

Solides mésoporeux d'intérêt biologique

Yves Bouligand

Summary

Mesoporous solids of biological interest

Many examples of skeletal structures in animals and microorganisms show strong similarities with recently synthesized mesopores, which associate two parts, a mineral one and an organic one, both being strongly interpