS}]_{\text{liées}}$	2.63×10^{-9} M

La constante de dissociation (équation (10)) qui en résulte est alors : $K_d = 6.36 \times 10^{-8}$ M, qui est donc un ordre de grandeur inférieure aux valeurs calculées plus haut. Cette différence s'explique notamment par la population plus faible sur laquelle la statistique a été effectuée, en particulier lorsqu'il s'agit de comparer le nombre de virus liés décomptés (11 sur 226) au nombre de nanoparticules liées recensées dans les calculs précédents (250 sur 941 et 170 sur 1513).

3. Modèle prédictif et simplifié pour la formation de complexes

En reprenant l'expression du K_d (équation (1)) et en la combinant avec les lois de conservation de la masse (équations (2) et (3)) et la définition du nombre moyen de virus par bille (équation (4)), il est possible de formuler l'équation du second degré suivante :

$$\frac{[M13AS - NP]_{complexe}^2}{n} - \left(\frac{[M13AS]_0}{n} + \frac{[M13AS]_0}{\alpha} + K_d \right) \times [M13AS - NP]_{complexe} + \frac{[M13AS]_0^2}{\alpha} = 0 \quad (11)$$

avec α l'excès de virus par bille :

$$\alpha = \frac{[M13AS]_0}{[NP]_0} \quad (12)$$

De l'équation du second degré, il est alors possible d'extraire la concentration en complexes ($[M13AS-NP]_{complexe}$) en fonction des conditions initiales ($[M13AS]_0$, $[NP]_0$ et K_d). Le résultat de la fraction de M13AS liés ($f(M13AS) = [M13AS-NP]_{complexe}/[M13AS]_0$) en fonction de l'excès de billes par virus ($1/\alpha$) pour un n fixé à 1 ou variable, différentes concentrations initiales en phages ($[M13AS]_0$) et différents K_d est présenté en Figure 6.

En fonction du K_d , et donc de la force de l'interaction, l'un des paramètres principaux influant sur la formation de complexes est la concentration initiale en virus. Afin de maximiser le nombre de phages ayant réagi, il est en effet nécessaire que $[M13AS]_0$ soit au moins du même ordre de grandeur que la constante de dissociation et idéalement un ou plusieurs ordres au-dessus. Lorsque cette condition n'est pas satisfaite, le second levier est donc l'excès de nanoparticules par virus. Plus celui-ci est grand, plus la fraction de virus liés est importante. Pour un système donné, et donc un K_d donné, le facteur régissant le taux de réaction est donc la concentration initiale en virus normalisée par l'excès de billes qui lui est opposé : pour des concentrations initiales en M13AS différentes, les mêmes fractions de virus liés peuvent être atteintes mais à des excès de billes différents. Un troisième levier est le nombre moyen de virus greffable par billes (n). Lorsque le K_d est faible, son influence est minimale sur la proportion de M13AS liés mais lorsque l'interaction devient forte, c'est alors ce nombre moyen qui devient déterminant.

Il est à noter que dans le cas de l'interaction entre la biotine et les dérivés d'avidine ($K_d = 10^{-15}$ M), la gamme de concentration étudiée dans le chapitre précédent ($10^{-3} - 10$ mg/ml $\leftrightarrow 5.41 \times 10^{-11} - 5.41 \times 10^{-7}$ M) est toujours plusieurs ordres de grandeur au-dessus de la constante de dissociation, ce qui donne donc des résultats très similaires (quelques que soient les conditions initiales) et explique, au moins partiellement, la difficulté de contrôler la formation d'auto-assemblages dans les essais présentés dans le chapitre 3.

4. Formation d'auto-assemblages

Le mélange du M13AS avec de la streptavidine aboutit donc à la formation de structures sur le même principe que pour les M13-C7C fonctionnalisés avec de la biotine. Qualitativement, les structures sont présentées en Figure 7 et sont identiques à celles présentées dans le chapitre précédent. Les assemblages formés ont donc également soit un caractère contrôlé (s'ils contiennent 4 virus ou moins) ou non-contrôlé (s'ils contiennent 5 virus ou plus).

Les échantillons sont formulés dans différentes conditions de concentration en virus, excès de streptavidine, pH et force ionique qui sont détaillées par la suite afin d'étudier

l'influence de ces paramètres sur la formation et la proportion des structures observées en MET.

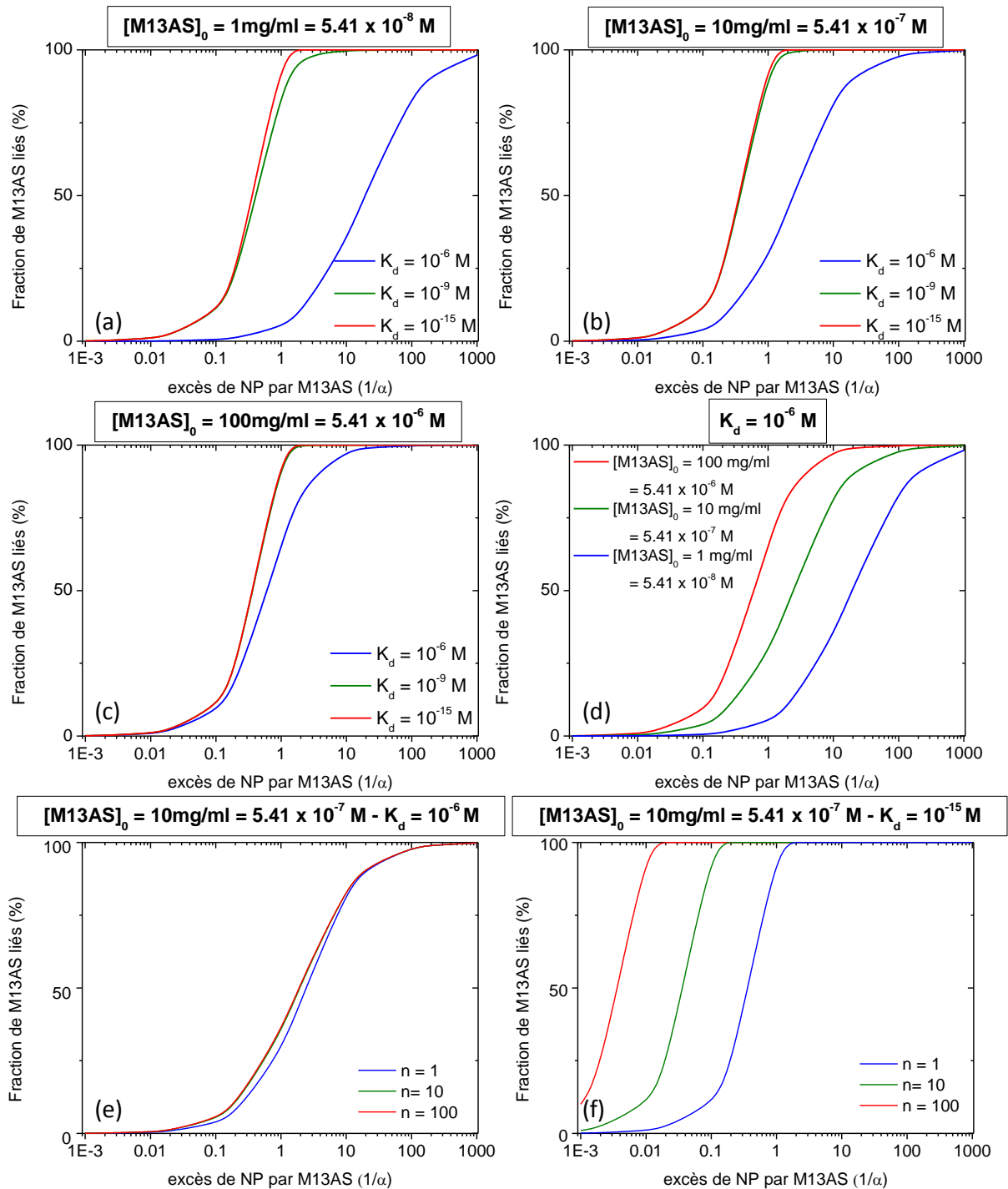


Figure 6 : Evolution de la fraction de M13AS liés en fonction de différentes conditions initiales : la concentration initiale en virus ($[M13AS]_0$), l'excès de nanoparticules par virus ($1/\alpha$) et la constante de dissociation (K_d). Le nombre moyen de virus par bille (n) est fixé à 1 pour les graphiques (a) à (d) puis variable pour les graphiques (e) et (f).

Il est important de noter que la séquence HPQ présente sur le M13AS ne présente une affinité spécifique que pour la streptavidine et pas pour un autre dérivé (tel que la neutravidine). La streptavidine utilisée est une forme recombinante fournie par Thermo Scientific et a un point isoélectrique compris entre 6.8 et 7.5 [11]. Elle est mise en solution

dans du tampon TRIS-HCl – pH = 8.2 – I = 4 mM, puis filtrée à 0.2 μm et sa concentration est mesurée par absorption UV (coefficient d'absorption à 280 nm de 3.2 cm^2/mg) [11]. De l'azoture de sodium (NaN_3) est ajouté à la solution (0.05 %) afin d'empêcher la croissance de bactéries dont les sécrétions peuvent mener à la protéolyse de la protéine.

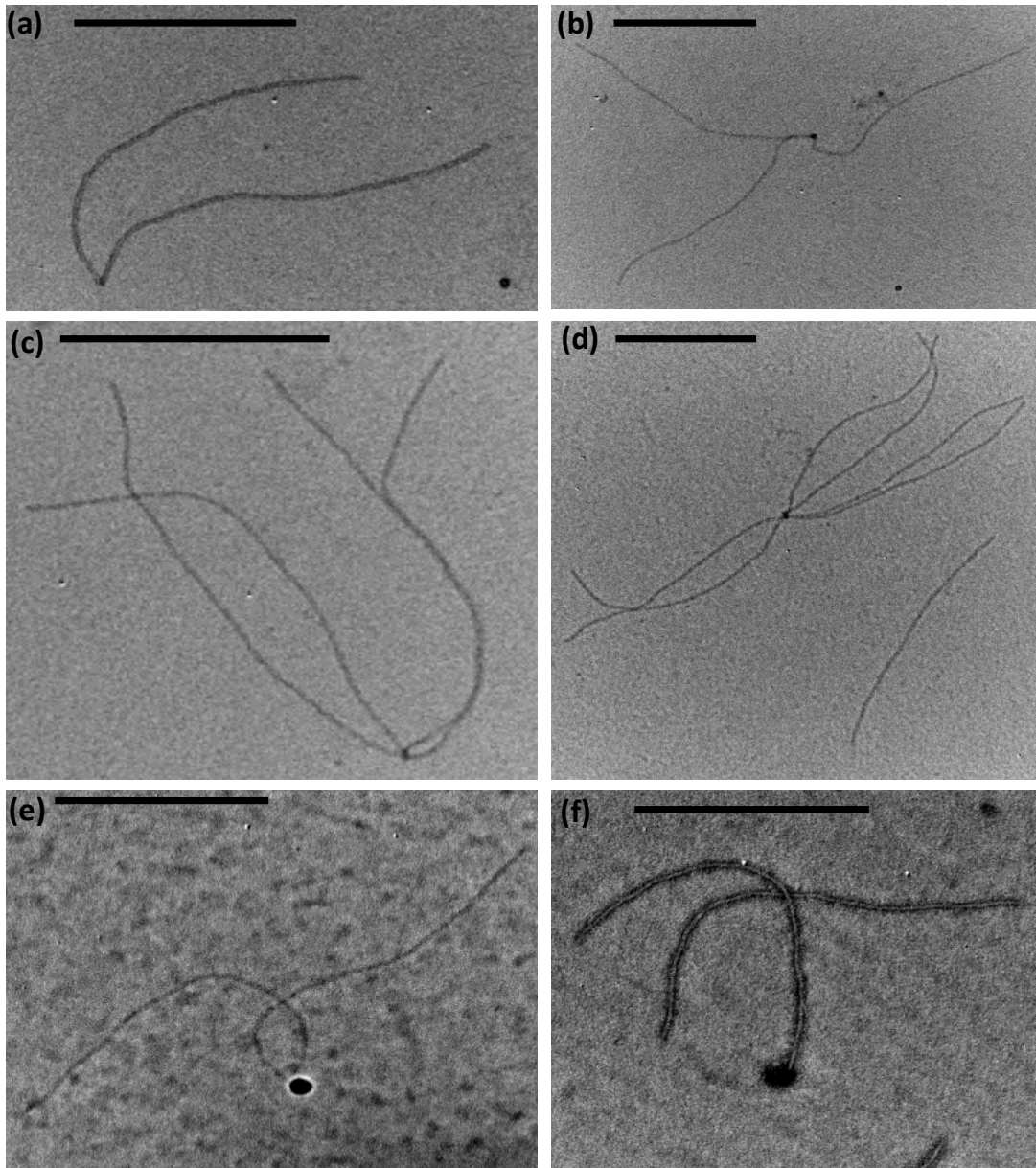


Figure 7 : Différentes structures observables en MET de M13AS mis en présence d'une dispersion de streptavidine ((a)-(d)) ou de nanoparticules dont la surface est activée par de la streptavidine ((e) et (f)). Les structures à (a) 2, (b) 3 ou (c) 4 virus sont dites "contrôlées". Lorsque 5 particules ou plus sont présentes ((d)), l'auto-assemblage est alors "non-contrôlé" et résulte d'interactions non-spécifiques. Les clichés (e) et (f) illustrent le greffage des M13AS aux nanoparticules dont la surface a été recouverte de streptavidine. Les barres d'échelles représentent 500nm.

Un paramètre influant de manière constante sur l'échantillon est la température. La formation du complexe entre le motif HPQ et la streptavidine est exothermique [9,10] et est donc défavorisée par l'augmentation de la température. Dans notre cas, les échantillons sont laissés sous agitation à température ambiante (23 °C maintenue par climatisation) ou à 4°C (au réfrigérateur). Des essais à plus haute température (37°C) ont montré que la formation

d'auto-assemblages était en effet défavorisée et que de surcroît les bactéries se multipliaient de manière significative.

Aussi, le tampon utilisé est le TRIS-HCl, dont le pK_a est dépendant de la température. Pour un même tampon, suivant la température, le pH indiqué par la suite est le pH effectif à la température correspondante, corrigé donc des variations inhérentes aux conditions expérimentales.

Pour chaque statistique présentée, une barre d'erreur est indiquée et correspond à un intervalle de confiance de 95 % sur la statistique.

4.1 Influence des concentrations

4.1.a) Excès molaire de streptavidine

De la même manière que pour les M13-C7C fonctionnalisés par de la biotine, l'un des premiers paramètres qu'il est possible d'ajuster est l'excès molaire de streptavidine par virus.

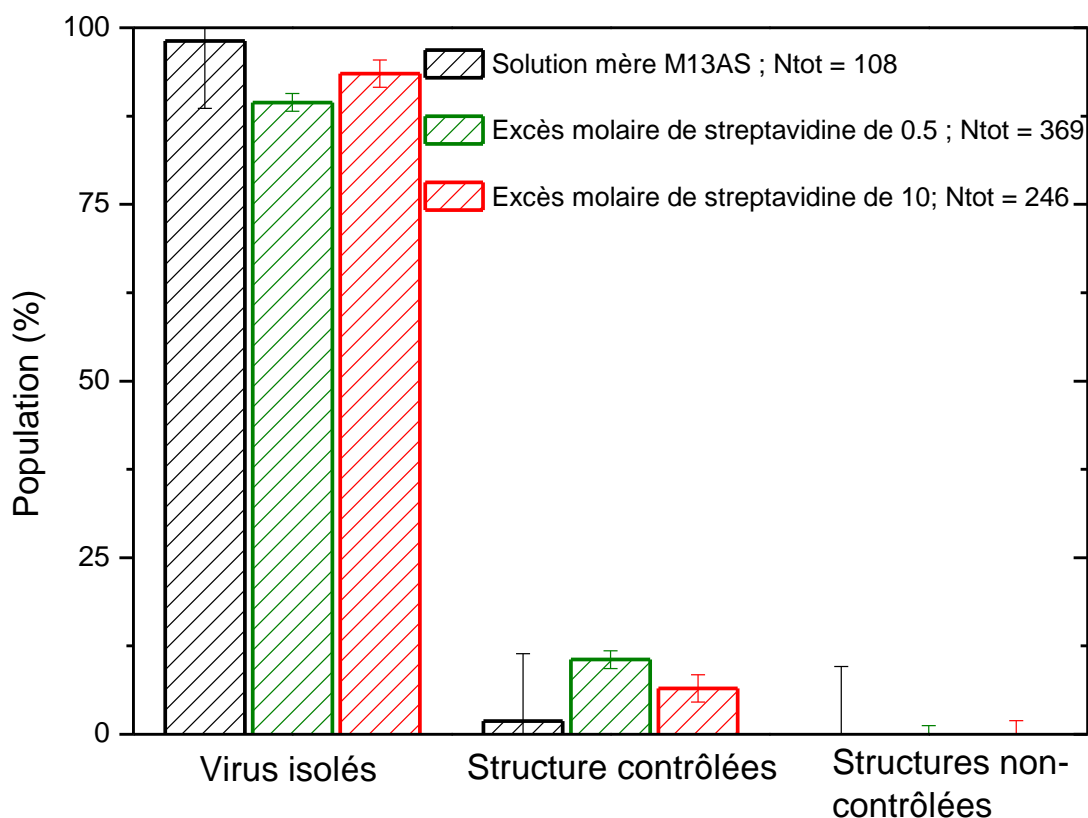


Figure 8 : Répartition des virus dans les différents types d'auto-assemblages pour plusieurs échantillons après 72 heures de réaction : en noir, la solution mère de M13AS, en vert un échantillon contenant un excès molaire de 0.5 de streptavidine par virus et en rouge un échantillon contenant un excès molaire de 10 streptavidines par virus. Les deux échantillons contenant de la streptavidine ont été préparés dans des conditions identiques : tampon TRIS-HCl – I = 350 mM – pH = 7.7 à température ambiante – $C_{M13AS} = 1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$. Les structures contrôlées sont celles ne dépassant pas 4 virus tandis que les structures non-contrôlées sont celles comprenant 5 particules ou plus. Le nombre de virus comptabilisé dans chaque statistique (N) est indiqué dans la légende.

La Figure 8 montre la comparaison entre deux échantillons préparés au même moment et dans les mêmes conditions (tampon TRIS-HCl – I = 350 mM – pH = 7.7 à température ambiante – $C_{M13AS} = 1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$) mais ayant un excès molaire de 0.5 streptavidine par virus pour l'un et 10 pour l'autre. L'excès molaire de 10 streptavidines pour 1 virus a pour but de générer uniquement des complexes M13AS-Streptavidine pour venir dans un second temps les associer avec d'autres M13AS. La répartition présentée en Figure 8 des populations est le résultat de l'observation après 72 heures de réaction.

Dans le cas d'un excès molaire de 0.5, la proportion de structure contrôlée est supérieure à celle observée pour l'excès molaire de 10. L'une des différences notables avec le système fonctionnalisé par voie chimique est l'absence totale de structures non-contrôlées et donc d'interactions non-spécifiques. Cette différence ressort également lors de l'observation de la solution mère de M13AS qui ne contient quasi-exclusivement que des virus isolés.

Afin d'étudier un peu plus l'impact de l'excès molaire de streptavidine, celui-ci est introduit en ajouts successifs par pas de 0.5. Le mélange est ensuite laissé à réagir à 4°C pendant 48 heures sous agitation avant d'être observé en MET et qu'un nouvel ajout soit effectué. Le résultat est présenté en Figure 9.

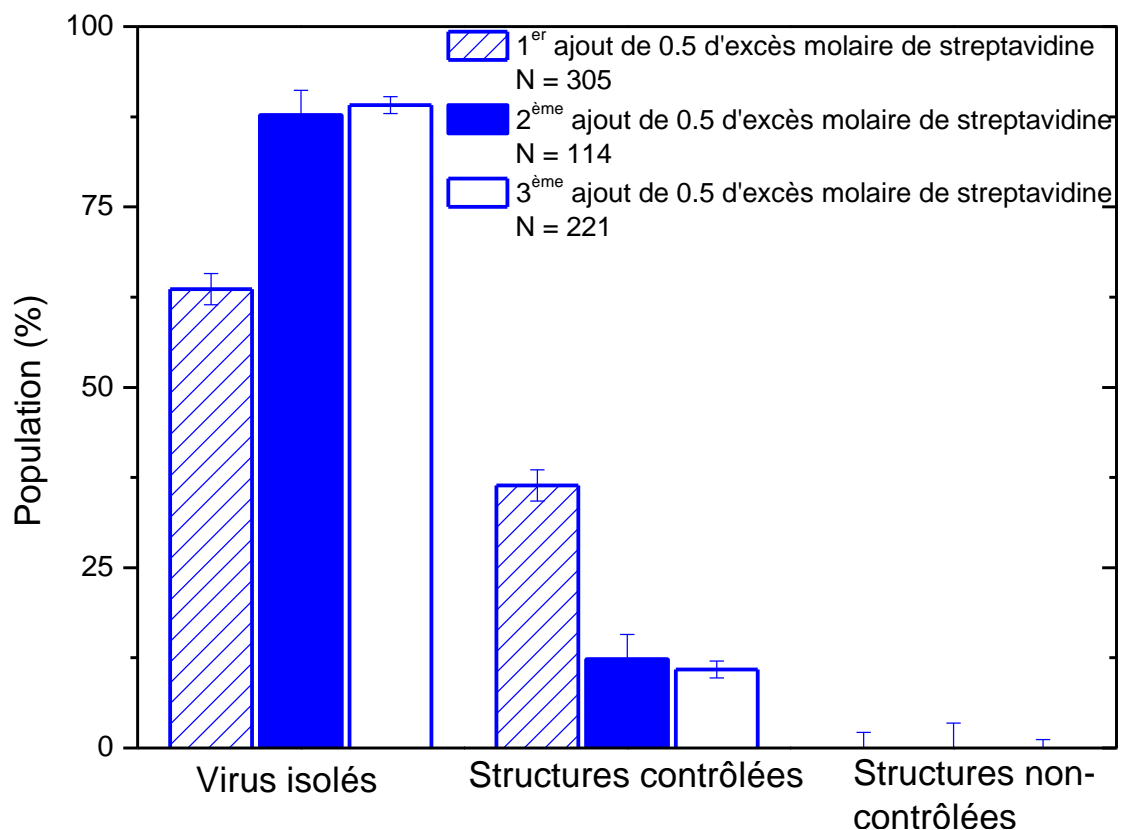


Figure 9 : Répartition des virus dans les différents types d'auto-assemblages pour un échantillon contenant un excès molaire de 0.5 streptavidine par virus (colonnes hachurées) puis après un deuxième ajout d'un excès molaire de 0.5 streptavidine par virus 48 heures après (colonnes pleines) et un troisième ajout d'un excès molaire de 0.5 streptavidine par virus 48 heures après (colonnes vides). L'échantillon initial a été préparé dans les conditions suivantes : tampon TRIS-HCl – I = 350 mM – pH = 7.5 à 4°C – $C_{M13AS} = 1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$. Les structures contrôlées sont celles ne dépassant pas 4 virus tandis que les structures non-contrôlées sont celles comprenant 5 particules ou plus. Le nombre de virus comptabilisé dans chaque statistique (N) est indiqué dans la légende.

Au fur et à mesure que la streptavidine est ajoutée à la solution, il est possible de constater la diminution progressive de la proportion de virus se trouvant dans des structures. Cette évolution est une preuve que le système est un équilibre dynamique. Les virus présents dans les structures vont progressivement être relâchés afin de se lier avec une protéine libre ajoutée venant ainsi augmenter la proportion de virus uniquement complexés avec une protéine. Elle est également en accord avec les observations faites dans la littérature sur le M13AS montrant que lorsque la concentration en streptavidine excède celle en virus, les phages sont alors passivés par les protéines et se retrouvent alors isolés les uns des autres lors de l'observation en MET [7] (qui ne permet pas de distinguer les virus ayant réagi seulement avec une streptavidine de ceux n'ayant pas réagi du tout). Les courbes en Figure 6 traduisent également cette tendance : plus l'excès de billes (i.e. streptavidine) par rapport au virus est important, plus la proportion de complexes augmente, défavorisant ainsi la formation de structures (qui nécessite un virus complexé et un virus libre). Afin de favoriser la formation de structures, il est donc préférable de conserver l'excès molaire de streptavidine suffisamment bas afin d'éviter ce phénomène de passivation.

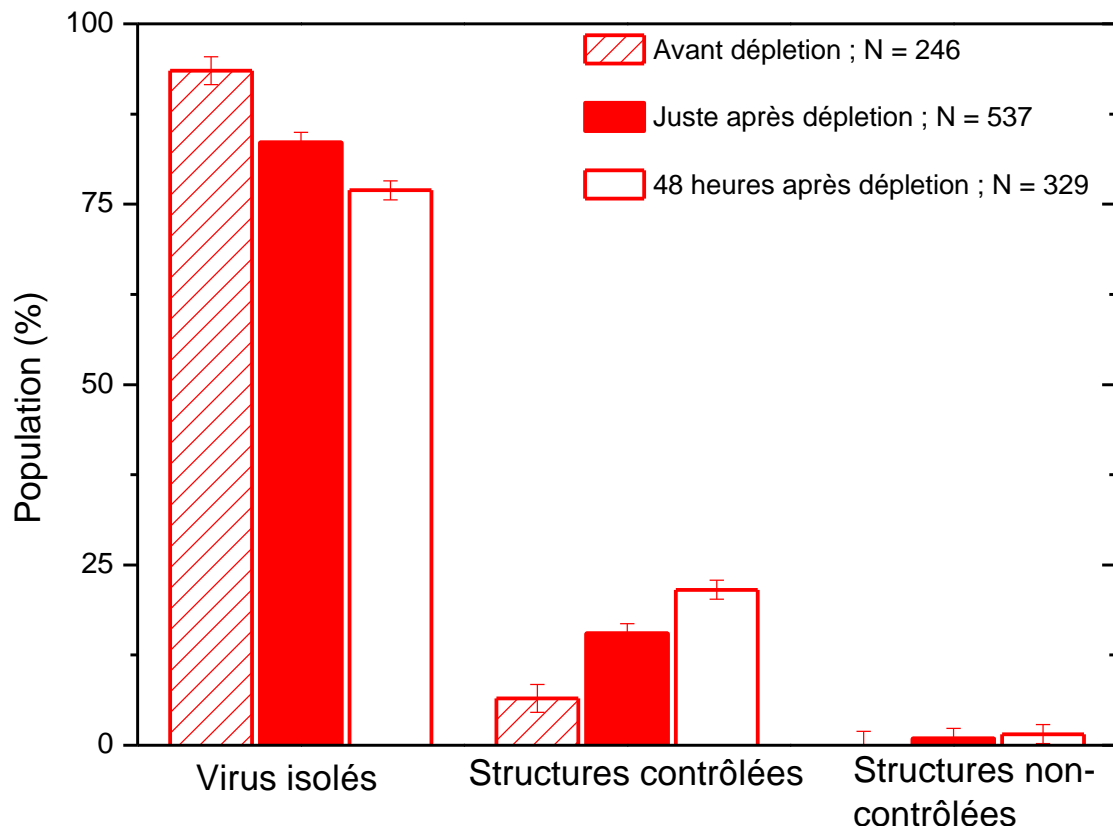


Figure 10 : Répartition des virus dans les différents auto-assemblages pour un échantillon contenant un excès de 10 streptavidines par virus après 72 heures de réaction (colonnes hachurées) puis après sa purification par déplétion et sa redispersion (colonnes pleines) et enfin 48 heures après déplétion (colonnes vides). L'échantillon initial a été préparé dans les conditions suivantes : tampon TRIS-HCl – I = 350 mM – pH = 7.7 à température ambiante – $C_{M13AS} = 1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$. Après déplétion, les virus sont redispersés dans le même tampon et à une concentration de 1 mg/ml. Les structures contrôlées sont celles ne dépassant pas 4 virus tandis que les structures non-contrôlées sont celles comprenant 5 particules ou plus. Ces dernières sont comptabilisées en ne comptant que 5 virus par structure. Le nombre de virus comptabilisé dans chaque statistique (N) est indiqué dans la légende.

De manière inverse, il est également possible d'observer l'effet d'une diminution de l'excès molaire de streptavidine sur le système, ce qui devrait perturber l'équilibre dans

l'autre sens et amener à la formation d'une proportion plus importante de structures. Pour ce faire, l'échantillon préparé avec un ratio de 10 streptavidines par virus est purifié de cet excès par déplétion (ajout d' $1/5^{\text{ème}}$ du volume de l'échantillon d'une solution à 200 g/L en PEG-8k et 2.5 M NaCl puis centrifugation à 13 500 g pendant 20 minutes et redispersion). Après avoir réajusté la concentration en virus à 1 mg/ml avec du tampon, l'échantillon est de nouveau observé en MET puis une seconde fois 48 h après et le résultat des observations est montré en Figure 10.

L'observation juste après la déplétion confirme la présence d'un équilibre dynamique et la proportion de virus dans les structures augmente. Le rapprochement des virus lors de la déplétion peut également expliquer ce phénomène ainsi que l'apparition de structures non-contrôlées (i.e. contenant 5 phages ou plus). La déplétion permet également d'éliminer les protéines restées libres en solution. Afin d'atteindre de nouveau l'équilibre, le système va alors progressivement relâcher les streptavidines liées et passivants les virus ce qui va donc permettre d'aboutir à la formation d'une proportion plus importante d'auto-assemblages. Cette dynamique de l'équilibre est une nouvelle fois confirmée lors de l'observation de l'échantillon 48 heures après la déplétion avec une nouvelle augmentation de la proportion de virus dans les structures.

4.1.b) Concentration en virus

Après la variation de l'excès molaire de la streptavidine, le deuxième paramètre qu'il est possible de faire varier est la concentration en virus qui est l'un des leviers principaux dans la formation de complexe avec la streptavidine. La Figure 11 montre la comparaison entre deux échantillons préparés au même moment et dans les mêmes conditions (tampon TRIS-HCl – I = 350mM – pH = 9.0 à 4°C – excès molaire de 0.5 de streptavidine par virus) mais dont la concentration en virus est de 1 mg/ml (5.41×10^{-8} M) pour l'un et 10 mg/ml (5.41×10^{-7} M) pour le second. La répartition des populations présentée en Figure 11 est le résultat de l'observation après 72 heures de réaction.

L'augmentation de la concentration en virus aboutit donc à la formation d'une proportion similaire de structures. A un tel excès faible de streptavidine par virus, et comme explicité par la Figure 6, la variation de concentration n'altère en effet que très peu l'équilibre final.

Une concentration plus importante mène également à l'apparition de structures non-contrôlées. Cependant, au contraire du système fonctionnalisé chimiquement, ces assemblages ne sont pas attribuables à des interactions non spécifiques entre les séquences –HPQ (puisque ces structures ne sont pas présentes dans la solution mère) mais sont probablement le résultat de l'agrégation de la streptavidine en petits clusters provenant de la concentration plus importante en protéines dans la solution.

La concentration en virus est donc un paramètre à maintenir également suffisamment bas. Son augmentation dans la gamme étudiée ne permet pas la formation d'un nombre significativement plus grand de structures et aboutit même à la formation d'assemblages non-contrôlés. Aussi, la préparation de tels échantillons requiert une quantité plus importante de réactifs pour un résultat similaire.

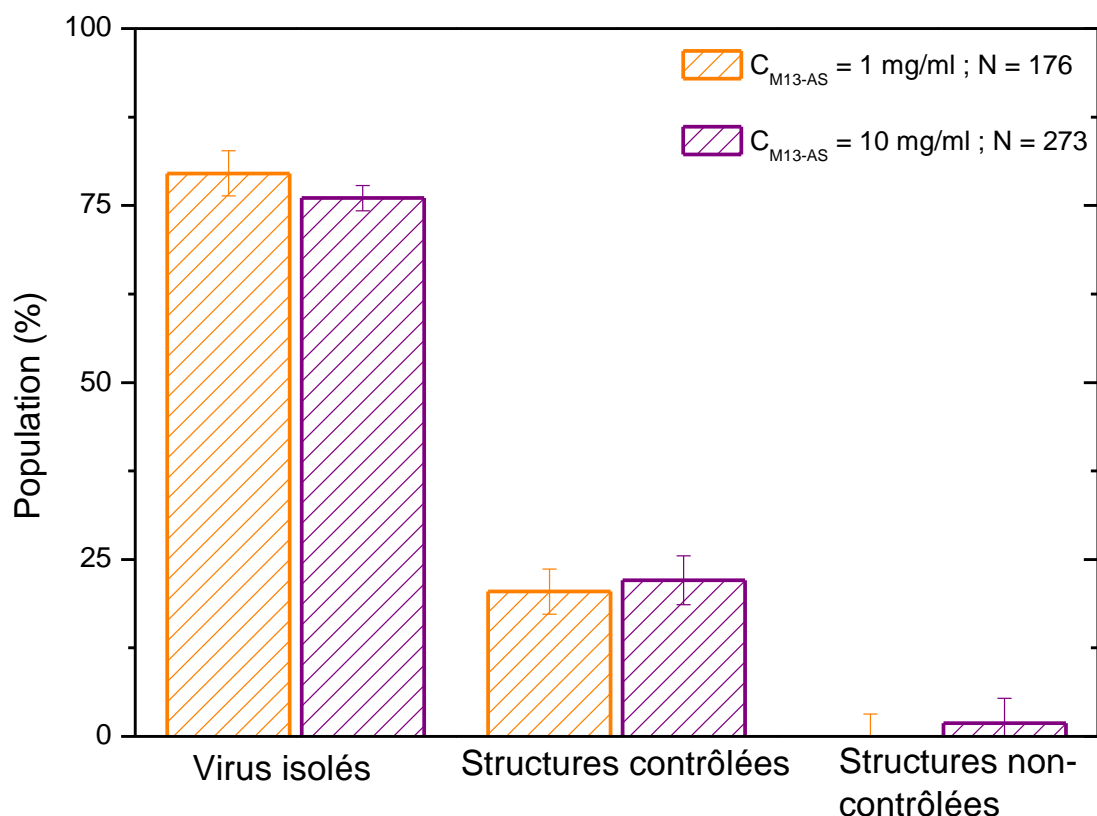


Figure 11 : Répartition des virus dans les différents types d'assemblages pour deux échantillons après 72 heures de réaction : en orange un échantillon à $C_{M13AS} = 1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$ et en violet un échantillon à $C_{M13AS} = 10 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-7} \text{ M}$. Les deux échantillons ont été préparés dans des conditions identiques : tampon TRIS-HCl – I = 350 mM – pH = 9.0 à 4°C – excès molaire de 0.5 streptavidine par virus. Les structures contrôlées sont celles ne dépassant pas 4 virus tandis que les structures non-contrôlées sont celles comprenant 5 particules ou plus. Ces dernières sont comptabilisées en ne comptant que 5 virus par structure. Le nombre de virus comptabilisé dans chaque statistique (N) est indiqué dans la légende.

4.2 Influence de l'électrostatique

Les quantités et proportions des deux réactifs ne sont pas les seuls paramètres influençant sur le système, mais leurs interactions électrostatiques vont également jouer un rôle important. L'intensité de ces interactions est régie par la charge des virus et de la streptavidine et donc de la valeur du pH en comparaison de leurs points isoélectriques (pI) respectifs et la portée de ces mêmes interactions va quant à elle être dépendante de la force ionique.

4.2.a) Influence du pH

La streptavidine utilisée dans nos expériences est une forme recombinante ayant un pI compris entre 6.8 et 7.5 [11] supérieur à celui des virus qui vaut 4.3 [12]. Afin d'éviter que les deux réactifs aient une charge opposée, il convient de se placer à des valeurs de pH supérieures à 6.8 afin d'éviter l'adsorption des protéines sur le corps du M13AS. Lorsque le pH se trouve dans le domaine indiqué du point isoélectrique de la streptavidine, celle-ci est donc neutre et va donc avoir tendance à s'agréger en solution. Le pH doit donc se situer au minimum à 7.5 et au-dessus afin d'éviter l'agrégation et l'attraction électrostatique entre les phages et la streptavidine.

Afin d'étudier l'influence de ce paramètre, trois échantillons ont été préparés à la même concentration en virus ($1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$), au même excès molaire de streptavidine par virus (0.5), dans le même tampon (TRIS-HCl), à la même force ionique (350 mM) et même température (température ambiante) mais pour trois valeurs différentes de pH : 7.5, 7.7 et 8.2. Le résultat des observations en MET après une semaine est présenté en Figure 12.

Pour le pH de 7.5, étant à la limite du domaine du point isoélectrique de la streptavidine, sa tendance à s'agréger est nettement visible par la présence d'une plus grande proportion de virus se trouvant dans des structures non-contrôlées. La protéine étant essentiellement non-chargée, l'absence de répulsion électrostatique entre elle et le virus mène également à la formation d'un plus grand nombre de structures. L'augmentation du pH, et donc de la charge de la streptavidine, entraîne une diminution progressive de la proportion de structures non-contrôlées, ainsi qu'un nombre de virus impliqués dans des structures contrôlées qui fluctuent et semble rester stable au-delà de pH 8.2 (comparaison avec la statistique à pH 9 (4 °C) dans des conditions similaires montrée en Figure 11).

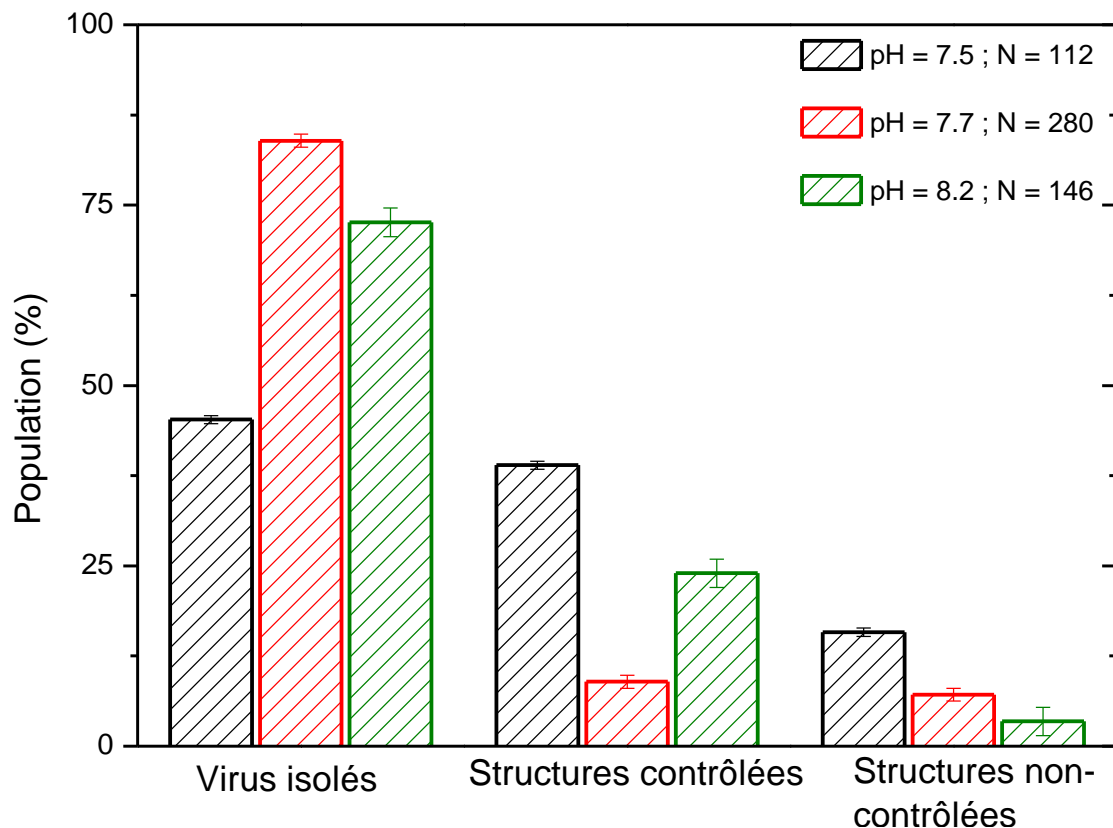


Figure 12 : Répartition des virus dans les différents types d'auto-assemblages pour différents échantillons après une semaine de réaction : en noir à pH 7.5, en rouge à pH 7.7 et en vert à pH 8.2. Les trois échantillons ont été préparés dans des conditions identiques : tampon TRIS-HCl – $I = 350 \text{ mM}$ – température ambiante – $C_{M13AS} = 1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$ – excès molaire de 0.5 streptavidine par virus. Les structures contrôlées sont celles ne dépassant pas 4 virus tandis que les structures non-contrôlées sont celles comprenant 5 particules ou plus. Ces dernières sont comptabilisées en ne comptant que 5 virus par structure. Le nombre de virus comptabilisé dans chaque statistique (N) est indiqué dans la légende.

Afin d'optimiser le nombre de virus se trouvant dans des assemblages contrôlés et surtout empêcher l'agrégation de la streptavidine, le pH est donc

essentiellement un paramètre à maintenir au-dessus de 7.5 qui correspond à la limite haute du domaine isoélectrique de la protéine.

4.2.b) Influence de la force ionique

La force ionique est un paramètre intervenant dans la portée des interactions électrostatiques entre deux objets. Plus elle est élevée, plus les charges présentes vont être écrantées et la portée de la répulsion va en être ainsi diminuée permettant ainsi aux virus et à la streptavidine de se rapprocher plus, favorisant ainsi leur interaction.

Pour étudier l'influence de ce paramètre, deux échantillons ont été préparés à la même concentration en virus ($1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$), au même excès molaire de streptavidine par virus (0.5), à la même température (température ambiante), dans le même tampon (TRIS-HCl) et au même pH (7.5) mais pour deux forces ioniques différentes : 2 et 350 mM. Le résultat des observations en MET après 48 heures est montré en Figure 13.

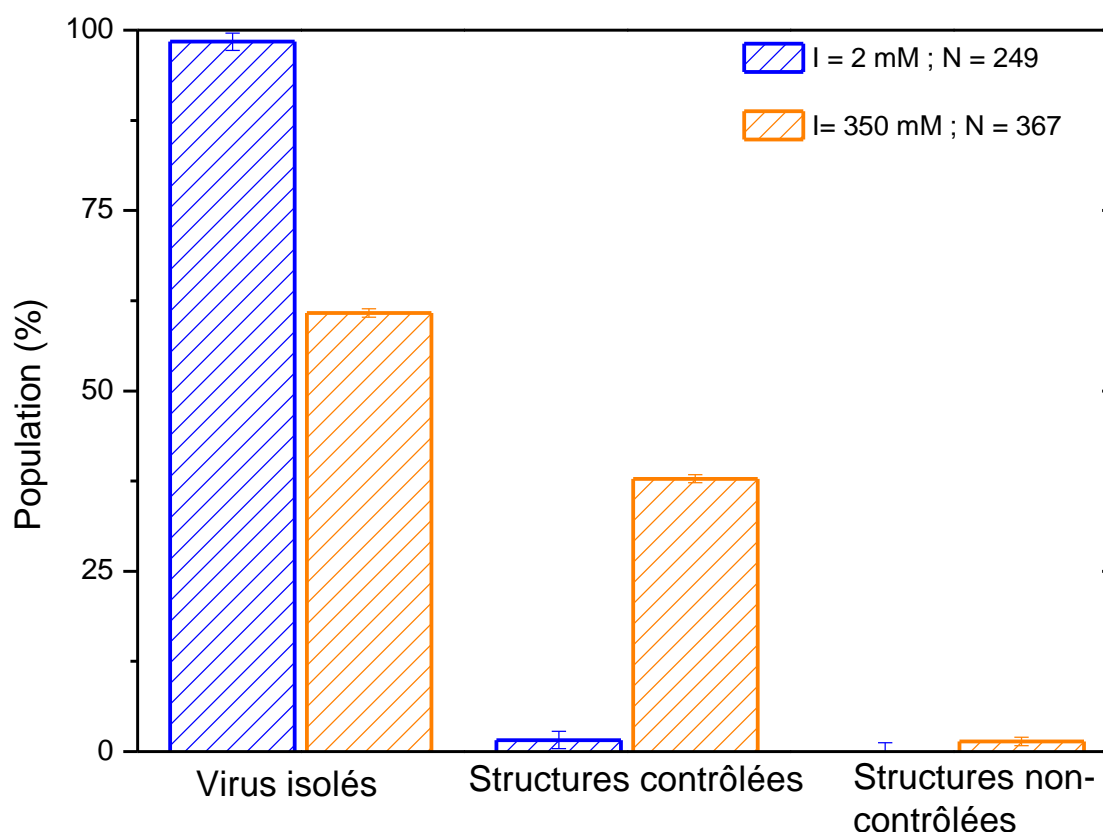


Figure 13 : Répartition des virus dans les différents types d'assemblages pour deux échantillons après 48 heures de réaction : en bleu un échantillon ayant une force ionique $I = 2 \text{ mM}$ et en orange un échantillon ayant une force ionique $I = 350 \text{ mM}$. Les deux échantillons ont été préparés dans des conditions identiques : tampon TRIS-HCl – pH = 7.5 à température ambiante – excès molaire de 0.5 streptavidine par virus – $C_{M13AS} = 1 \text{ mg/ml} = 5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$. Les structures contrôlées sont celles ne dépassant pas 4 virus tandis que les structures non-contrôlées sont celles comprenant 5 particules ou plus. Ces dernières sont comptabilisées en ne comptant que 5 virus par structure. Le nombre de virus comptabilisé dans chaque statistique (N) est indiqué dans la légende.

L'échantillon préparé à $I = 350 \text{ mM}$ présente une proportion plus importante de virus dans des structures que pour la force ionique de 2 mM pour laquelle la quasi totalité des phages sont isolés. De plus, malgré le choix d'un pH bas (à la limite du domaine isoélectrique

de la streptavidine), aucun assemblage non-contrôlé n'est formé, montrant la grande portée de la répulsion électrostatique.

La valeur de la force ionique est donc un paramètre essentiel au système et il convient de la choisir suffisamment haute afin de minimiser la portée des répulsions électrostatiques et ainsi favoriser le rapprochement entre les M13AS et la streptavidine et donc leur interaction.

5. Conclusions sur la formation d'auto-assemblages avec le M13-AS

L'exploration d'une voie biologique permet par *phage display* le design de mutants contenant intrinsèquement une fonction spécifique régio-localisée. Dans le cas du M13-Antistreptavidine, l'insert polypeptidique sur la protéine p3 est une séquence Histidine-Proline-Glutamine (HPQ) qui est une étiquette biologique connue pour sa complémentarité avec la streptavidine.

L'interaction de ce virus avec la streptavidine peut donc être comparée avec celle du système développé dans le chapitre précédent, le M13-C7C fonctionnalisé par de la biotine. Dans un premier temps, il est possible, en étudiant l'interaction du phage avec des billes recouvertes de streptavidine, d'estimer l'affinité du M13AS pour cette dernière. La constante de dissociation, K_d , associée au complexe est de l'ordre de grandeur de 10^{-6} M, ce qui est largement supérieur au K_d du couple biotine/streptavidine (10^{-15} M). Cette affinité beaucoup moins importante peut être notamment constatée par la fraction de billes liées beaucoup plus faible dans le cas du M13AS ($\approx 27\%$) que pour le système du M13-C7C fonctionnalisé par de la biotine ($\approx 95\%$) pour des échantillons préparés dans les mêmes conditions. Cette différence dans la formation de complexe pour les deux systèmes est montrée par le calcul de la fraction de virus liés en fonction des paramètres initiaux (concentration en virus, excès de billes et K_d).

L'observation des virus en MET ainsi que celle de mélanges avec de la streptavidine dans diverses conditions a permis de mettre en évidence un système dans lequel les interactions non-spécifiques sont beaucoup moins présentes. Les structures non-contrôlées observables sont en effet cette fois-ci due à une agrégation partielle de la streptavidine en solution, plus particulièrement dans le cas de systèmes concentrés ou bien lorsque le pH avoisine le point isoélectrique de la protéine.

L'étude menée ci-dessus met en évidence les différents paramètres influant sur la formation de structures lors du mélange de M13AS avec de la streptavidine. L'excès molaire de streptavidine par virus en est le premier exemple. Une valeur trop élevée va en effet aboutir à une passivation des phages les empêchant ainsi d'être impliqués dans la construction d'assemblages. Les variations de cet excès molaire ont par ailleurs permis d'observer que la réaction entre la séquence HPQ du M13AS et la streptavidine est un équilibre dynamique. La concentration en virus, quant à elle, ne semble avoir qu'une faible influence sur les proportions finales observées.

Les forces électrostatiques jouent également un rôle important dans la construction des structures et peuvent être variées grâce à deux paramètres : le pH et la force ionique. Le pH, dans un premier temps, a une influence sur la charge des composés suivant s'il est supérieur ou inférieur à leur point isoélectrique. Dans le cas de la streptavidine utilisée, le pl

correspond à un domaine allant de 6.8 à 7.5. Lorsqu'ils sont préparés au plus près du domaine isoélectrique (pH = 7.5) les échantillons présentent alors une large proportion de structures non-contrôlées qui diminue lorsque le pH, et donc la charge de la protéine, augmente. Cette observation est cohérente avec l'absence de charge sur la streptavidine à pH 7.5 menant à son agrégation tandis que pour des pH supérieurs, la répulsion électrostatique permet de limiter ce phénomène.

Le deuxième paramètre influant sur les forces électrostatiques est la force ionique qui va avoir un impact sur leur portée. A faible force ionique, la portée de la répulsion entre la streptavidine et les virus est grande défavorisant leur interaction. A l'opposée, les fortes forces ioniques engendrent une faible portée de répulsion électrostatique permettant aux objets de plus se rapprocher et donc permet plus d'interactions entre eux. Cette influence se retrouve quantitativement dans les proportions de phages impliqués dans des structures, une proportion quasi-inexistante à faible force ionique et beaucoup plus importante lorsque l'interaction électrostatique est écrantée.

Les observations et statistiques sur ces mélanges entre le M13AS et la streptavidine ont donc permis de dégager des conditions pour lesquelles la formation d'assemblages est plus favorable : concentration aux alentours de 1 mg/ml en virus, faible excès molaire de streptavidine, pH suffisamment haut par rapport au pI de la protéine et force ionique élevée. Dans ces conditions, très peu d'interactions non-spécifiques sont observées, au contraire du système fonctionnalisé chimiquement, de même que dans la solution mère. L'affinité du couple, avec un K_d plusieurs ordres de grandeur au-dessus de celui du couple biotine/avidine, crée cependant un équilibre dynamique, qu'il sera très certainement complexe d'utiliser dans l'optique de créer des auto-assemblages stables sur le long terme.

Il est possible de poursuivre l'exploration du *phage display* en utilisant d'autres séquences. L'exemple de deux mutants différents qui expriment sur la protéine p3 deux séquences différentes mais complémentaires est également réalisable. Ces séquences choisies peuvent notamment être des glissières à leucines (*leucine zippers*) qui sont des résidus d'une trentaine d'acides aminés pouvant s'associer dans des conditions appropriées. Comme présenté dans des travaux par Sweeney *et al.* [13], il est possible d'exprimer ce type de séquences sur la protéine p3 ou la protéine p9 du phage (situées à deux extrémités différentes). En utilisant diverses paires complémentaires, ils ont notamment abouti à la formation de multimères avec des particules dont la longueur peut dépasser 10 fois celle du virus de base. En s'appuyant sur ces travaux, l'idée du système est alors de créer, à l'aide d'un vecteur phage, deux lots de virus afin d'obtenir ces séquences cette fois-ci sur la protéine p3 du virus et avec une expression de 100 %.

Enfin, une autre possibilité pourrait être une combinaison avec la voie biochimique, en utilisant un virus présentant une séquence d'intérêt sur la protéine p3 exprimée par *phage display* et un second régio-fonctionnalisé chimiquement avec une molécule complémentaire. L'une des interactions spécifiques qu'il serait possible d'exploiter est celle entre le peptide hexa-histidine (HHHHHH) et le complexe nickel(II)-acide nitrilotriacétique (Ni-NTA). L'insertion de ce peptide a déjà été réalisé dans la littérature sur la protéine p9 du M13 [7] et le greffage chimique du NTA activé par un maléimide pourrait être alors réalisé à l'extrémité du M13-C7C par le protocole décrit dans le chapitre précédent.

Bibliographie

- [1] G. P. Smith, *Science* **228**, 1315 (1985).
- [2] M. Paschke, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 2 (2005).
- [3] *Ph.D. Phage Display Libraries - Instruction Manual* (New England Biolabs, n.d.).
- [4] C. Souriau, T. D. Hua, M.-P. Lefranc, and M. Weill, *Médecine/sciences* **14**, 300 (1998).
- [5] S.-W. Lee, S. k. Lee, and A. m. Belcher, *Adv. Mater.* **15**, 689 (2003).
- [6] J. J. Devlin, L. C. Panganiban, and P. E. Devlin, *Science* **249**, 404 (1990).
- [7] K. T. Nam, B. R. Peelle, S.-W. Lee, and A. M. Belcher, *Nano Lett.* **4**, 23 (2004).
- [8] J. Sambrook and D. W. Russell, in *Mol. Cloning Lab. Man.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (New-York, 2001).
- [9] P. C. Weber, M. W. Pantoliano, and L. D. Thompson, *Biochemistry (Mosc.)* **31**, 9350 (1992).
- [10] T. G. M. Schmidt, J. Koepke, R. Frank, and A. Skerra, *J. Mol. Biol.* **255**, 753 (1996).
- [11] *Avidin-Biotin Handbook* (Thermo scientific, n.d.).
- [12] K. Zimmermann, H. Hagedorn, C. C. Heuck, M. Hinrichsen, and H. Ludwig, *J. Biol. Chem.* **261**, 1653 (1986).
- [13] R. Y. Sweeney, E. Y. Park, B. L. Iverson, and G. Georgiou, *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 539 (2006).

Chapitre 5 : Effets électro-optiques dans des suspensions cristal-liquides minérales

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (LPMC) qui a réalisé la synthèse des nanoparticules ainsi que le diagramme de phase cristal-liquide. La caractérisation par diffraction des rayons X et microscopie optique ainsi que les expériences d'électro-optique ont quant à elles été effectuées par nos soins, au Centre de Recherche Paul-Pascal (CRPP).

Ce chapitre présente sous la forme de deux articles des travaux traitant des effets électro-optiques dans des suspensions cristal-liquides minérales. L'essentiel de la partie expérimentale de ces études a été effectué durant le stage de master 2 précédant la thèse, le reste ainsi que l'interprétation des résultats et la rédaction ont été réalisés durant la thèse.

Le premier publié dans *Advanced Functional Materials* en 2012 traite de la synthèse de nanoparticules de phosphate de lanthane (LaPO_4) en forme de bâtonnet. La description de cette synthèse est suivie par l'établissement du diagramme de phase cristal-liquide des suspensions de ces particules dans l'éthylène glycol, un solvant dans lequel elles présentent une très grande stabilité colloïdale. L'identification des phases nématique et colonnaire hexagonale est faite par microscopie optique à lumière polarisée couplée par une analyse par diffraction des rayons X aux petits angles. Enfin, les premiers effets électro-optiques d'orientation des particules par un champ électrique sont alors sondés dans ces mésophases concentrées ainsi que la relaxation une fois le champ coupé.

Le second, publié dans *Soft Matter* en 2015 porte sur les effets électro-optiques dans ces mêmes suspensions mais se trouvant cette fois dans une phase liquide isotrope concentrée. L'application du champ électrique va alors provoquer une réorientation des particules qui en s'alignant vont alors permettre d'observer macroscopiquement l'apparition d'une biréfringence. La valeur de cette biréfringence induite est reliée au champ par la loi de Kerr et sa mesure donne accès à leur couplage au travers du coefficient de Kerr. Des mesures de ce couplage sont effectuées dans deux géométries avec un champ électrique directement appliqué (avec des électrodes en contact avec l'échantillon) ou bien appliqué de manière externe (avec des électrodes se trouvant à l'extérieur de la cellule contenant la suspension). Une analyse quantitative dans le contexte étendu de la théorie de Maxwell-Wagner est alors effectuée et montre un bon accord avec les mesures expérimentales. Enfin, après orientation des particules, le temps de relaxation et de retour vers la phase liquide isotrope est mesuré.

Ces deux articles montrent la grande stabilité colloïdale de ces suspensions minérales ainsi qu'un fort couplage avec le champ électrique. Ces propriétés, couplées à la

transparence optique des phases liquide isotrope et nématique ainsi qu'au comportement intrinsèquement athermal des cristaux liquides lyotropes, représentent une preuve de principe prometteuse pour leur intégration dans une nouvelle génération de systèmes électro-optiques.

LaPO₄ Mineral Liquid Crystalline Suspensions with Outstanding Colloidal Stability for Electro-Optical Applications

Jongwook Kim, Alexis de la Cotte, Rodolphe Deloncle, Samuel Archambeau, Claudine Biver, Jean-Paul Cano, Khalid Lahlil, Jean-Pierre Boilot, Eric Grelet,* and Thierry Gacoin*

Mineral liquid crystals are materials in which mineral's intrinsic properties are combined with the self-organization behavior of colloids. However, the use of such a system for practical application, such as optical switching, has rarely been demonstrated due to the fundamental drawbacks of colloidal systems such as limited dispersion stability. Studying colloidal suspensions of LaPO₄ nanorods, it is found that drastic improvement of colloidal stability can be obtained through a transfer of particles from water towards ethylene glycol, thus enabling the investigation of liquid crystalline properties of these concentrated suspensions. Using polarization microscopy and small-angle x-ray scattering (SAXS), self-organization into nematic and columnar mesophases is observed enabling the determination of the whole phase diagram as a function of ionic strength and rod volume fraction. When an external alternative electric field is applied, a very efficient orientation of the nanorods in the liquid-crystalline suspension is obtained, which is associated with a significant optical birefringence. These properties, combined with the high colloidal stability, are promising for the use of such high transparent and athermal material in electro-optical devices.

1. Introduction

Organic liquid crystals play an important role in many active devices such as displays which involve light transmission control using an external electric field. In the early 20th century, Zocher^[1] demonstrated that liquid crystal (LC) behavior could also be observed on mineral suspensions of vanadium

pentoxide ribbons. The pioneering theoretical work of Onsager^[2] provided the explanation on the spontaneous nematic ordering of long hard rods in the purely entropic regime, opening a large field of investigation. In addition to fundamental issues related to self-organization of nanoparticles and their LC behavior, research on inorganic compounds opens the way toward devices that would take benefit from intrinsic properties of minerals such as large refractive index, absorption dichroism, ferroelectricity or ferromagnetism. Although still limited to a few number of compounds, some colloidal suspensions of anisotropic inorganic nanoparticles are now known to exhibit LC behavior such as nematic ordering, thus being referred to as mineral liquid crystals (MLCs).^[3] During mainly the last decade, Rutile,^[4] Boehmite,^[5] Goethite^[6] and CdSe/CdS quantum dots^[7] in rod-like geometry, and Gibbsite,^[8] Laponite and Bentonite^[9]

in shape of clay platelets have been the subject of numerous investigations. Those MLCs qualitatively follow the Onsager's theory, although van der Waals and electrostatic interactions between charged colloidal particles can make the real systems more complicated than the simple model of hard rods.^[10]

In contrast to the vast use of organic LCs, practical applications of MLCs are still limited due to the difficulty in the synthesis of suspensions with appropriate properties up to high particle volume fraction. The question of the colloidal stability of anisotropic particles such as rods is of special importance considering that percolation threshold density ($\Phi_{\text{percolation}} \sim 0.7D/L$ where L and D are the length and the diameter of the rod, respectively^[11]) which indicates that the gelation point of colloidal rods can occur below the spontaneous isotropic liquid–nematic (Iso–Nem) transition density ($\Phi_{\text{iso-nem}} \sim 4D/L$) as predicted by Onsager.^[2] Investigation of LC behavior over a wide range of Φ thus requires high inter-particle repulsion to avoid aggregation or gelation quenching the mobility of individual particles^[12] which is essential for the collective LC behavior. Moreover, the dependence of the stability of colloidal systems on the suspension ionic strength have made it especially

J. Kim, Dr. R. Deloncle, Dr. K. Lahlil, Prof. J.-P. Boilot, Prof. T. Gacoin
Laboratoire de Physique de la Matière Condensée
CNRS–Ecole Polytechnique, 91128, Palaiseau, France
E-mail: thierry.gacoin@polytechnique.edu

A. de la Cotte, Dr. R. Deloncle, Prof. E. Grelet
Centre de Recherche Paul-Pascal
CNRS–Université de Bordeaux
115 Avenue Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France
E-mail: grelet@crpp-bordeaux.cnrs.fr

Dr. S. Archambeau, Dr. C. Biver, Dr. J.-P. Cano
ESSILOR International
Rue Pierre et Marie Curie, 31682 Labège, France

DOI: 10.1002/adfm.201200825



difficult to electrically switch MLC orientation causing a short-circuit problem. Although different MLC systems have already been studied, there is thus still a place for research on new compounds with optimized properties in terms of LC behavior, dielectric contrast and anisotropy, and optical transparency, the latter concerning color and light scattering properties up to high volume fractions.

We here report a new type of MLC system composed of lanthanum phosphate (LaPO_4) nanorods stabilized in a non-aqueous solvent and totally free from aggregation. The excellent quality of suspensions obtained from an optimization of the process, attested by their limited light scattering properties, allowed us to investigate the LC properties even in the concentrated regime of the columnar mesophase. Nanorods with three different sizes were prepared to investigate the predicted effect of rod size on the LC behavior.^[2] A phase diagram was established showing the stability of the different phases (isotropic liquid/nematic/columnar) as a function of the solution ionic strength. We finally showed the ability of these nanorod suspensions to be aligned both in the nematic and in the columnar phases by applying a weak external electric field, initiating further electro-optical investigations that had been one of the most undeveloped fields for MLCs.

2. Result and Discussion

2.1. Preparation of Colloidal LaPO_4 Nanorod Suspensions

Several previous works have reported on the synthesis of LaPO_4 particles with an anisotropic shape which is originated from the anisotropy of the crystallographic growth rate along the [001] direction.^[13] The typical synthesis method is basically achieved in two steps: 1) precipitation of primary particles by mixing aqueous La^{3+} and PO_4^{3-} precursor solutions and 2) hydrothermal growth of these particles over 150 °C. As-prepared LaPO_4 particles are shown to exhibit a long rod-like shape when they were grown under acidic conditions ($\text{pH} < 2$). To our knowledge, there has been so far no report on the LC behavior of these colloidal LaPO_4 particles. This is presumably because of aggregation that usually occurs during or after the synthesis. Large rod aggregates are not appropriate for lyotropic LC behavior because they flocculate easily and scatter light enormously, resulting in an unstable colloidal suspension with turbid milky aspect.

We revisited the process and developed a simple method to produce individually dispersed LaPO_4 nanorod suspension avoiding aggregation even at high concentrations. As a starting point, we found out following the early developed methods^[13] that, when the precursor solutions were mixed, instantly generated primary particles rapidly aggregated through some kind of oriented attachment mechanism leading to uncontrolled bundles and aggregates, and the following hydrothermal treatment thus leads to large rod aggregates (see Figure S1a in the Supporting Information). A key improvement could be obtained by limiting the aggregation of the primary particles by minimizing the concentration (down to 0.05 M) and the temperature (down to 0 °C) during the first step.^[14] Importantly,

the second step of hydrothermal treatment at 160 °C should be performed rapidly in order to enhance particle growth through dissolution/recrystallization process instead of aggregation. Following such a procedure, the dispersion quality and the colloidal stability of the product were greatly improved. (Figure 1a) shows a typical scanning electron microscopy (SEM) image of the as-prepared nanorods. The measured average length (L) and diameter (D) of the standard-sized rods (Figure 1a) are 252 nm and 11 nm respectively with an average aspect ratio (L/D) of 23. Monocrystalline structure is anticipated from the straight form with a constant diameter. This is confirmed by high-resolution transmission electron microscopy (TEM) image (Figure 1d) that clearly shows a periodic fringe pattern of lattice planes. The rod shape corresponds to the preferential growth along the c direction of the rhabdophane structure that was evidenced by powder X-ray diffraction (XRD) (Figure 1e).^[13b-e]

Concerning the rod aspect ratio, which is an important parameter for the LC behavior, previous studies showed that it could be controlled by playing on the acidity of the medium during the synthesis.^[13a] Nevertheless, this parameter could not be used considering that colloidal stability is only observed in a narrow pH range around 2 where the nanorod surface is strongly charged while the ionic strength is not too high. We then used another strategy considering that we found it possible to cut the standard rods using ultra-sonication. Samples with the same diameter ($D = 11$ nm) but shorter length ($L = 200$ nm) were obtained, corresponding to an aspect ratio of $L/D = 18$. A typical SEM image of these nanorods is shown in Figure 1b. This sample will further be referred to as lar-rods, considering their lower aspect ratio as compared to the standard rods (Table 1)

Finally, another route to obtain nanorods with different sizes was to let the primary particle suspension grow at ambient temperature instead of performing the hydrothermal treatment. In this case, we observed that crystallization of the particles into nanorods does occur slowly in several days leading to particles with almost the same aspect ratio as the standard-sized sample. As mentioned above, the overall quality of these samples is not as good as the one obtained after rapid hydrothermal treatment, but this was a way to obtain particles with a length about three times lower ($L = 80$ nm, $D = 3.7$ nm, $L/D = 22$) (Figure 1c, Table 1). These nanorods will further be referred to as s-rods, considering their smaller length as compared to the standard samples.

Colloidal stability of the aqueous LaPO_4 nanorod suspension can be maintained at $\text{pH} < 3$ and $\Phi < 1\%$. Flow-birefringence was observed in this state indicating the nanorod capability to self-organize into LCs. However, the dispersion equilibrium was easily broken out of this condition and typical instable kinetics such as flocculation or gelation took place as observed generally on various anisotropic inorganic colloidal systems.^[11,12,15] Such a colloidal instability owing to aggregation disabled the system to exhibit spontaneous Iso-Nem phase transition that might have occurred at a higher Φ . Moreover, aging of the aqueous system was indispensable even at the pH and Φ range optimized for the initial colloidal stability: passing through a couple of months, aggregates were slowly generated making the suspension become turbid (Figure S1-2, Supporting Information). To avoid this unfavorable effect, MLCs have often been

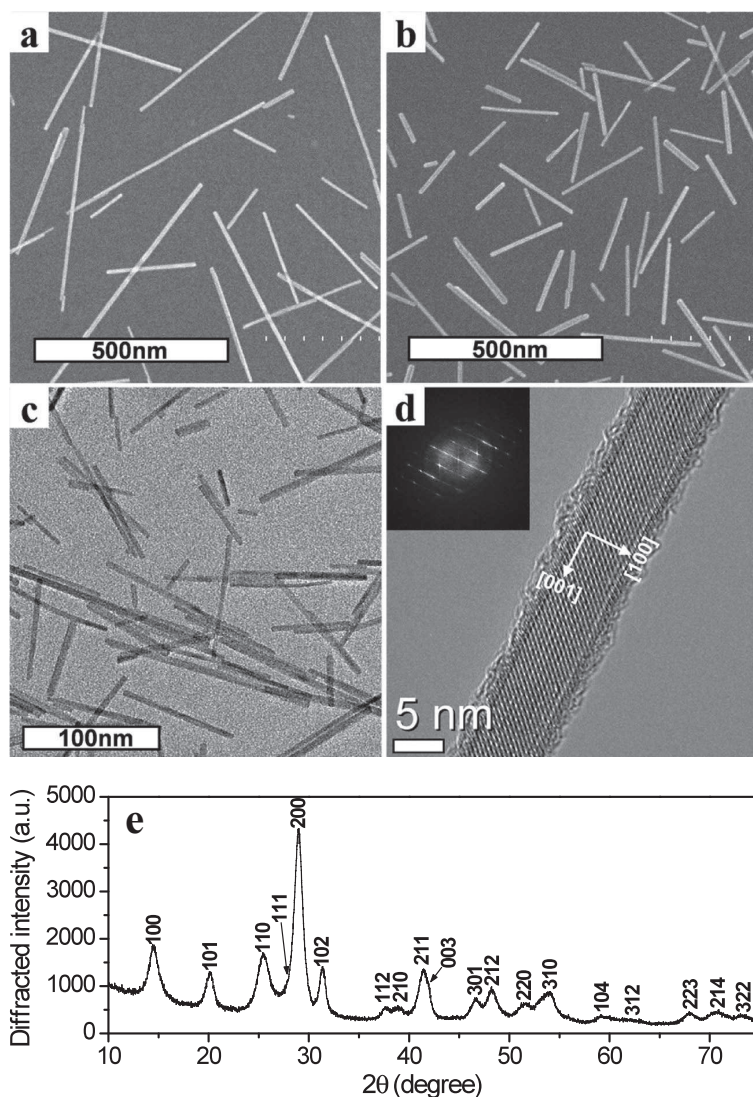


Figure 1. SEM images of standard rods (a) and lar-rods (b). c) TEM image of the s-rods. d) HR-TEM image of a standard rod. The white arrows indicate the crystallographic axis. Inset is the corresponding fast Fourier transformation (FFT). Note that the irregular surface is due to the fusion of the crystal by the high voltage electron beam for high resolution. e) XRD pattern of the standard rods and corresponding indexation from the rhabdophane reference (JCPDS 46-1439). Histograms of the size and diameter distributions on the three different-sized samples are given in Figure 2d,e and in the Supporting Information.

Table 1. Length, diameter, and aspect ratio of the different systems of LaPO_4 nanorods with their standard deviations (σ).

	L [nm]/ σ	D [nm]/ σ	L/D
standard-rods	252/0.63	11/0.19	23
lar-rods	200/0.64	11/0.23	18
s-rods	80/0.58	3.7/0.16	22

prepared by grafting polymeric molecules at the surface of rod-like particles to apply steric hindrance at the attraction domain.^[5,16] But it is true that this way requires complex chemical routes and may change the original property of the colloidal system due to the large amount of molecules added into the system. Compatibility of the molecules with both the particle surface and the solvent should also be considered deliberately.

In a much more simple way, we were able to perfectly exclude aggregation and disclose pure LC property of LaPO_4 nanorods by exchanging the solvent from water to ethylene glycol (EG). EG is a polar protic solvent leading to the electrostatic stabilization of charged particles as in water. This is shown experimentally as the stability of the LaPO_4 particles is largely increased when EG is acidified to ensure the optimal surface charge, while the increase of the ionic strength by addition of salts decreases the dispersion stability. Furthermore, our experiments show that the stability in EG is significantly improved as compared to water, suggesting an additional effect of EG for the stabilization of the particles. The explanation has to be found in a specific interaction between glycol groups and the surface of the particles resulting in solvation and/or chelation of surface cations.^[17] The presence of a capping shell of structured EG molecules may limit the minimal distance between particles providing the additional stabilization through steric hindrance. This appears similar to the common cases where polyethyleneglycol (PEG) is used to stabilize particles in water or biological media.^[18] It should also be noted that the transfer is very easy, since EG is just added in the initial suspension and water is then removed by distillation. Actually, a permanent colloidal stability was achieved in EG over a large ionic concentration range at the elevated Φ where gelation dominated in the aqueous medium. As an evidence, a sample in EG with $\Phi = 6.2\%$ (20.4 wt%) is showing a constant large transparency without any sign for aggregation during more than a few months (Figure S2, Supporting Information).

2.2. Liquid Crystalline Phase Behavior

Thanks to such an outstanding colloidal stability, two distinct liquid crystalline organizations at equilibrium have been observed from the LaPO_4 nanorods concentrated in EG. (Figure 2a,b) shows a macroscopically phase separated LC suspension of lar-rods concentrated in EG ($\Phi = 3.4\%$, before phase

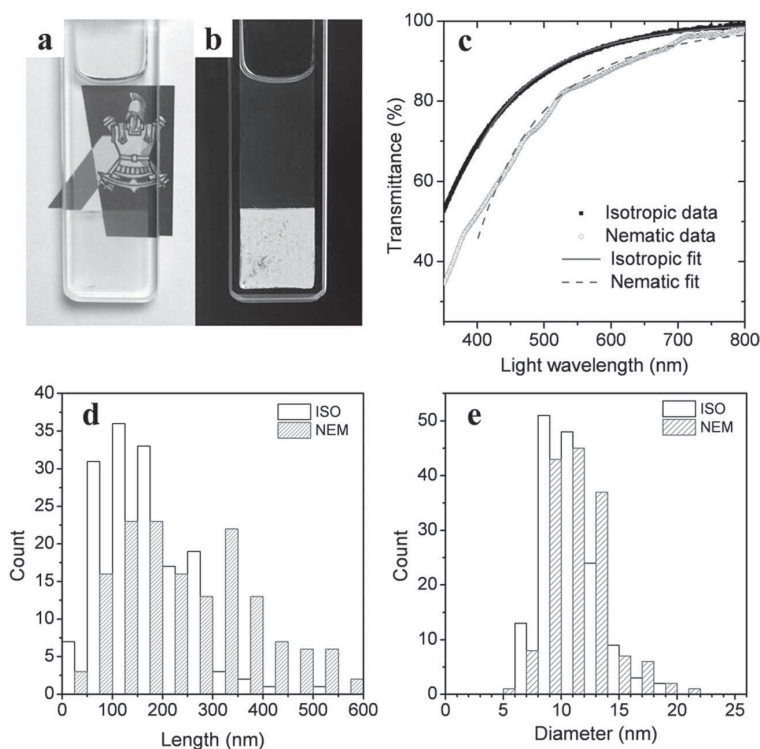


Figure 2. a) Macroscopic isotropic liquid–nematic (Iso-Nem) phase separation of LaPO_4 nanorod colloidal suspension in ethylene glycol. Both isotropic liquid upper state and nematic bottom state are transparent so that the figure behind the 2 mm-thick cell is clearly seen. b) The same sample observed between crossed polarizers exhibits some birefringence associated with the nematic bottom phase. c) Transmittance spectra as a function of the light wavelength (λ) of both phases from the sample shown in (a,b). The transmittance T has been fitted according to the following equation $T = 1 - (\lambda_0/\lambda)^4$, characteristic of Rayleigh scattering. d,e) Nanorod length and diameter distributions measured in the isotropic and nematic phases respectively after macroscopic phase separation.

separation). The picture of the sample between crossed polarizer (Figure 2b) clearly shows the isotropic upper phase and the nematic bottom phase where some birefringence due to the randomly distributed nematic domains can be seen. This Iso-Nem macroscopic phase separation occurred only in one night after preparing the sample. Such a fast phase separation indicates that the LC behavior is not perturbed by other kinetic effects like gelation and that the system is very well stabilized in EG. This sample at the elevated Φ is transparent not only in the isotropic phase but also in the nematic phase (Figure 2a) indicating that aggregates were efficiently eliminated. Percent transmittance spectra in Figure 2c was taken directly from this cell, and the transmittances at 550 nm were 91% and 84% respectively for isotropic and nematic phases.

This indicates that, if it is used in the typical electro-optical devices with the thickness of several tens of micrometers, the light loss would be less than 1%. The transmission of the sample can be reasonably fitted with a $1/\lambda^4$ dependence, λ being the light wavelength. Such a behavior is typical of Rayleigh scattering. Note that some additional scattering exists in the nematic phase, probably due to the finite size of nematic

domains. Size fractionation^[2,19] which is predicted and observed on polydisperse systems, occurred in our system too. The size distribution histograms in Figure 2d,e shows that the isotropic phase contains more short rods ($L = 163$ nm, $L/D = 16$) and the nematic phase contains more long rods ($L = 256$ nm, $L/D = 22$).

Polarization microscopy enabled to directly observe and identify most of the different LC mesophases diluting the concentrated samples without waiting for the macroscopic phase separation. Highly birefringent texture of columnar mesophase, the Schlieren texture of the nematic phase, tactoids at the biphasic Iso-Nem range, and the dark isotropic liquid phase without birefringence are observed along the dilution and shown in Figure 3. Here, typical Schlieren texture and tactoids confirm again that our samples correspond to equilibrium states. Also, a phase diagram of the standard-sized nanorod sample as a function of the ionic strength and Φ was constructed (Figure 4) through the observation on the samples which were purified by a series of dialysis. The initial nitric acid concentration (C_{HNO_3}) of the samples in EG with large Φ (up to 9%) was ~ 0.1 M. At such a high C_{HNO_3} , the samples were in a turbid gel state due to the strong ionic strength—mainly given by C_{HNO_3} , which counterbalances the repulsive surface charge resulting in particle aggregation (right dark region in Figure 4). Purification by dialysis effectively removes the nitric acid from those samples in the gel state. C_{HNO_3} of once dialyzed samples decreased to ~ 0.02 M and they turned into a limpid LC mesophase sols.

After a full purification, 99% of the nitric acid could be eliminated ($C_{\text{HNO}_3} \sim 0.001$ M). The non-diluted samples escaped from the gel state were purely nematic or even columnar as shown by X-ray scattering. And their successive dilutions showing various textures of LC mesophases (Figure 3) allowed us to find out the concentrations where the phase transition occurs.

According to the phase diagram (Figure 4), volume fractions for the Iso-Nem phase transition are much lower on the whole studied ionic strength range than the theoretical value ($\Phi_{\text{iso-nem}} \sim 17\%$) calculated by substituting the average rod aspect ratio ($L/D = 23$) into Onsager's theory of hard rods. However, electrostatic interactions have to be considered, by defining an effective rod diameter (D_{eff}), which is larger than the bare one and which depends on both the ionic strength of the medium and the particle surface charge density. Indeed, LaPO_4 nanorods are strongly positively charged in the acidic condition due to the surface protonation, which is in fact the driving force for the colloidal stability of the suspensions. Increasing ionic strength screens the repulsive electrostatic interactions, therefore revealing the bare particle dimensions by decreasing D_{eff} . The rod concentration scaling with the inverse of the effective

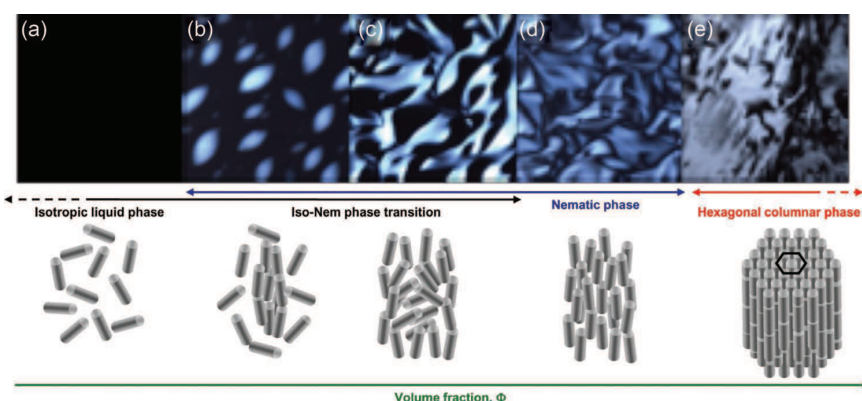


Figure 3. Optical texture observed by polarizing microscopy and schematic representation of the different liquid crystalline phases of LaPO_4 suspensions when increasing the nanorod volume fraction. a) Isotropic liquid phase appearing dark between crossed polarizers ($\Phi = 0.43\%$). b) Coexistence of both the isotropic liquid phase (dark background) and birefringent anisotropic droplets of the nematic phase (also called tactoids) ($\Phi = 0.92\%$) (image size: $220\ \mu\text{m}$). c) Sample at phase coexistence as picture (b) where the size of nematic regions has increased ($\Phi = 1.1\%$) (image size: $440\ \mu\text{m}$). d) Typical Schlieren texture of the nematic sample ($\Phi = 1.5\%$) (image size: $440\ \mu\text{m}$). e) Birefringent texture of a concentrated sample identified as a hexagonal columnar phase by small angle X-ray scattering (SAXS) ($\Phi = 4.34\%$) (image size: $1760\ \mu\text{m}$). Sample thickness is several micrometers for all microscopy images.

diameter, it is expected a shift to higher volume fractions of the Iso-Nem phase transition, as it is observed experimentally in Figure 4 (dashed lines). Moreover, the highest volume fraction for purely isotropic liquid $\Phi_{\text{iso-max}}$ of lar-rods (open triangles) with the low aspect ratio ($L/D = 18$) are placed higher than those of standard rods. These last two results show a qualitative agreement with Onsager's theory. The quantitative

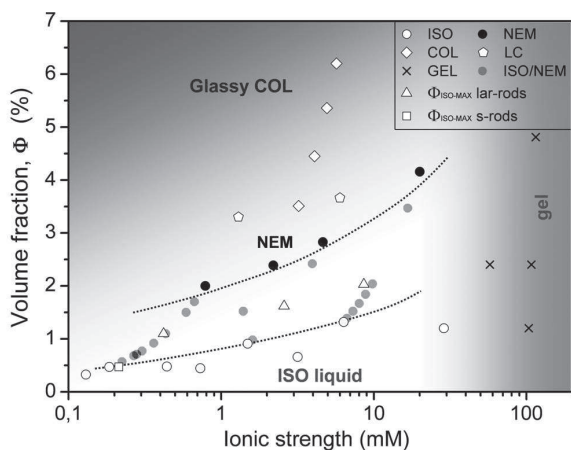


Figure 4. Phase diagram of LaPO_4 nanorod colloidal suspension in ethylene glycol. Open circles, black circles, and grey circles indicate isotropic, nematic, and isotropic/nematic biphasic domains of standard rods ($L/D = 23$) respectively. Open diamonds indicate columnar phase which were verified by SAXS, and open pentagons indicate purely liquid crystalline (nematic or columnar) domain of standard rods. Triangles indicate maximum volume fractions for purely isotropic phase ($\Phi_{\text{iso-max}}$) of lar-rods ($L/D = 18$) that are placed higher than those of standard rods. Open square is $\Phi_{\text{iso-max}}$ of s-rods ($L/D = 22$). Crosses indicate the high ionic strength domain where the suspension is in a gel state.

discrepancy with theory also observed in other MLCs^[20] can be explained considering that the validity of Onsager's theory is for the needle-like limit, i.e., for rod aspect ratio $L/D \gg 1$.^[2] This is not the case of our LaPO_4 nanorods, especially when electrostatic interactions are taken into account by D_{eff} . Furthermore, rod polydispersity as well as attractive interactions can shift the volume fractions by broadening the biphasic domain at the Iso-Nem phase transition.^[21] Such attractive interactions could originate from van der Waals interactions, which become effective at high ionic strength when electrostatic repulsions are screened. They can induce a transition from a sol to a gel state, as indicated in the right dark region in Figure 4.

2.3. Small Angle X-Ray Scattering Analysis

An interesting feature of the concentrated suspensions is that their viscosity increased a lot during the purification process going toward the low ionic strength. They finally turned into a glassy-like state (Upper left dark region in Figure 4) which corresponds to a hexagonal columnar mesophase as demonstrated by small angle X-ray scattering (SAXS) in Figure 5. In this highly ordered phase, the nanorods self-organize into liquid-like columns which in turn form a bi-dimensional hexagonal crystalline array (Figure 3). In this phase at low ionic strength, repulsive interactions dominate, therefore avoiding particle aggregation and maintaining a large transparency of the suspension. For this reason, the pure LC phases of the LaPO_4 system can be manipulated in the concentrated regime. It is sometimes difficult to distinguish unambiguously by polarization microscopy the nematic phase from the columnar one - because both mesophases are birefringent. Several points above the Iso-Nem biphasic range on the phase diagram (Figure 4) are thus still unclear whether they are in nematic or in columnar phase. Instead, SAXS experiments have been performed for

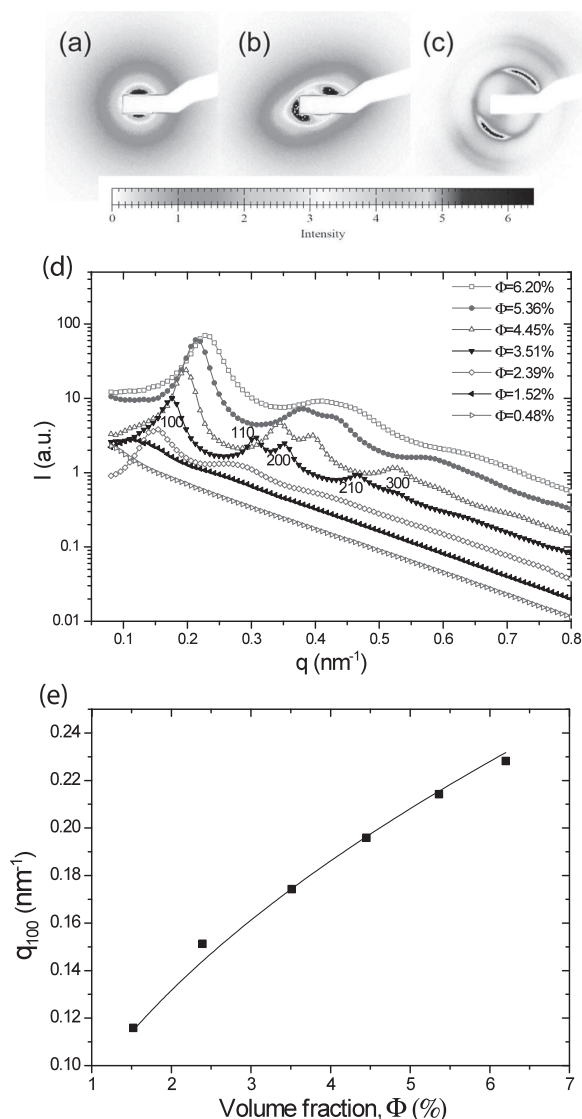


Figure 5. Typical diffraction patterns obtained by SAXS in a) the isotropic liquid phase, b) the nematic phase, and c) the columnar phase. d) Scattered intensity I as a function of the wave vector q for different volume fractions Φ of LaPO_4 suspensions. The Miller indices only shown for clarity at $\Phi = 3.51\%$ indicate a hexagonal structure of the columnar mesophase. e) Evolution of the position of the main Bragg reflection (100) with the nanorod volume fraction Φ . The dark line is a data fit $q_{100} = \alpha\Phi^{1/2}$ characterizing a swelling law of a 2D order.

different dilutions of one purified sample (Figure 5d), indicating a swelling law behavior of bi-dimensional order with $q_{100} = \alpha\Phi^{1/2}$ (Figure 5e). The prefactor α can be easily calculated for a hexagonal lattice with $\alpha^2 = 32\pi/(\sqrt{3}D^2)$. From the numerical fit of the data, the rod diameter can be estimated as approximately 8 nm, which is roughly consistent with the value of 11 nm measured by SEM (Table 1). Note that some broadening

of the Bragg reflections can be seen in the columnar range by increasing the rod volume fraction (Figure 5d). This is related to finite size effects originating from the concentration step of the particles, in which the LC domain size in the sample decreases by removing the solvent, increasing therefore the width of the Bragg peaks.^[22]

2.4. Alignment Under Electric Field

Considering the outstanding colloidal stability and the good optical transparency at low ionic strength even for high Φ of particles, this system appears very attractive for investigations of electro-optical properties targeting active transparent devices. Experiments were achieved both on a nematic phase at $\Phi = 1.55\%$ and on a columnar phases at $\Phi = 4.34\%$ respectively, at low ionic strength, in an experimental cell made of an ITO electrode with a gap and a glass coverslip. Typical birefringent texture was observed initially, where the LC domains were randomly oriented at the macroscopic scale (Figure 6a). When the electric field was applied, the nanorods on the gap were aligned along the electric field inducing a bright birefringence on this area where the orientational order parameter (S) is close to 1 for $E > E_S$ (Figure 6b). When the electric field was turned off, the macroscopic alignment - free of topological defects - is conserved because no elastic force exists to restore the initial random alignment (Figure 6c). The value of S by spontaneous orientation without electric field is less than the one driven by electric field, therefore it relaxed back in about 1 hour resulting in a decrease of the birefringence. Quantitative measurements of the orientation and the relaxation of the LC phases by an electric field are shown in Figure 6d,e. Interestingly, the critical field required to fully orient both the nematic and the columnar phases is found to be quite low ($E_S \sim 0.05$ V/ μm). It must be noted that in these experiments, the initial values of the birefringence (at zero field) depends on the arbitrary orientation of the domain where the measurement is made. The final value of the birefringence (4.4×10^{-3}) must be considered relatively to the volume fraction of nanoparticles ($\Phi = 4.34\%$). Assuming a linear relationship, extrapolation of this value for $\Phi = 100\%$ gives a normalized birefringence of about 0.1, which is comparable to pure compounds of typical thermotropic LCs. The long relaxation time is also peculiar as this enables to maintain the once switched state for a long while after turning the field off. Thus a promising electro-optical performance is clearly demonstrated in our system, being therefore one of the first mineral LCs for which the effect of applied electric field can be easily investigated.^[23,24] Application of this material to a switchable optical device would also benefit from its low production cost compared to expensive organic LC compounds and the distinguished properties of the mineral colloidal system such as athermal LC behavior and stability of the mineral mesogens under irradiation of UV or large flux of light. This could be used for different practical applications such as smart windows or high power laser modulation over a large range of light wavelength including UV. Further experiments such as inducing a birefringent nematic phase

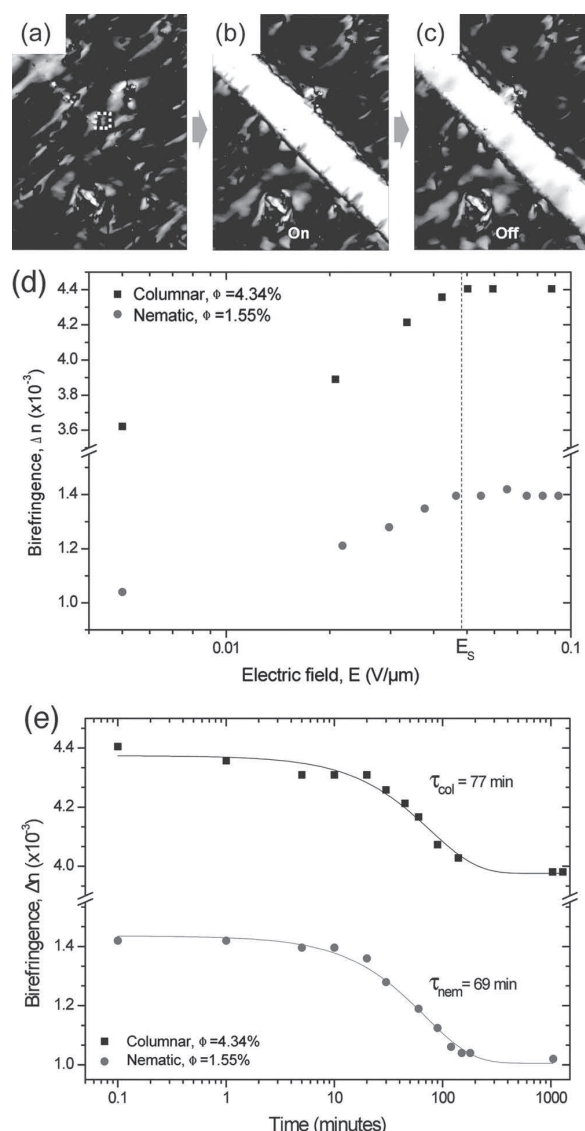


Figure 6. Optical microscopy images of the LaPO_4 nanorod colloidal liquid crystalline suspensions deposited in a cell of about $45 \mu\text{m}$ thick. This cell is made by a glass coverslip and an ITO electrode with a gap width of $170 \mu\text{m}$ has been performed for applying an alternative in-plane electric field, E . a) Before applying the electric field, the samples exhibit some birefringent domains. Dashed box indicates the zone where the birefringence was measured using Berek compensator. b,d) The application of a sinusoidal electric field at a frequency of 400 kHz induced the orientation of the (nematic or columnar) mesophase in the gap showing large birefringence. c,e) When the electric field is switched off, relaxation of the nanorod alignment is observed with a decrease of the associated birefringence. This corresponds to an exponential decay with a characteristic time τ of about 1 h in both phases, as shown by the solid lines in panel (e).

by an electric field from the isotropic liquid phase (also called Kerr effect)^[25] can be envisaged in near future with our colloidal LaPO_4 nanorod suspensions.

3. Conclusions

In this work, we have shown that LaPO_4 nanorods dispersed in ethylene glycol exhibit a very high colloidal stability in suspension, as shown by the self-organization into different liquid crystalline phases, e.g., nematic and columnar mesophases. These stable dispersions have been obtained through the optimization of the whole process of synthesis, solvent transfer, and purification, but without any specific chemical functionalization of the nanorod surface. This enables therefore production of large amount of such nanorod suspension in a few steps, and it could possibly be applicable for other mineral colloidal systems. We have also shown that these concentrated nanorods dispersions can be very efficiently aligned with a weak applied electric field of about $0.05 \text{ V}/\mu\text{m}$, exhibiting then relatively large optical birefringence at low volume fraction. Associated with a high optical transparency, this opens the way toward electro-optical devices based on mineral liquid crystals.

4. Experimental Section

Preparation: Equimolar (0.05 M) solutions of $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were mixed at $0 \text{ }^\circ\text{C}$, and the mixture was rapidly heated to $160 \text{ }^\circ\text{C}$ in the autoclave to produce grown LaPO_4 nanorods. Lar-rods were prepared by doing ultrasonication during 3 h on the grown nanorods suspension. S-rods were prepared by leaving the precursor solution mixture stirred during 4 days at the ambient temperature without hydrothermal treatment. So-prepared aqueous colloidal suspensions were washed once by centrifugation, and then purified by dialyzing in 0.01 M aqueous nitric acid solution to remove residual reactive ions. Purified nanorods were then transferred into ethylene glycol (EG) by mixing with EG and then distilling water using rotary evaporator. The volume fraction (Φ) of nanorod suspensions were also modified here by varying the mixed EG volume. Purification by dialysis in EG was conducted four times in series refreshing the EG bath.

Characterization: High resolution transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) were performed respectively on FEI Tecnai F20 and Hitachi S4800 field electron gun scanning electron microscope (FEG-SEM). To identify the extent of aggregates, SEM samples were prepared by attaching nanorods on a negatively charged poly-styrene-sulphonate layer coated on a silicon wafer substrate. The nanorod size data were obtained by counting the length and diameter of 300 individual particles on different SEM images (for standard rods and lar-rods) and TEM images (for s-rods) from each sample. The estimated precision for the size determination is about 1 nm for standard rods and lar-rods, and about 0.2 nm for s-rods respectively. X-ray diffraction (XRD) pattern was obtained using Philips X'pert diffraction system working at $\text{CuK}\alpha$ radiation, and indexed comparing with the rhabdophane reference -JCPDS 46-1439. Small angle X-ray scattering (SAXS) measurements were carried out on the SWING beamline at the synchrotron radiation facility SOLEIL (France), with a sample to detector distance of 1384 mm and with a wavelength of 0.103 nm . The polarization optical microscopy to observe the LC texture and to perform the electro-optical measurements was conducted on $15 \mu\text{L}$ of LaPO_4 suspensions deposited between a typical microscope slide and a coverslip using Olympus BX51 microscope combined with a color CCD camera (JAI, CV-M7). Indium tin oxide (ITO) electrodes with a gap of about $170 \mu\text{m}$ width were connected to a function generator for applying an in-plane sinusoidal alternative electric field on LaPO_4 suspensions. Birefringence measurements were performed locally in the sample, typically in a $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ zone by using a Berek compensator providing the optical retardation. An equilibration time of 2 min was taken between two measurements under applied electric field. Nitric acid concentration (C_{acid}) was obtained by fitting the measured

electric conductivity (σ) to the C_{acid} vs. σ curve of the reference nitric acid solutions. The mass concentration of the colloidal solution was obtained with a dried sample of a given volume, and the volume fraction was calculated dividing it by the density of LaPO_4 in rhabdophane phase, 4.3 g/cm^3 .

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors would like to thank F. Nallet and L. Navailles for the synchrotron beamtime. S. Bellei, A. Potdevin and R. Tricarico are acknowledged for preliminary experiments.

Received: March 23, 2012

Revised: May 22, 2012

Published online: July 23, 2012

- [1] H. Zocher, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1925**, 147, 91.
 [2] L. Onsager, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 627.
 [3] a) P. Davidson, J.-C. P. Gabriel, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, 9, 377; b) J. C. P. Gabriel, P. Davidson, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 9.
 [4] A. Dessombz, D. Chiche, P. Davidson, P. Panine, C. Chanéac, J.-P. Jolivet, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5904.
 [5] P. A. Buining, H. N. W. Lekkerkerker, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 11510.
 [6] B. J. Lemaire, P. Davidson, J. Ferré, J. P. Jamet, P. Panine, I. Dozov, J. P. Jolivet, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 88, 125507.
 [7] L.-s. Li, J. Walda, L. Manna, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* **2002**, 2, 557.
 [8] F. M. van der Kooij, H. N. W. Lekkerkerker, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 7829.
 [9] J.-C. P. Gabriel, C. Sanchez, P. Davidson, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 11139.
 [10] A. Stroobants, H. N. W. Lekkerkerker, T. Odijk, *Macromolecules* **1986**, 19, 2232.
 [11] A. P. Philipse, A. M. Wierenga, *Langmuir* **1998**, 14, 49.
 [12] a) A. Mohraz, D. B. Moler, R. M. Ziff, M. J. Solomon, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 92, 155503; b) M. J. Solomon, P. T. Spicer, *Soft Matter* **2010**, 6, 1391; c) A. Wierenga, A. P. Philipse, H. N. W. Lekkerkerker, D. V. Boger, *Langmuir* **1998**, 14, 55; d) A. Mohraz, M. J. Solomon, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 300, 155.
 [13] a) H. Meyssamy, K. Riwotzki, A. Kornowski, S. Naused, M. Haase, *Adv. Mater.* **1999**, 11, 840; b) Y.-P. Fang, A.-W. Xu, R.-Q. Song, H.-X. Zhang, L.-P. You, J. C. Yu, H.-Q. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16025; c) X. Wang, M. Gao, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 1360; d) W. Bu, L. Zhang, Z. Hua, H. Chen, J. Shi, *Cryst. Growth Des.* **2007**, 7, 2305; e) M.-G. Ma, J.-F. Zhu, S.-W. Cao, F. Chen, R.-C. Sun, *J. Alloys Compd.* **492**, 559.
 [14] a) M. Y. Lin, H. M. Lindsay, D. A. Weitz, R. C. Ball, R. Klein, P. Meakin, *Nature* **1989**, 339, 360; b) P. Van der Schoot, *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 6083.
 [15] V. Trappe, P. Sandkühler, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, 8, 494.
 [16] a) M. P. B. van Bruggen, H. N. W. Lekkerkerker, *Langmuir* **2002**, 18, 7141; b) S. Meuer, P. Oberle, P. Theato, W. Tremel, R. Zentel, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 2073.
 [17] P. Yang, Z. Quan, C. Li, Z. Hou, W. Wang, J. Lin, *J. Solid State Chem.* **2009**, 182, 1045.
 [18] A. Mpandou, B. Siffert, *Colloids Surf.* **1987**, 24, 159.
 [19] G. Oster, *J. Gen. Physiol.* **1950**, 33, 445.
 [20] P. Davidson, *C. R. Chim.* **2010**, 13, 142.
 [21] G. J. Vroege, H. N. W. Lekkerkerker, *Rep. Prog. Phys.* **1992**, 55, 1241.
 [22] E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, 100, 168301.
 [23] E. Paineau, K. Antonova, C. Baravian, I. Bihannic, P. Davidson, I. Dozov, M. Imperor-Clerc, P. Levitz, A. Madsen, F. Meneau, L. J. Michot, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 15858.
 [24] M. Zorn, M. N. Tahir, B. Bergmann, W. Tremel, C. Grigoriadis, G. Floudas, R. Zentel, *Macromolecules* **2010**, 31, 1101.
 [25] I. Dozov, E. Paineau, P. Davidson, K. Antonova, C. Baravian, I. Bihannic, L. J. Michot, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 7751.

Copyright WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69469 Weinheim, Germany, 2012.

ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS

Supporting Information

for *Adv. Funct. Mater.*, DOI: 10.1002/adfm.201200825

LaPO₄ Mineral Liquid Crystalline Suspensions with
Outstanding Colloidal Stability for Electro-Optical
Applications

*Jongwook Kim, Alexis de la Cotte, Rodolphe Deloncle, Samuel
Archambeau, Claudine Biver, Jean-Paul Cano, Khalid Lahlil,
Jean-Pierre Boilot, Eric Grelet,* and Thierry Gacoin**

Supporting Information

- Dispersion of nanorods -

(Fig. S1) shows the SEM images of nanorods produced either using the as reported method-(a) and the optimized condition-(b) developed in this work. These two images evidence the improvement obtained through a relatively simple modification of the process.

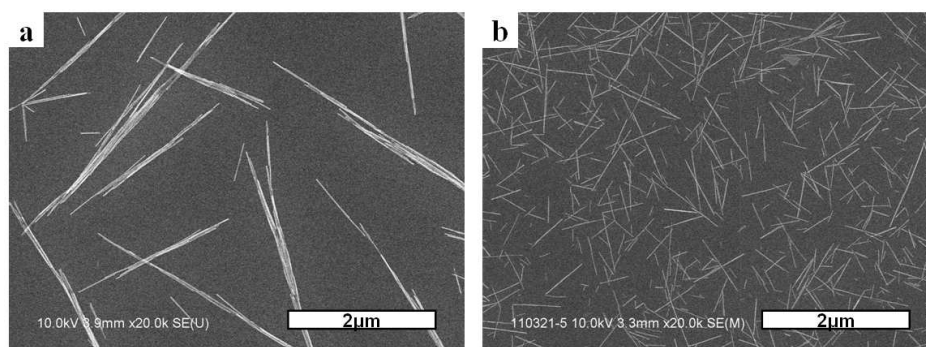


Figure S1. SEM images of aggregated-(a) and well-dispersed-(b) LaPO₄ nanorods.

(Fig. S2) shows that the two samples have totally different macroscopic colloidal behaviors. The well-dispersed aqueous sample (Fig. S2a), which corresponds to (Fig. S1b), shows a very limpid aspect. But the sample of aggregated rods (Fig. S2c) corresponding to Fig. S1a is not stable and the rods settle at the bottom of the vial showing a turbid milky aspect due to the enhanced light scattering related to the large size of aggregates. Well-dispersed sample aged for one month (Fig. S2b) becomes less limpid because of aggregation slowly occurring in the suspension. (Fig. S2d) is a sample at $\Phi=1\%$ with the pH adjusted to 3.5 by dialysis. This sample was as stable as well-dispersed sample (Fig. S2a) before dialysis, but it turned into a turbid gel state at this higher pH. On the other hand, (Fig. S2e) is a much more concentrated suspension ($\Phi=6.2\%$) transferred into EG, where the columnar phase was observed (See the main text). Surprisingly, it shows a large transparency comparable to the diluted aqueous suspensions. These results both due from the stability of the individually dispersed rods and the higher refractive index of EG ($n_{EG}=1.43$) as compared to that of water ($n_{water}=1.33$).

Submitted to

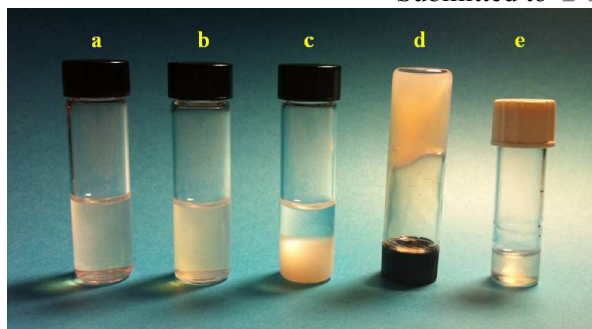


Figure S2. Colloidal aqueous suspension samples of well-dispersed rods-(a), one month-aged rods-(b), settled aggregated rods-(c), gelled rods-(d), and a sample of well-dispersed rods concentrated in EG-(e). Rods volume fractions (Φ) are 0.5% for (a-c), 1% for (d), and 6.2% for (e).

- Size distribution of nanorods -

The size and aspect ratio are key parameters determining the LC properties of the rods suspension. As mentioned in the main text, the average lengths (L) are 252nm, 200nm and 80nm and the average aspect ratios (L/D) are 23, 18 and 22 respectively for standard rods, lar-rods and s-rods. The histograms of the distribution of length and diameter of each sample are shown in (**Fig. S3a-b**). Lognormal fits (red lines) provide the standard deviation (σ) that quantifies the polydispersity. Considering the lengths, σ values of the three samples are all around 0.6 (0.63, 0.64 and 0.58 respectively for standard rods, lar-rods and s-rods). Considering their diameters, σ values were all situated around 0.2 (0.19, 0.23, and 0.16 respectively).

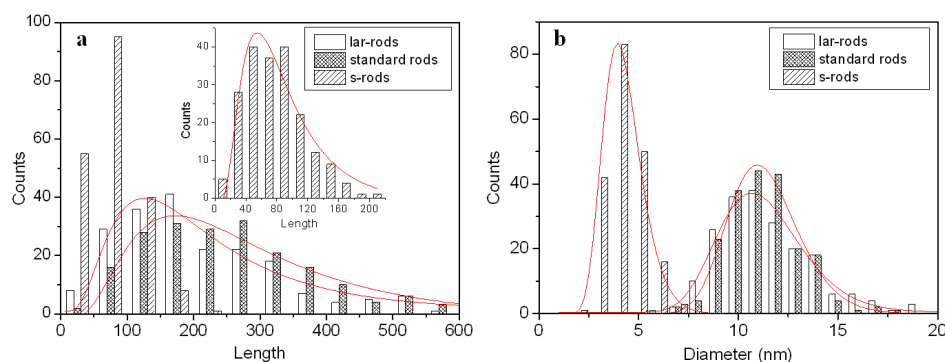


Figure S3. Length-(a) and diameter-(b) distribution histograms for different sized LaPO_4 nanorod samples. The red lines are Lognormal fits. The inset in (a) is for s-rods with smaller bin size.



Cite this: *Soft Matter*, 2015, 11, 6595

Electric field induced birefringence in non-aqueous dispersions of mineral nanorods†

Alexis de la Cotte,^a Pascal Merzeau,^a Jong Wook Kim,^b Khalid Lahli,^b Jean-Pierre Boilot,^b Thierry Gacoin^b and Eric Grelet^{*a}

Lanthanum phosphate (LaPO₄) nanorods dispersed in the non-aqueous solvent of ethylene glycol form a system exhibiting large intrinsic birefringence, high colloidal stability and the ability to self-organize into liquid crystalline phases. In order to probe the electro-optical response of these rod dispersions we study here the electric-field-induced birefringence, also called Kerr effect, for a concentrated isotropic liquid state with an in-plane a.c. sinusoidal electric field, in conditions of directly applied (electrodes in contact with the sample) or externally applied (electrodes outside the sample cell) fields. Performing an analysis of the electric polarizability of our rod-like particles in the framework of Maxwell–Wagner–O’Konski theory, we account quantitatively for the coupling between the induced steady-state birefringence and the electric field as a function of the voltage frequency for both sample geometries. The switching time of this non-aqueous transparent system has been measured, and combined with its high Kerr coefficients and its features of optically isotropic “off-state” and athermal phase behavior, this represents a promising proof-of-concept for the integration of anisotropic nanoparticle suspensions into a new generation of electro-optical devices.

Received 9th June 2015,
Accepted 7th July 2015

DOI: 10.1039/c5sm01427a

www.rsc.org/softmatter

1 Introduction

The response of anisotropic fluids to external electric fields has been widely studied and has led specifically to a major technological advance, the Liquid Crystal Displays (LCD).^{1,2} When applied to a liquid crystalline sample, the external electric field induces usually a reorientation of the mesogens along or perpendicular to the field. This electro-optical effect has been observed on a wide spectrum of materials, ranging from thermotropic molecular compounds (exhibiting a temperature dependent phase behavior) used in LCDs^{1–9} to lyotropic dispersions of anisometric colloidal nanoparticles (whose phase behavior is concentration dependent),¹⁰ such as filamentous viruses,^{11,12} pigment particles,^{13,14} silica rods^{15,16} or graphene oxide sheets.^{17,18}

In the case of dilute suspensions into the isotropic liquid state, applying an electric field results in an induced nematic-like organization with the emergence of an associated birefringence.^{19–21} Beyond the intrinsic properties of the individual particles such as the presence of a permanent dipole or a core polarization

induced by the field, several kinds of phenomenon are likely to arise to explain the coupling of the particles with the electric field.^{11,12,19,20,22,23} The first one is due to the dielectric mismatch between the particle and the solvent, creating an electrical dipole by the accumulation of dipolar bound charges at the particle/solvent interface. Similarly, when mobile charges are present in the particles, their accumulation at the interface leads to a contrast of conductivities with the surrounding electrolyte. Both mechanisms are known as the so-called Maxwell–Wagner polarizability, and are dependent on the electric field frequency. Working with charged particles usually enables the colloidal stability of their dispersions. This also induces the distortion of the electrical double layer by the external field (as well as other related phenomenon such as the electro-osmotic flow), as first described by O’Konski,²⁴ who shows that the polarization of the ionic cloud is often the dominating mechanism.

We present here a study of the electric field induced birefringence in liquid suspensions of lanthanum phosphate (LaPO₄) nanorods. A key feature of our system is that while most of the studies are performed in aqueous solvent,^{11,12,17–21,25–29} our LaPO₄ rod-like particles are dispersed in ethylene glycol in which they exhibit an outstanding colloidal stability compared to water as reported in a previous paper.³⁰ In this work, we first investigate the frequency dependence of the steady-state electric birefringence in our non-aqueous suspensions. Under an in-plane alternative (a.c.) electric field and with electrodes immersed in the sample, the frequency threshold between the conductivity contrast or dielectric

^a Centre de Recherche Paul-Pascal, CNRS – Université de Bordeaux, 115 Avenue Schweitzer, 33600 Pessac, France. E-mail: grelet@crpp-bordeaux.cnrs.fr

^b Laboratoire de Physique de la Matière Condensée, CNRS – Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5sm01427a



mismatch based polarization mechanisms is determined. We then account quantitatively for the Kerr effect and its dependence with the field frequency and with the rod volume fraction thanks to the Maxwell–Wagner–O’Konski theory. The switching time, and consequently the rotational diffusion coefficient of the LaPO₄ rods in ethylene glycol, is measured in order to consider the potential use of such a system in electro-optical devices. Due to the limitations brought by charge injection at the electrodes leading to possible electric shortcircuits, we have also designed an original cell, inspired by previous works,^{19,20} in which the electric field is applied tangentially to a thin dielectric quartz capillary wall limiting therefore its attenuation as shown by finite-element simulations. This geometry, which has the benefit to avoid any electric degradation of the sample even in steady-state regime under continuous sinusoidal field, shows similar optical retardation compared to cells with directly applied in-plane electric field.

II Materials and setups

A. Sample preparation and characterization

LaPO₄ nanorods, synthesized according to ref. 30, are shown in Fig. 1. Their main features are an average length of $L = 250$ nm and a diameter of $D = 11$ nm. Their polydispersity is provided through the standard deviation of their size distribution, $\sigma_L = 0.63$ and $\sigma_D = 0.19$, respectively.³⁰ The samples are prepared by diluting the rod-like particles with ethylene glycol to reach a concentration close to the binodal volume fraction ($\phi_B = 0.8\% \pm 0.1\%$) corresponding to the highest concentration of the isotropic liquid phase before the transition to the nematic state. The corresponding range of ionic strength I is in between 0.1 and 1 mM depending on the sample dilution. The dispersion conductivity is measured thanks to a conductivity meter (CDM210, Radiometer analytical). The LaPO₄ surface charge density is estimated by zeta-potential measurement (Zeta Compact, CAD Instruments) as described in the ESL.†

B. Electro-optical setups

The first electro-optical setup is a commercial In-Plane Switching (IPS) cell containing 330 line-shaped electrodes (Instec Inc.).

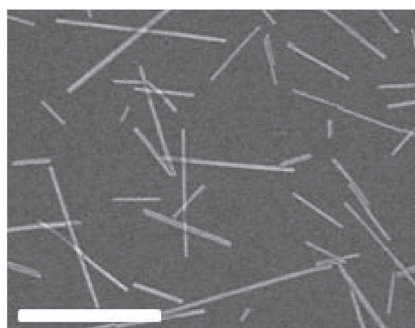


Fig. 1 Scanning electron microscopy picture of the LaPO₄ nanorods obtained according to ref. 30. The scale bar is 500 nm.

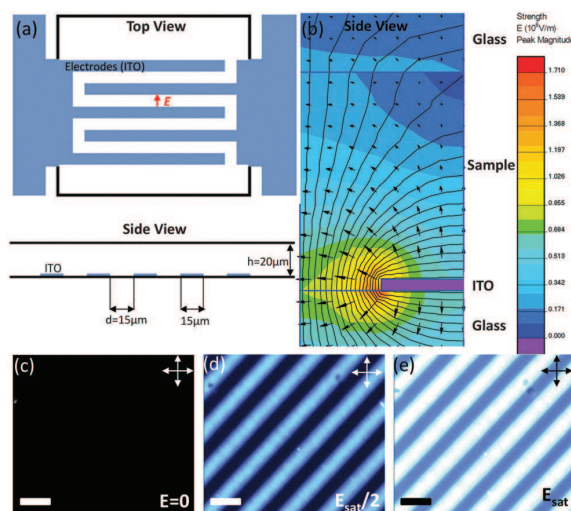


Fig. 2 (a) Schematic representation of the In-Plane Switching (IPS) cells used for probing the electro-optical effects in our colloidal dispersions. (b) Equipotential lines of the electric field ($f = 100$ kHz) simulated by finite element method inside an IPS cell containing ethylene glycol. For symmetry reason, only half an electrode is represented (side view). (c) Observation by optical microscopy between crossed polarizers of an IPS cell (top view) filled with an isotropic liquid suspension of LaPO₄ nanorods when no electric field is applied (off-state). (d) and (e) Progressive increase of the electric induced birefringence with the in-plane electric field (scale bars: 30 μm).

A schematic representation is given in Fig. 2(a). The samples are prepared by loading by capillarity the LaPO₄ nanorod suspensions in the cells, which are then sealed with UV glue (Epotecny) to prevent any evaporation of the ethylene glycol solvent.

Electric contacts between each Indium Tin Oxide (ITO) electrode and wires are made thanks to silver lacquer. Copper tape is added on the top of each contact to ensure good mechanical resistance when the cell is manipulated. The cell is then connected to a function generator (Centrad GF265) through an electric amplifier (FLC Electronics A400DI) which provides a voltage gain of a factor 20 for frequencies up to 400 kHz. When induced between two infinite parallel planes, the electric field (E) is the result of the ratio between the operating voltage (U_0) and the inter-electrode distance (d). Moreover, the electric field being the result of an a.c. sinusoidal signal, the calculation is performed taking the root mean square (rms) value of the applied voltage:

$$E = c_g \frac{U_0}{\sqrt{2} \times d} \quad (1)$$

In eqn (1), c_g is a correction factor accounting for the field attenuation in the sample due to the cell geometry. For two infinite parallel electrodes, we have $c_g = 1$. However, IPS cells are far from this well-defined geometry (Fig. 2(a)) therefore numerical simulations of the effective electric field inside the cell have been performed. The results obtained by finite element analysis using the QuickField software are shown in Fig. 2(b), providing an attenuation factor of $c_g \simeq 0.46$, which is the mean square value over the cell thickness (h) and measured at an



equidistance of two ITO electrodes. Computer simulations show also that c_g is only slightly sensitive to both the electrolyte conductivity (K_e) and to the field frequency (f). Note that c_g depends on the cell thickness, and decreasing h from 20 μm as used experimentally (Fig. 2(a)) to typically 5 μm would lead to a more homogeneous electric field giving $c_g \approx 0.86$ with, however, a lower associated optical retardation (δ). Indeed, δ is related to the induced birefringence (Δn) through the thickness of the sample by:

$$\Delta n = \frac{\delta}{h} \quad (2)$$

Experimentally, this is measured using a 0–3 λ Berek compensator (Olympus) on cells observed by polarizing microscopy (Olympus BX51) (Fig. 2(c) to (e)). In order to determine the highest electric stationary birefringence, the polarizer and analyzer are crossed at $\pm 45^\circ$ with respect to the field direction.

Synchronizing the on/off state of the applied voltage during observation with a CCD camera (JAI, CV-M7), the birefringence relaxation of the sample from a electric-field nematic steady-state back to its isotropic liquid phase (*i.e.* with no induced birefringence) has been studied. To define precisely the time at which the field is switched off, a light pulse coupled to a static relay is sent to the camera using a small LED inserted above the microscope analyzer. The transmitted intensity of the images recorded at the video rate of 25 frames per second, has been analyzed using an image processing software (ImageJ) allowing for the determination of the relaxation or switching time (τ_s) of our colloidal suspensions.

Studies of the electro-optical effects in the LaPO_4 suspensions have been also conducted in quartz capillaries of diameter $h = 1$ mm (W. Müller, Germany) by applying the electric field through their walls (10 μm thick) thanks to a home-made setup sketched in Fig. 3(a). The main advantage is to prevent electric sample degradation as electrolysis, faradaic reactions or short-circuits due to the ions in the electrolyte or to charge injection at the electrodes. In this specific setup, the capillary wall acting as a thin dielectric layer insulates the sample from the electrodes.^{19,20} The latter ones are made of two parallel aluminum planes with a disc-shaped hole of 1 mm of diameter in their center. Before being inserted in the setup, the capillary has been selected in order to precisely fit into the two holes, allowing for a good mechanical contact between the electrodes and the capillary wall limiting in particular any air layer in between them. In order to determine the field penetration inside the capillary, finite element simulations have been carried out as shown in Fig. 3(b). An estimation of the attenuation factor (c_g) has therefore been obtained as a function of the applied voltage frequency (f) and of the inter-electrode distance (d), and the details of the numerical simulations can be found in the ESI.† In particular, the correction factor, c_g , for our capillary geometry is almost 1 at high inter-electrode distances, providing a very homogeneous field for probing the electro-optical properties of LaPO_4 suspensions. However, this result depends strongly on the field frequency inside the sample, and an additional correction factor, $c_g'(f)$, accounting for the accumulation of charges at the dielectric quartz wall/electrolyte interface, has to be added to the

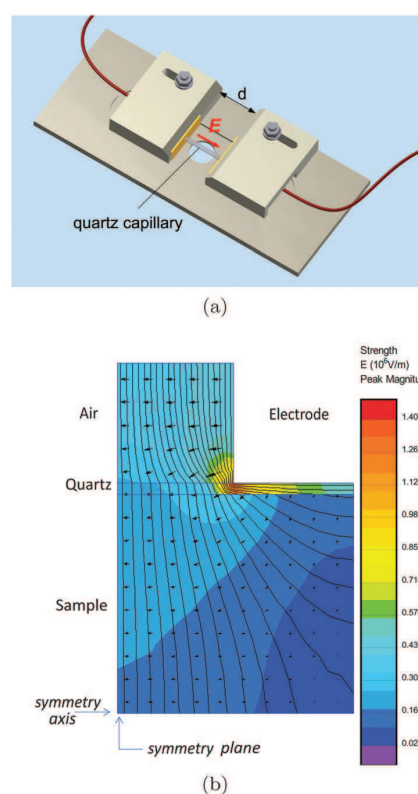


Fig. 3 (a) Schematic representation of the electro-optical setup used for the study of the nanorod suspensions in capillaries. The yellow part corresponds to the electrodes made of aluminum planes (width: 20 mm, height: 6.5 mm, and thickness: 2 mm). The quartz capillary is 1 mm in diameter and the inter-electrode distance (d) is an experimental tunable parameter. (b) Simulations of the equipotential lines associated with the electric field ($f = 100$ kHz) where only one quadrant of the setup ($d = 500$ μm) is shown for symmetry reason.

calculation of the field in eqn (1). Analytically, this factor can be approximated as:¹⁹

$$c_g'(f) \approx \frac{f}{\sqrt{f^2 + f_c^2}} \quad (3)$$

with f_c the charge relaxation frequency of the electrolyte (see next paragraph). The frequency $f = 100$ kHz at which the Kerr birefringence measurements are performed, results from a balance between both the screening of the field at low frequency due the accumulation of ions near the electrodes as well as the dielectric attenuation factor of the capillary glass wall, and the Kerr effect itself whose coupling decreases at high field frequency, as shown latter in the article. The attenuation factor is thus for this setup geometry $c_g' \approx 0.43$ at $f = 100$ kHz.

III Experimental results and discussion

A. Kerr effect and relaxation frequency

As first qualitatively reported in Fig. 2, the evolution of the field-induced birefringence as a function of the applied voltage is



displayed in Fig. 4. The measurements have been performed in IPS cells in the steady state regime and they have been shown to be fully reversible (by increasing or decreasing the applied voltage).

The induced birefringence and the effective electric field are classically related through a quadratic law, called Kerr effect. As the voltage is kept on increasing, all the nanorods get progressively their orientation driven by the field. The induced birefringence reaches a saturation, and it can then be expressed through the following equation:³

$$\Delta n = \Delta n_{\text{sat}} \left(1 - \exp \left[- \left(\frac{E}{E_{\text{sat}}} \right)^2 \right] \right) \quad (4)$$

where Δn_{sat} and E_{sat} correspond to the saturation birefringence and field, respectively. Expanding eqn (4) in the weak field range (*i.e.* $E \ll E_{\text{sat}}$) provides the well-known Kerr law:

$$\Delta n = \lambda B E^2 \quad (5)$$

where λ is the light wavelength used for observations (set to 546 nm) and B is the Kerr coefficient quantifying the coupling between Δn and E . The comparison between the expansion of eqn (4) at low field and eqn (5) leads to the expression of the Kerr coefficient when saturation is observed in the sample:

$$B = \frac{\Delta n_{\text{sat}}}{\lambda \times E_{\text{sat}}^2} \quad (6)$$

In Fig. 4 two kinds of behavior are displayed: at low frequencies (5 and 50 kHz) a saturation of the birefringence is observed (eqn (4)) while for the highest frequencies (400 kHz) no saturation is obtained for the same range of applied voltage (eqn (5)). Moreover, the voltage at which shortcircuits occur in the IPS cells increases with frequency. The decrease with the

frequency of the charge mobility in the electrolyte makes more difficult to induce a continuous path of ionic charges between the electrodes. Therefore, no measurements have been performed at frequencies lower than 5 kHz where shortcircuits occur too quickly. This frequency dependence is also observed quantitatively for a pure (*i.e.* without LaPO_4 particles) electrolyte of ethylene glycol with, as expected, a shortcircuit voltage which increases by decreasing the conductivity (see additional measurements in ESI†). It is worth mentioning that Δn_{sat} exhibits an unexpected frequency dependence (Fig. 4) considering that Δn_{sat} corresponds by definition to a perfect alignment of the rods (with an associated orientational order parameter $S_{\text{sat}} = 1$). We speculate that such anomalous behavior could be attributed to some thermal disturbance stemming from charge injection at the electrodes affecting the electric field at saturation E_{sat} .

As we shall see, the coupling of the Kerr birefringence with the electric field shown in Fig. 4 can be quantitatively accounted by a frequency dependence of the electric polarizability of our rod-like colloidal particles formulated in the extended Maxwell-Wagner framework. Specifically, the induced dipole moment associated with the rod-like colloids arises from the complex dielectric mismatch between the electrolyte and the particles. The charge relaxation time, τ , necessary for the formation of a field-induced dipole associated with the free charges (and therefore with conductivity) near the surfaces corresponds to the time for which ionic migration starts to contribute³¹ and is therefore given by the duration of the screening process in the electrolyte:^{23,32}

$$\tau_c = \frac{1}{D\kappa^2} \quad (7)$$

where D is the diffusion coefficient of the ions and κ^{-1} the Debye screening length, defined as:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{k_B T \epsilon_0 \epsilon_e}{2e^2 N_A I}} \quad (8)$$

with ϵ_0 the vacuum permittivity, ϵ_e the dielectric constant of the electrolyte ($\epsilon_e = 37$ for ethylene glycol), e the elementary charge and I the ionic strength. The corresponding cut-off frequency, f_c , is:

$$f_c = \frac{1}{2\pi\tau_c} = \frac{D}{2\pi\kappa^{-2}} \quad (9)$$

LaPO_4 nanorods are positively charged in ethylene glycol according to zeta-potential measurement ($\zeta = +97$ mV, see ESI†), thanks to the excess of La^{3+} ions close to the particle surface. When dialyzed from nitric acid solution to ethylene glycol, the ions maintaining electro-neutrality of the dispersion are therefore the counterions associated with the rod-like particles, *i.e.* NO_3^- .³⁰ The ionic diffusion coefficient can be calculated according to:

$$D = \frac{k_B T N_a \mu}{|z| F} \quad (10)$$

with k_B the Boltzmann constant, N_a the Avogadro's number, F the Faraday constant, T the temperature (set to 298 K), μ the

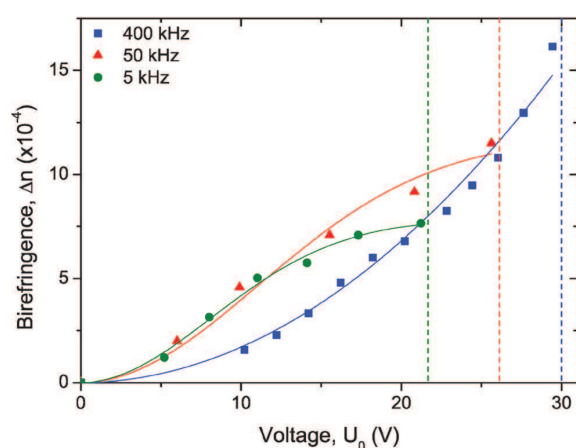


Fig. 4 Kerr induced birefringence for a sample at $\phi = 0.66\%$ close to the binodal volume fraction measured with an alternative electric field in an IPS cell at three different frequencies. The symbols represent the experimental data and the solid lines the numerical fits according to eqn (4) and (5) for data at 5, 50 and 400 kHz, respectively. The vertical dashed lines represent the voltage above which electric shortcircuits occur in the IPS cells.



mobility of the ion and z its valence. The mobility of the NO_3^- ions is expressed as:

$$\mu_{\text{NO}_3^-} = \frac{\Lambda_{\text{NO}_3^-}}{F} \quad (11)$$

with $\Lambda_{\text{NO}_3^-}$ the molar conductivity of the ion in a given electrolyte. In water the reported value $\Lambda_{\text{NO}_3^-}^{\text{water}} = 7.1 \text{ mS m}^2 \text{ mol}^{-1}$ yields $\mu_{\text{NO}_3^-}^{\text{water}} = 7.4 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Assuming a simple hydrodynamic model^{33–35} where this mobility is inversely proportional to the viscosity of the solvent, the ionic mobility can be extrapolated in ethylene glycol:

$$\mu_{\text{NO}_3^-}^{\text{EG}} = \mu_{\text{NO}_3^-}^{\text{water}} \frac{\eta_{\text{water}}}{\eta_{\text{EG}}} \quad (12)$$

with $\eta_{\text{water}} = 0.9 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$ and $\eta_{\text{EG}} = 16 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$ the viscosities of water and ethylene glycol at 298 K, respectively.³⁶

Finally, the conductivity (K_e) of the electrolyte is introduced:

$$K_e = \sum_i c_i A_i = 2I \sum_i A_i \quad (13)$$

with c_i the ionic molar concentration of the monovalent salt in solution. Assuming that NO_3^- are the main mobile ions in the electrolyte and substituting eqn (10), (11) and (8) in eqn (13) yields:

$$K_e = \varepsilon_0 \varepsilon_e D \kappa^2 \quad (14)$$

which then coincides, according to eqn (9), with the well-known formulation of the charge relaxation frequency:

$$f_c = \frac{K_e}{2\pi \varepsilon_0 \varepsilon_e} \quad (15)$$

Fig. 5 displays the operating voltage necessary to apply in order to maintain constant a given birefringence while the frequency is varied. The main difference between the two setups (Fig. 2 and 3) occurs in the low frequency regime where

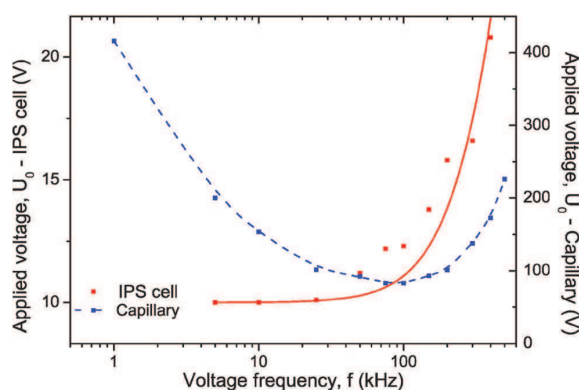


Fig. 5 Applied voltage as a function of the frequency to maintain constant the Kerr induced birefringence of $\Delta n = 3.5 \times 10^{-4}$ and of $\Delta n = 1 \times 10^{-5}$ in the geometry of an IPS cell ($h = 20 \mu\text{m}$ and $d = 15 \mu\text{m}$; red symbols) and of a cylindrical capillary ($h = 1 \text{ mm}$ and $d = 461 \mu\text{m}$; blue symbols), respectively. The sample concentration is $\Phi = 0.66\%$. The red solid line corresponds to the numerical fit using eqn (19) and the dashed blue line is a guide for the eye.

a strong screening of the field due to the quartz capillary wall is observed. A similar behavior between the two setups is however observed for high frequencies, which is attributed to Debye-type relaxation of the polarization mechanism. Therefore, in the case of externally applied electric field using quartz capillary, the Kerr coefficient determination has been done at $f = 100 \text{ kHz}$, the optimal frequency for which the coupling between the electric field inside the sample and the induced birefringence is the strongest (see ESI†).

The Maxwell–Wagner polarizability is at the origin of coupling with the electric field of the rod-like particles having a volume V_p and a conductivity K_p , and it can be expressed for the directions parallel (\parallel) or perpendicular (\perp) to the rod long axis as follows:^{17,19,37}

$$\alpha_{\parallel,\perp} = V_p \varepsilon_0 \varepsilon_e^* \frac{(\varepsilon_p^* - \varepsilon_e^*)}{\varepsilon_e^* + (\varepsilon_p^* - \varepsilon_e^*) L_{\parallel,\perp}} \quad (16)$$

where $\varepsilon_p^* = \varepsilon_p + iK_p/(\varepsilon_0 \omega)$ and $\varepsilon_e^* = \varepsilon_e + iK_e/(\varepsilon_0 \omega)$ represent the complex dielectric permittivities of the particles and the electrolyte respectively, and $L_{\parallel,\perp}$ are the depolarization factors. To show its Debye-type frequency dependence, the polarizability can be expressed as:

$$\alpha_{\parallel,\perp} = \alpha_{\parallel,\perp}^\infty + \frac{\alpha_{\parallel,\perp}^0 - \alpha_{\parallel,\perp}^\infty}{1 + \omega^2 \tau_{\parallel,\perp}^2} \quad (17)$$

with $\alpha_{\parallel,\perp}^0$ and $\alpha_{\parallel,\perp}^\infty$ the low and the high frequency electric polarizabilities respectively, ω the angular frequency of the applied sinusoidal electric field ($\omega = 2\pi f$) and $\tau_{\parallel,\perp}$ the Maxwell–Wagner relaxation time given by:^{17,23}

$$\tau_{\parallel,\perp} = \varepsilon_0 \frac{\varepsilon_e + (\varepsilon_p - \varepsilon_e) L_{\parallel,\perp}}{K_e + (K_p - K_e) L_{\parallel,\perp}} \quad (18)$$

The depolarization factors L_{\parallel} and L_{\perp} are related through $L_{\perp} = (1 - L_{\parallel})/2$ and have been calculated explicitly in the case of prolate spheroids.²³ In the needle-like limit ($L \gg D$), the depolarization factors can be strongly simplified and approximated as $L_{\parallel} \approx 0$ and $L_{\perp} \approx \frac{1}{2}$. In case of slender rod-like particle when only polarization along the rod is considered, eqn (18) is reduced to $\tau_{\text{MW}} \approx \tau_{\parallel} \approx \varepsilon_0 \varepsilon_e / K_e$ which corresponds in this limit to the charge relaxation time τ_c according to eqn (9) and (15). Thus, when rod-like particles are long enough (which means $L/D > K_p/K_e$), a single frequency, corresponding to the charge relaxation frequency f_c , accounts for the frequency behavior of needle-like nanoparticle dispersions.

Assuming such kind of Debye-type frequency dependence and because the polarizability of the particles is proportional to the Kerr coefficient B , eqn (5) provides then the frequency dependence of the applied voltage (U_0):

$$U_0 \propto \sqrt{1 + (f/f_c)^2} \quad (19)$$

The experimental data (red symbols in Fig. 5) obtained in the IPS cell have been numerically fitted (red solid line) according to eqn (19) to get the charge relaxation frequency of the system:

$$f_c \simeq 210 \text{ kHz} \quad (20)$$



Replacing f_c in eqn (9) provides the Debye screening length in our nanorod suspension, $\kappa^{-1} = 9$ nm. The ionic strength I can then be directly deduced from eqn (8), which gives $I = 0.5$ mM in very good agreement with the value obtained from the phase diagram of LaPO_4 nanorod suspensions reported previously.³⁰ According to eqn (14), the conductivity of the electrolyte can be also extracted: $K_e = 4.3 \times 10^{-4}$ S m^{-1} at $I = 0.5$ mM. This value is in very good agreement with the single point measurement of the conductivity performed at a rod volume fraction of $\phi = 0.6\%$, and which gives 5.4×10^{-4} S m^{-1} .

B. Determination of the Kerr coefficient and comparison with Maxwell–Wagner–O’Konski theory

A general expression of the Kerr coefficient has been derived by Saville *et al.*,³⁷ and B can be written as a function of the anisotropy of excess polarizability, $\Delta\alpha = \alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp}$:

$$B = \Delta n^p \frac{\Delta\alpha}{15\lambda k_B T} \frac{\phi}{1 - \phi/\phi_B} \quad (21)$$

where Δn^p is the extrapolated saturated birefringence at $\phi = 1$, which has been estimated to be $\Delta n^p \approx 0.1$ in a previous work.³⁰

Note that the volume fraction dependence in $\frac{\phi}{1 - \phi/\phi_B}$ where ϕ_B is the binodal volume fraction at the isotropic-to-nematic phase transition, is accounted through an Onsager-like approach,^{17,19,38} and leads to a linear dependence with the rod concentration for very dilute suspensions. Fig. 6 displays the evolution of the Kerr coefficient as a function of ϕ and plotted for three different frequencies (see ESI† for the data of the induced birefringence from which the Kerr coefficients have been obtained). Let’s define the ϕ -independent specific Kerr coefficient B_0 as:

$$B_0 = \lim_{\phi \rightarrow 0} B(\phi) \quad (22)$$

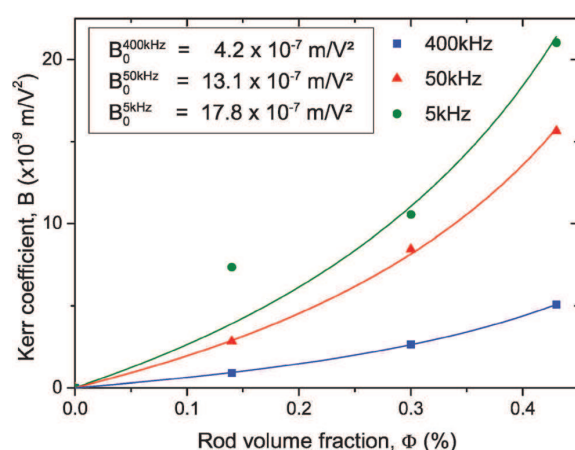


Fig. 6 Dependence of the Kerr coefficient B with the LaPO_4 rod volume fraction obtained at different frequencies. The effective electric field has been used to account for the attenuation due to the IPS cell geometry. The symbols correspond to the experimental data and the solid lines are their corresponding numerical fits (proportional to $\phi/(1 - \phi/\phi_B)$) from which the ϕ -independent specific Kerr coefficient B_0 has been extracted.

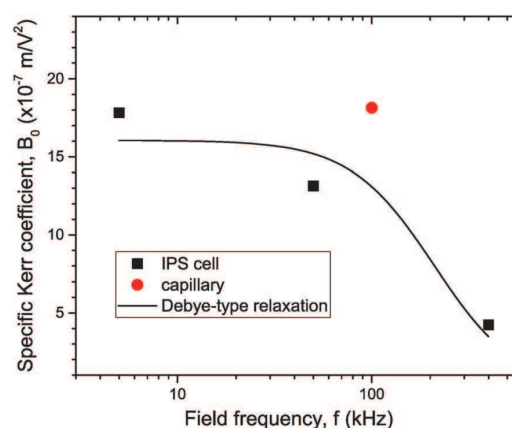


Fig. 7 Specific Kerr coefficient B_0 at different frequencies obtained in the geometry of directly applied (IPS cell; black squares) or externally applied (quartz capillary; red dot) electric field. In both cases, the effective electric field inside the sample has been calculated to account for its attenuation by the setup. The solid line is a numerical fit corresponding to a Debye-type relaxation (eqn (17)) with $f_c = 210$ kHz.

The experimental values of B_0 at the three studied frequencies can be found for the IPS cell in the inset of Fig. 6 and in Fig. 7. Similarly, the specific Kerr coefficient has been determined at $f = 100$ kHz for externally applied electric field through a capillary wall (see ESI†) and is reported in Fig. 7. The latter value is in good agreement with the ones obtained in the IPS cells for the same range of frequency (Fig. 6) and after correction of the electric field attenuation in both setup geometries. According to eqn (21), comparison between experimental and theoretically predicted Kerr coefficients is done by the determination of the excess polarizability $\Delta\alpha$. The Debye-type frequency dependence of the polarizability (eqn (17)) applied for slender rods ($L \gg D$ for which $L_{\parallel} \approx 0$ and $L_{\perp} \approx \frac{1}{2}$) leads to the following anisotropy of polarizability in the low ($\Delta\alpha^0$) and high ($\Delta\alpha^{\infty}$) frequency limit, respectively:

$$\Delta\alpha^0 = V_p \varepsilon_0 \frac{\varepsilon_e}{K_e} \left(\frac{K_p - K_e}{K_p + K_e} \right)^2 \quad (23)$$

$$\Delta\alpha^{\infty} = V_p \varepsilon_0 \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_e)^2}{\varepsilon_p + \varepsilon_e} \quad (24)$$

The latter one in eqn (24) corresponds to the polarization mechanism due to dielectric contrast between the particles and the surrounding medium. Assuming a typical particle dielectric constant of $\varepsilon_p \approx 3$ providing almost the highest dielectric mismatch possible for this system, this yields $\Delta\alpha^{\infty}/k_B T \approx 2 \times 10^{-12}$ $\text{m}^2 \text{V}^{-2}$ and therefore $B_0^{\infty} = 2 \times 10^{-8}$ $\text{m} \text{V}^{-2}$ according to eqn (21), which is more than one order of magnitude smaller than the experimental value at the highest frequency of 400 kHz (Fig. 6 and 7). In a similar way but in the opposite limit of frequency, the contrast of the two conductivities K_p and K_e represents the low frequency limit of the Maxwell–Wagner contribution. The conductivity K_p of the particles has been



reported for similar lanthanide phosphate nanorods exhibiting the same morphology: $K_p = 6 \times 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$.³⁹ Using $K_e = 4.3 \times 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$ determined in the previous section, eqn (23) leads then to $\Delta\alpha^0/k_B T \approx 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ V}^{-2}$ and therefore $B_0^0 = 10^{-9} \text{ m V}^{-2} \ll B_0^{\text{exp}} \approx 10^{-6} \text{ m V}^{-2}$ as reported in Fig. 6 and 7. Neither the dielectric contrast nor the contrast of conductivities are able to account for the polarizability excess observed experimentally. However, in the case of charged particles, a third polarization mechanism has to be considered, as first introduced by O’Konski who has shown the importance of the electrical double layer polarization.²⁴ This results in a strongly enhanced effective conductivity (K_p^{eff}) at the electrolyte/particle interface that has to be substituted in the Maxwell–Wagner formalism (eqn (16), (17) and (18)):

$$K_{p,\parallel,\perp}^{\text{eff}} = K_p + 2K^\sigma/a_{\parallel,\perp} \quad (25)$$

where K^σ represents the surface contribution to the conductivity and $a_{\parallel,\perp}$ is an effective length depending on the geometric factors of the particle.²³ Taking advantage from the high aspect ratio of the LaPO_4 rods ($L \gg D$), only the polarization along the rod long axis is considered, neglecting then the normal polarization. In these conditions, the effective conductivity can be expressed as $K_p^{\text{eff}} = K_p + 2K^\sigma/R$ where $a_{\parallel} \equiv R = D/2$ is the radius of the LaPO_4 particle. Assuming that the surface conductivity can be approximated by:^{17,19}

$$K^\sigma \approx \mu_{\text{NO}_3}^{\text{EG}} q^{\text{EG}} \quad (26)$$

with q^{EG} the surface charge density of the LaPO_4 rod in ethylene glycol related to the zeta-potential ζ for monovalent electrolyte through:³⁷

$$q^{\text{EG}} = 2 \frac{\epsilon_0 \epsilon_e \kappa k_B T}{e} \sinh\left(\frac{e\zeta}{2k_B T}\right) \quad (27)$$

this gives $q^{\text{EG}} = 6 \times 10^{-3} \text{ C m}^{-2}$ with $\zeta = +97 \text{ mV}$, and therefore a surface conductivity $K^\sigma = 2.5 \times 10^{-11} \text{ S}$. Since $K_p \ll K^\sigma/R$, the equivalent conductivity contrast related to the so-called Dukhin number,²³ gives $K_p^{\text{eff}}/K_e \approx 2/R \times K^\sigma/K_e \approx 21$. According to the extended Maxwell–Wagner–O’Konski (MWO) theory where the conductivity is replaced in eqn (23) by the effective conductivity K_p^{eff} ,^{19,23,37} the associated excess polarizability can be written as:

$$\Delta\alpha^{\text{MWO}} \approx \alpha_{\parallel}^{\text{MWO}} \approx V_p \epsilon_0 \epsilon_e \frac{K_p^{\text{eff}}}{K_e} \quad (28)$$

This provides $\Delta\alpha^{\text{MWO}}/k_B T \approx 3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ V}^{-2}$ and therefore $B_0^{\text{MWO}} = 4 \times 10^{-7} \text{ m V}^{-2}$ according to eqn (21). This value is very consistent with the specific Kerr coefficients reported experimentally in Fig. 7, especially by considering the approximations we performed. Furthermore, this demonstrates that the polarization of the electric double layer is the prevailing mechanism for the coupling with the electric field of our LaPO_4 colloidal rods dispersed in ethylene glycol.

The corresponding cut-off frequency $f_{\parallel,\perp}^{\text{MWO}}$ is related to the relaxation time $\tau_{\parallel,\perp}$ (eqn (16)) which has to be written within the extended Maxwell–Wagner–O’Konski model.^{17,23} In case of slender rod-like particles when only polarization along the rods is considered and which satisfy $L/D > K_p^{\text{eff}}/K_e \gg 1$, eqn (18) is

simplified into $f^{\text{MWO}} \approx f_{\parallel}^{\text{MWO}} \approx f_{\parallel}^{\text{MW}} \approx K_e/(2\pi\epsilon_0\epsilon_e) \equiv f_c$, which corresponds again to the charge relaxation frequency f_c reported in eqn (15). Therefore a numerical fit assuming a Debye-type relaxation (eqn (17)) with $f_c = 210 \text{ kHz}$ has been performed as reported in Fig. 7, showing that polarization of the particle ionic cloud does not only account for the right amplitude of the Kerr effect coefficients, but also accounts very well for their frequency dependence.

C. Switching time (on/off states)

Beyond the coupling with the electric field, investigations on the time response of the LaPO_4 colloidal rod suspensions have been performed, as displayed in Fig. 8. For a frequency of 5 kHz, the induced birefringence is brought to saturation (Δn_{sat} , see Fig. 4) in a steady-state regime. The applied voltage is then quickly switched off (setting the origin of time in Fig. 8) and the relaxation into the isotropic liquid state (*i.e.* with no birefringence) occurs in two steps. First, a fast decay of the transmitted light intensity takes place when the particles lose their orientation; second, a slight increase of the birefringence is observed, as already reported in other self-organized systems.¹³ We interpret the latter behavior as a reminiscent planar anchoring of the particles on the glass substrates, which leads then to a residual nematic-like order close to the interface.

From the numerical fit using a stretched-exponential form of the type:⁴⁰

$$\Delta n = \Delta n_{\text{sat}} \exp(-(t/\tau_s)^\gamma), \quad 0 \leq \gamma \leq 1 \quad (29)$$

the time response of the suspensions has been extracted giving $\tau_s = 129 \text{ ms}$ (with $\gamma \approx 0.8$) as shown in Fig. 8. The rod polydispersity leads to a distribution of relaxation times implying the expression used in eqn (29), reducing to $\gamma = 1$ in the simplest

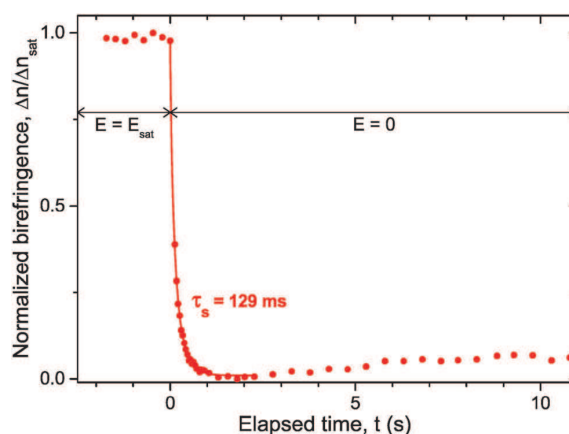


Fig. 8 Switching time associated with the relaxation of the Kerr induced birefringence when the electric field is turned off. Experiment performed in an IPS cell at $f = 5 \text{ kHz}$ for a sample having a rod volume fraction of $\phi = 0.66\%$. The red solid line represents the numerical fit using a stretched-exponential decay (eqn (29)) and the corresponding time scale is provided.



case of monodisperse particles. The switching time τ_s found in our system is too slow for a use of these colloidal suspensions in displays but is fast enough to consider potential application in devices such as smart windows or lenses. Note that the relaxation of the Kerr birefringence back to the isotropic liquid state stems from the thermal diffusion randomizing the particle orientation initially driven by the electric field. Therefore, the rotational diffusion coefficient (D_r) can be extracted from the time response τ_s via $\tau_s = 1/6D_r$.^{41,42} As the rod volume fraction used in the experiment ($\phi = 0.66\%$) is close to the binodal value and corresponds to the semi-dilute regime where the motion of each rod is hindered by its neighbors, this results in a decrease of the rotational diffusion compared to free rods, and D_r has then the following form:⁴³

$$D_r = \beta k_B T \frac{\ln(L/d)}{\eta_{EG} L^9 (\phi/\nu_p)^2} \quad (30)$$

where β is a proportionality constant. Eqn (30) yields an associated time of about 100 ms with $\beta \simeq 0.5$ consistent with the response time τ_s obtained experimentally (Fig. 8).

IV Conclusions

In this paper, we present a study of the Kerr induced birefringence in concentrated isotropic liquid suspensions of LaPO₄ nanorods in ethylene glycol. The response of the system was probed both in an In-Plane Switching cells in which the electrodes are in direct contact with the sample, and also in the geometry of externally applied field. In the latter case, the electric field is applied through and parallel to a capillary quartz wall, limiting its attenuation and avoiding electric damage such as charge injection at the electrodes. A quantitative analysis using the Maxwell–Wagner–O’Konski theory shows that the Kerr birefringence is mainly the result of the polarization of the electric double layer of the rod-like particles. The typical value of the specific (*i.e.* $\phi \rightarrow 0$) Kerr coefficient obtained in our system is of about $B_0 \sim 10^{-6} \text{ m V}^{-2}$ which is several orders of magnitude higher than usual thermotropic compounds⁴ including liquid-crystalline blue phases.^{3,6,8} Moreover, the coupling with the electric field is also very similar to other aqueous systems of rod-like or plate-like particles^{19,22,41} showing therefore that ethylene glycol as electrolyte combined with well-defined anisometric nanoparticles represent a promising way for their use in electro-optical devices.

Author contributions

EG designed research; AC performed the experiments and collected the data; PM and EG designed the experimental setups; PM performed the numerical simulations; the LPMC group (JWK, KL, JPB, TG) synthesized the samples; EG and AC interpreted the experiments and wrote the paper. All the authors discussed the manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank J. Giermanska for her help in the zeta-potential measurement, Essilor Int. for preliminary discussion, and I. Dozov for fruitful comments.

References

- 1 W. den Boer, *Active Matrix Liquid Crystal Displays*, Elsevier Science and Technology Books, 2005.
- 2 P. Kirsch and M. Bremer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 4216.
- 3 J. Yan, H.-C. Cheng, S. Gauza, Y. Li, M. Jiao, L. Rao and S.-T. Wu, *Appl. Phys. Lett.*, 2010, **96**, 071105.
- 4 A. Ghanadzadeh Gilani and M. S. Beevers, *J. Mol. Liq.*, 2001, **92**, 217.
- 5 K. V. Le, S. Aya, Y. Sasaki, H. Choi, F. Araoka, K. Ema, J. Mieczkowski, A. Jakli, K. Ishikawa and H. Takezoe, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 2855.
- 6 G. Nordendorf, A. Lorenz, A. Hoischen, J. Schmidtke, H. S. Kitzerow, D. Wilkes and M. Wittek, *J. Appl. Phys.*, 2013, **114**, 173104.
- 7 J. Yan, L. Rao, M. Jiao, Y. Li, H.-C. Cheng and S.-T. Wu, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 7870.
- 8 Y. Hisakado, H. Kikuchi, T. Nagamura and T. Kajiyama, *Adv. Mater.*, 2005, **17**, 96.
- 9 G. Nordendorf, A. Hoischen, J. Schmidtke, D. Wilkes and H. S. Kitzerow, *Polym. Adv. Technol.*, 2014, **25**, 1195.
- 10 A. B. G. M. Leferink op Reininka, E. van den Pol, A. V. Petukhov, G. J. Vroege and H. N. W. Lekkerkerker, *Eur. Phys. J.: Spec. Top.*, 2013, **222**, 3053.
- 11 J. K. G. Dhont and K. Kang, *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.*, 2010, **33**, 51.
- 12 J. K. G. Dhont and K. Kang, *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.*, 2011, **34**, 40.
- 13 A. Eremin, R. Stannarius, S. Klein, J. Heuer and R. M. Richardson, *Adv. Funct. Mater.*, 2011, **21**, 556.
- 14 K. May, R. Stannarius, S. Klein and A. Eremin, *Langmuir*, 2014, **30**, 7070.
- 15 A. Kuijk, T. Troppenz, L. Fillion, A. Imhof, R. van Roij, M. Dijkstra and A. van Blaaderen, *Soft Matter*, 2014, **10**, 6249.
- 16 B. Liu, T. H. Besseling, M. Hermes, A. F. Demirörs, A. Imhof and A. van Blaaderen, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 3092.
- 17 T.-Z. Shen, S.-H. Hong and J.-K. Song, *Nat. Mater.*, 2014, **13**, 394.
- 18 S.-H. Hong, T.-Z. Shen and J.-K. Song, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 26304.
- 19 I. Dozov, E. Paineau, P. Davidson, K. Antonova, C. Baravian, I. Bihannic and L. J. Michot, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 7751.
- 20 K. Antonova, I. Dozov, P. Davidson, E. Paineau, C. Baravian, I. Bihannic and L. J. Michot, *Bulg. J. Phys.*, 2012, **39**, 72–91.
- 21 E. Paineau, I. Dozov, A.-M. Philippe, I. Bihannic, F. Meneau, C. Baravian, L. J. Michot and P. Davidson, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 13516.



- 22 T. Bellini, F. Mantegazza, V. Degiorgio, R. Avallone and D. A. Saville, *Phys. Rev. Lett.*, 1999, **82**, 5160.
- 23 V. N. Shilov, Yu. B. Borkovskaja and S. N. Budankova, in *Molecular and Colloidal Electro-optics*, ed. S. P. Stoylov and M. V. Stoimenova, Surfactant Science Series, vol. 133, Taylor & Francis, 2006.
- 24 C. T. O'Konski, *J. Phys. Chem.*, 1960, **64**, 605.
- 25 M. Leunissen, *Manipulating Colloids with Charges and Electric Fields*, PhD thesis, University of Utrecht, 2007.
- 26 F. Mantegazza, T. Bellini, M. Buscaglia, V. Degiorgio and D. A. Saville, *J. Chem. Phys.*, 2000, **113**, 6984.
- 27 T. Bellini, V. Degiorgio and F. Mantegazza, *Colloids Surf., A*, 1998, **140**, 103.
- 28 V. Degiorgio, T. Bellini and F. Mantegazza, *Colloids Surf., A*, 2001, **183–185**, 183.
- 29 O. D. Velev and K. H. Bhatt, *Soft Matter*, 2006, **2**, 738.
- 30 J. Kim, A. de la Cotte, R. Deloncle, S. Archambeau, C. Biver, J.-P. Cano, K. Lahlil, J.-P. Boilot, E. Grelet and T. Gacoin, *Adv. Funct. Mater.*, 2012, **22**, 4949.
- 31 V. N. Shilov, A. V. Delgado, F. Gonzalez-Caballero, J. Horno, J. J. Lopez-Garcia and C. Grosse, *J. Colloid Interface Sci.*, 2000, **232**, 141.
- 32 W. B. Russel, D. A. Saville and W. R. Schowalter, *Colloidal Dispersions*, Cambridge University Press, 1989, Ch. 7.
- 33 A. Voronel, E. Veliyulin and V. Sh. Machavariani, *Phys. Rev. Lett.*, 1998, **80**, 2630.
- 34 S. Koneshan, J. S. Rasaiah, R. M. Lynden-Bell and S. H. Lee, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 4193.
- 35 S. Koneshan, R. M. Lynden-Bell and J. C. Rasaiah, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 12041.
- 36 D. S. Viswanath, T. Ghosh, D. H. L. Prasad, N. V. K. Dutt and K. Y. Rani, *Viscosity of Liquids: Theory, Estimation, Experiment and Data*, Springer, 2007.
- 37 D. A. Saville, T. Bellini, V. Degiorgio and F. Mantegazza, *J. Chem. Phys.*, 2000, **113**, 6974.
- 38 D. van der Beek, A. V. Petukhov, P. Davidson, J. Ferré, J. P. Jamet, H. H. Wensink, G. J. Vroege, W. Bras and H. N. W. Lekkerkerker, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2006, **73**, 041402.
- 39 H. Wang, G. Li, X. Guan and L. Li, *J. Alloys Compd.*, 2011, **509**, 4160.
- 40 V. Degiorgio, T. Bellini, R. Piazza, F. Mantegazza and R. E. Goldstein, *Phys. Rev. Lett.*, 1990, **64**, 1043.
- 41 M. L. Jimenez, L. Fornasari, F. Mantegazza, M. C. D. Mourad and T. Bellini, *Langmuir*, 2012, **28**, 251.
- 42 V. Peikov, R. Sasai, M. Tanigawa, I. Petkanchin and K. Yamaoka, *J. Colloid Interface Sci.*, 2006, **295**, 445.
- 43 R. Pecora, *Dynamic Light Scattering. Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, Plenum, New York, 1985.



Electronic Supplementary Material (ESI) for Soft Matter.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Electronic Supplementary Information for

**“Electric field induced birefringence in non-aqueous dispersions of
mineral nanorods”**

Alexis de la Cotte,¹ Pascal Merzeau,¹ Jong Wook Kim,² Khalid
Lahlil,² Jean-Pierre Boilot,² Thierry Gacoin,² and Eric Grelet^{1,*}

¹*Centre de Recherche Paul-Pascal, CNRS - Université de Bordeaux,
115 Avenue Schweitzer, 33600 Pessac, France*

²*Laboratoire de Physique de la Matière Condensée,
CNRS - Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France*

(Dated: July 6, 2015)

* grelet@crpp-bordeaux.cnrs.fr

I. MEASUREMENTS OF THE KERR COEFFICIENTS AT DIFFERENT VOLUME FRACTIONS AND ELECTRIC FIELD FREQUENCIES

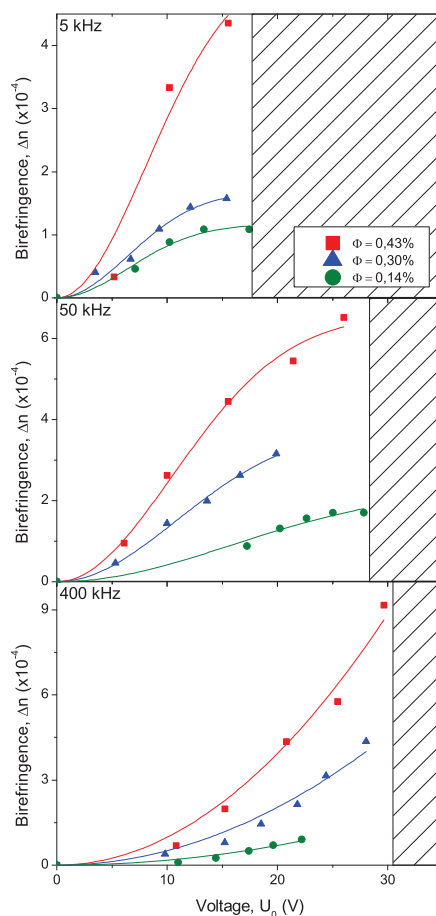


FIG. S1. Kerr induced birefringence in IPS cells for three volume fractions of 0.43%, 0.30% and 0.14% corresponding to square, triangle and circle symbols, respectively. An a.c. sinusoidal electric field was applied at three different voltage frequencies (5, 50 and 400 kHz). The dashed areas correspond to the range of electric fields above which electric damage of the sample occurs in the IPS cells.

Figure S1 shows the evolution of the Kerr induced birefringence for different conditions of volume fraction (0.43%, 0.30% and 0.14%) and voltage frequencies (5, 50 and 400 kHz). The lines corresponds to numerical fits using Eqs. 4 and 5 from which the Kerr coefficients displayed in Figure 6 of the paper are extracted.

II. ATTENUATION OF THE ELECTRIC FIELD IN THE CAPILLARY SETUP OBTAINED BY NUMERICAL SIMULATIONS

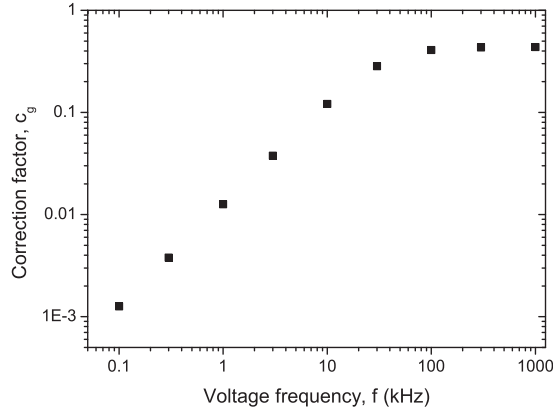


FIG. S2. Evolution of the correction factor c_g with the voltage frequency (f) obtained from finite element simulations in the geometry of externally applied filed through a quartz capillary. The inter-electrode distance (d) is fixed at $500 \mu\text{m}$ and the electrolyte conductivity $K_e = 4 \times 10^{-4} \text{ S/m}$.

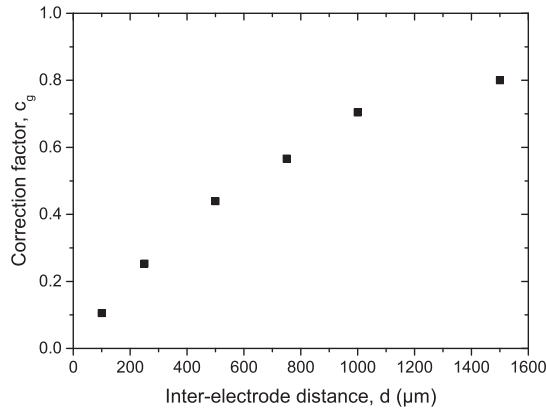


FIG. S3. Correction factor c_g as a function of the inter-electrode distance (d) obtained from numerical simulations in the geometry of externally applied filed through a quartz capillary. The voltage frequency (f) is fixed at 100 kHz and the electrolyte conductivity $K_e = 4 \times 10^{-4} \text{ S/m}$.

The correction factor c_g (Eq. 1) in the capillary geometry is dependent on both the inter-electrode distance (d) and voltage frequency (f) due to the presence of an insulating quartz wall between the electrode and the sample. To quantify this attenuation, the electric

field has been simulated by finite element analysis (QuickField software, Student Edition) for different parameters d and f and the results are presented in Figs. S2 and S3. Due to a limited number of meshes in this free edition, the numerical simulations of the thin quartz wall ($e_{\text{quartz}} = 10 \mu\text{m}$) were carried out, replacing it by an equivalent material of larger thickness and effective dielectric constant and keeping unchanged their ratio ($e_{\text{eff}}/\varepsilon_{\text{eff}} = e_{\text{quartz}}/\varepsilon_{\text{quartz}} = \text{constant}$). At low frequencies, capacitive impedances are prevailing and the correction factor c_g increases with f while at high frequencies, the predominance of resistive impedances makes its behavior asymptotic (Fig. S2). In the same way, at short distances c_g increases with d until an asymptotic behavior is reached for high enough inter-electrode distances (Fig. S3) for which c_g tends to 1. Such a behavior obtained by simulations is in qualitative agreement with the experimental data shown in Fig. S4.

III. KERR COEFFICIENT MEASUREMENTS IN THE GEOMETRY OF EXTERNALLY APPLIED ELECTRIC FIELD (QUARTZ CAPILLARY)

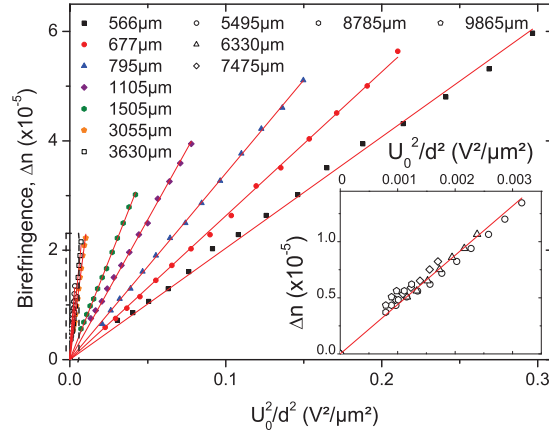


FIG. S4. Kerr induced birefringence as a function of the applied voltage ($f = 100 \text{ kHz}$) for varying inter-electrode distance d in the geometry of quartz capillary and for $\Phi=0.66\%$. The inset corresponds to a zoom of the area (dashed box) where the slopes overlap, corresponding to an homogeneous electric field with no attenuation ($c_g = 1$). The symbols represent the experimental data and the solid lines the numerical linear fits.

In order to determine the Kerr coefficient in the capillary setup, several sets of measure-

ments have been performed at different inter-electrode distances. Thanks to the diameter of the cylindrical capillary (1 mm) the optical retardation increases accordingly (Eq. 2) allowing for a field induced birefringence measurement up to large inter-electrode distances (of about 10 mm). Note that all birefringence values have been corrected from an offset coming from some residual birefringence attributed to some mechanical stress on the capillary glass wall. Figure S4 shows the evolution of the measured birefringence with the square of the applied voltage for the different distances and the corresponding linear fits. This dependence demonstrates that the response of the system is in the weak field regime ($E \ll E_{sat}$) according to Eq. 5.

The presence of a progressive increase followed by an overlap of the slopes (for $d \geq 5$ mm) is in qualitative agreement with the numerical simulations in Figure S3 showing the attenuation of the electric field vanishes at high enough inter-electrode distance d . Therefore, for the largest distances where the field is homogeneous ($c_g = 1$) and for which $E = U/d$ applies (inset of Figure S4), the value of the Kerr coefficient can be extracted for our system in this specific cell and is reported in Fig. 7.

IV. ZETA-POTENTIAL MEASUREMENTS

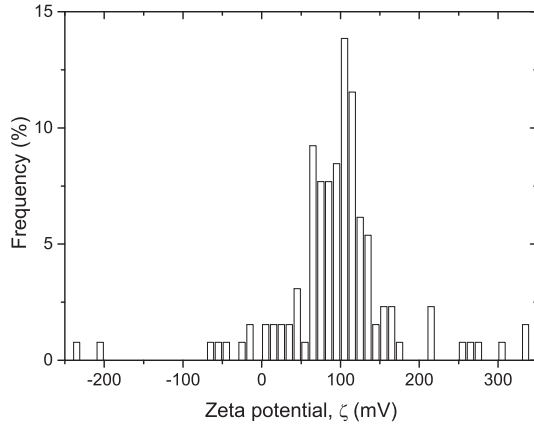


FIG. S5. Zeta-potential (ζ) measurements on a population of 130 particles performed under a steady-state electric field (14.6 V/cm) in the dilute state.

Zeta-potential (ζ) measurements were made using a particle electrophoresis instrument (Zeta Compact, CAD Instruments) and are presented in Figure S5. The velocity and di-

rection of the rods are measured by recording their movement under a steady-state electric field (14.6 V/cm) in a dilute suspension thus providing their mobility. The zeta-potential is then deduced using Smoluckowski equation beyond its range of strict validity corresponding to $\kappa R \gg 1$. The ζ value is the mean for all the particles in the field of view, and has been averaged over several measurements to provide $\zeta = +97$ mV.

V. SHORTCIRCUIT VOLTAGE IN THE IPS CELLS

The voltage at which shortcircuits occur in the IPS cell has been measured for the three studied frequencies (5, 50 and 400 kHz) in ethylene glycol electrolyte with and without LaPO_4 nanorods. Three sets of measurements were performed: pure ethylene glycol, ethylene glycol whose conductivity has been adjusted by adding CsNO_3 salt to match the conductivity of our LaPO_4 suspensions ($K_e \simeq 5 \times 10^{-4} \text{ S/m}$), and LaPO_4 suspensions. Results are shown in Table S1.

TABLE S1. Voltage at which shortcircuit occur in the IPS cell (U_{sc}) at the three frequencies (5, 50 and 400 kHz), for pure ethylene glycol, for ethylene glycol with added salt of CsNO_3 , and for LaPO_4 suspensions.

Frequency (kHz)	$U_{sc}(V)$		
	Pure ethylene glycol	Ethylene glycol with CsNO_3 salt	LaPO_4 suspensions.
5	58.0	31.5	21.5
50	76.0	40.5	26
400	89.0	51.0	30

These experiments confirm therefore that shortcircuits do not directly depend on the dispersed nanoparticles, but mainly stem from the electrolyte itself (and more specifically from its ionic conductivity).

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse porte sur l'étude de manière générale de systèmes cristal-liquides colloïdaux, et plus particulièrement sur leur fonctionnalisation et leurs propriétés d'auto-assemblage.

Le premier système étudié est celui du virus fd-wt et de ses mutants, un bactériophage filamenteux dont le diagramme de phase a fait l'objet de plusieurs études durant les dernières décennies. De nombreux travaux ont prouvé son caractère modèle dans le domaine de la matière molle puisqu'il satisfait les prédictions données par plusieurs théories et simulations numériques portant sur l'auto-organisation en mésophases cristal-liquides.

Ce système se classant dans la catégorie des lyotropes, son diagramme de phase s'établit en fonction des variations de concentration (ou de fraction volumique) et ses limites sont donc dépendantes des caractéristiques physiques des particules et plus particulièrement, comme c'est le cas dans le cadre de la théorie d'Onsager par exemple, de leur rapport d'aspect (D/L). Les variations de diamètre effectif (D_{eff}), amenées de manière électrostatique par les variations de force ionique (et donc de longueur d'écran de Debye) ou bien de manière stérique par le greffage de polymères, permettent alors d'influer sur les transitions de phases cristal-liquides.

Nous nous sommes intéressés à une variation dynamique de D_{eff} , qu'il est possible de générer en fonctionnalisant la surface de la particule par un polymère thermosensible qui présente un changement de conformation au-delà d'une température critique. Pour des homo-polymères, il est cependant uniquement possible d'aboutir à une transition sol-gel due à l'apparition d'interactions hydrophobes entre les virus. Pour contourner cette difficulté, il est alors nécessaire d'utiliser des di-blocs construits de telle manière que l'un des deux blocs conserve son caractère hydrophile et maintient la stabilité colloïdale des phages. En s'intéressant aux élastines, nous avons alors pu montrer la possibilité d'induire de manière dynamique une transition de phase entre le liquide isotrope et le nématique avec la température dans le système du virus, un système lyotrope.

Bien que le développement de ce système reste à poursuivre (en construisant d'autres di-blocs ou en fonctionnalisant d'autres mutants du virus), cette première preuve de principe ouvre des perspectives intéressantes sur l'étude d'un système dont l'auto-organisation s'établit en fonction de deux paramètres, concentration et température, et qui se trouve donc à la frontière entre les deux grandes classes de cristaux-liquides : les lyotropes et les thermotropes. La première étape consiste bien entendu par l'établissement d'un diagramme de phase complet avant de s'intéresser à l'influence des variations dynamiques de diamètre effectif sur chaque transition de phase cristal-liquide. Une étude intéressante serait également de savoir si la phase nématique s'avère être en réalité une

phase cholestérique comme cela a pu être observé dans d'autres systèmes de virus fonctionnalisés par des polymères. Si tel est le cas, il serait alors intéressant de constater, ou non, une éventuelle influence de la variation dynamique de D_{eff} sur le pas cholestérique.

Dans un second temps, le caractère biologique du virus fd permet par des techniques de *phage display* l'expression de séquences polypeptidiques sur la protéine p3, située à l'extrémité de la particule. Une fois sélectionnées, certaines séquences ouvrent alors la voie à une fonctionnalisation régio-spécifique. C'est le cas du M13-C7C pour lequel l'expression de deux cystéines offre alors cette possibilité, grâce à la chimie spécifique du thiol.

En nous intéressant à l'ajout de chromophores à l'extrémité du phage, nous avons alors pu constater ce caractère régio-spécifique tout particulièrement dans la phase smectique. Par des techniques relativement simples de microscopie de fluorescence, il est alors possible de mettre en lumière différents défauts de l'organisation lamellaire. Ces travaux seraient intéressants à poursuivre afin de tirer un maximum de bénéfices de la résolution apportée par la microscopie confocale. Cependant, un grand intérêt de ce système est le caractère hydrophobe des chromophores qui crée alors un *patch* uniquement à une extrémité de la particule. Nous avons alors pu constater son influence, qui induit des interactions localisées attractives entre les virus, sur l'auto-organisation du système. De tels systèmes génèrent un intérêt de plus en plus grand dans le domaine de la matière condensée dû principalement à la possibilité de créer des auto-assemblages dirigés. L'une des perspectives de ces travaux est d'essayer d'obtenir un plus grand contrôle sur l'effet *patchy*, en faisant, dans un premier temps, varier le nombre de chromophores greffés par particules (en baissant l'excès utilisé lors de la réaction chimique). Un tel contrôle peut également être obtenu en greffant un polymère tel que le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) dont le caractère hydrophobe est modulable avec la température. Afin d'élargir les perspectives du système, il est également possible d'imaginer créer un mutant permettant de greffer un second *patch* à l'autre extrémité du virus, et de comparer les structures obtenues avec les simulations numériques réalisées dans la littérature [1].

Comme nous l'avons montré, de tels auto-assemblages de virus sont également réalisables en exploitant des interactions spécifiques entre molécules et ligands. L'exemple du greffage régio-spécifique de la biotine sur le phage qui se complexe ensuite avec de la neutravidine libre en solution permet notamment d'obtenir un large panel de structures. Il reste cependant nécessaire de réaliser un travail sur l'étape de fonctionnalisation afin qu'elle ne soit pas excessive pour s'affranchir des interactions non-spécifiques que nous avons constatées. Au-delà de la création d'auto-assemblages, nous avons également pu montrer que ce système est prometteur afin d'y greffer des nanoparticules dont la surface a été modifiée par de la streptavidine.

A court terme, les perspectives principales sont donc l'optimisation des conditions des différentes étapes afin d'aboutir à la formation de structures contrôlées. Dans le cas d'auto-assemblages entre virus, il est possible d'imaginer fixer la neutravidine à l'extrémité

d'un deuxième lot de virus, par le même biais de fonctionnalisation chimique. Cette méthode permettrait également la création de particules hétéro-fonctionnelles en s'appuyant sur une double fonctionnalisation à la fois du corps et de l'extrémité du virus. Dans le cas du système virus/nanoparticules, l'utilisation de billes présentant directement à leur surface des maléimides en nombre contrôlé est une piste prometteuse afin d'obtenir le greffage d'une seule nanoparticule par phage. L'avantage de cette méthodologie est également de s'affranchir de l'étape de fonctionnalisation par de la biotine et donc des interactions non-spécifiques qui peuvent en résulter.

Dans le prolongement de cette idée visant à se défaire de l'étape de fonctionnalisation chimique, le *phage display* permet également d'exprimer directement sur la protéine p3 des séquences polypeptidiques complémentaires présentant une affinité pour la streptavidine. Dans le cas que nous avons présenté, celui du M13-Antistreptavidine, l'affinité entre l'insert et la protéine n'est pas suffisante pour aboutir à la formation d'auto-assemblages stables au cours du temps.

Le *phage display* est néanmoins un outil puissant permettant l'ajout d'un nombre important de séquences différentes et la poursuite de son exploration est une des perspectives principales du système. Dans le cas de la streptavidine, il existe par exemple plusieurs *tags* susceptibles de lui présenter une affinité plus importante que celle que nous avons présenté, dont le Strep-Tag II [2] ou le SBP-Tag [3]. Les applications du *phage display* s'étendent également au-delà de l'interaction avec la streptavidine et il est également possible d'imaginer exploiter d'autres interactions telles que celles déjà connu comme les glissières à leucines (ou *leucine zippers*) [4] ou encore entre l'hexa-histidine et le complexe nickel(II)-acide nitrilotriacétique (Ni-NTA) [5].

La principale motivation de telles études et de leurs développements réside dans la construction d'auto-assemblages hiérarchiques utilisant comme bloc de base le système modèle qu'est le virus fd. De manière simple, par des interactions attractives de déplétion dans des mélanges de virus et de polymères non-adsorbants, plusieurs travaux ont montré la formation de membranes colloïdales non-amphiphiles à deux dimensions [6–9] qui sont des structures prometteuses en vue d'aboutir à des biomatériaux. Des *platelets* hexagonales peuvent également être obtenue de manière similaire [6] et l'étude de leurs dislocations présentent un grand intérêt dans la problématique de transmission de chiralité.

Dans la continuité directe des travaux présentés ici, l'auto-assemblage dirigé de virus offre des perspectives intéressantes. Les dimères artificiels que nous avons créés présentent lors de nos observations en microscopie électronique une discontinuité nette. Une étude sur les facultés d'auto-organisation et le diagramme de phase cristal-liquide d'un tel système sont des ouvertures offrant un grand intérêt fondamental. La possibilité d'une double fonctionnalisation corps/extrémité ouvre également la voie à la création de dimères hétéro-fonctionnels. Parmi la large variété de particules asymétriques qu'il serait alors possible de créer (en assemblant des virus ayant des diamètres différents en les modifiant par des

polymères par exemple), l'une des pistes les plus excitantes est certainement la création d'amphiphiles colloïdaux. En s'appuyant sur une fonctionnalisation du phage avec du PNIPAM et en l'assemblant avec un virus nu, le caractère hydrophobe du polymère apparaissant avec la température permettrait d'aboutir à ce résultat, dont il serait alors possible d'étudier les différents auto-assemblages. Au-delà des assemblages de deux virus, les structures tri- et tétramériques peuvent constituer des blocs de base intéressants dont l'auto-organisation pourrait aboutir à la construction de biomatériaux. L'origami d'ADN [10,11] repose sur la construction de structures en exploitant l'affinité bien connue entre les bases nucléiques et en l'utilisant pour plier un brin en des points précis permettant d'aboutir à une structure bi- ou tridimensionnelle souhaitée. C'est également un exemple de formes et d'éléments simples pouvant servir par la suite d'atomes ou molécules colloïdaux dans l'ingénierie de diverses structures plus complexes. La variété des auto-assemblages que nous avons obtenus à partir du virus est alors prometteuse dans l'idée d'une bio-ingénierie basée sur ce système modèle.

Enfin, parmi les nombreuses études qui ont été mené sur le virus fd, il a été notamment montré la possibilité de réaliser une minéralisation de sa surface [12,13]. L'utilisation du phage comme matrice permet alors d'obtenir des particules inorganiques présentant les mêmes propriétés de monodispersité en taille, une caractéristique complexe à obtenir par des méthodes classiques de croissance cristalline, couplée avec un grand rapport d'aspect. Le développement de leur stabilité colloïdale pourrait dès lors mener à l'obtention de mésophases cristal-liquides. Un intérêt majeur de ce type de système est en lien avec les travaux présentés en dernière partie, traitant des effets électro-optiques dans des suspensions cristal-liquides minérales. Le couplage prometteur obtenu entre le champ électrique et des bâtonnets de phosphate de lanthane (LaPO_4) stables colloïdalement, associé à une transparence optique et un comportement athermal, sont des perspectives prometteuses en vue de l'utilisation de suspensions minérales dans une nouvelle génération de dispositifs électro-optiques, avec par exemple la création de vitres ou de verres ophtalmologiques aux propriétés modulables pixel par pixel.

Bibliographie

- [1] R. Chelakkot, R. Lipowsky, and T. Gruhn, *Macromolecules* **39**, 7138 (2006).
- [2] S. Voss and A. Skerra, *Protein Eng.* **10**, 975 (1997).
- [3] A. D. Keefe, D. S. Wilson, B. Seelig, and J. W. Szostak, *Protein Expr. Purif.* **23**, 440 (2001).
- [4] R. Y. Sweeney, E. Y. Park, B. L. Iverson, and G. Georgiou, *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 539 (2006).
- [5] K. T. Nam, B. R. Peelle, S.-W. Lee, and A. M. Belcher, *Nano Lett.* **4**, 23 (2004).
- [6] Z. Dogic and S. Fraden, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **359**, 997 (2001).
- [7] E. Barry and Z. Dogic, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10348 (2010).
- [8] T. Gibaud, E. Barry, M. J. Zakhary, M. Henglin, A. Ward, Y. Yang, C. Berciu, R. Oldenbourg, M. F. Hagan, D. Nicastro, R. B. Meyer, and Z. Dogic, *Nature* **481**, 348 (2012).
- [9] P. Sharma, A. Ward, T. Gibaud, M. F. Hagan, and Z. Dogic, *Nature* **513**, 77 (2014).
- [10] P. W. K. Rothmund, *Nature* **440**, 297 (2006).
- [11] T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, and K. V. Gothelf, *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5636 (2011).
- [12] E. Pouget and E. Grelet, *Langmuir* **29**, 8010 (2013).
- [13] C. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, and A. M. Belcher, *Science* **303**, 213 (2004).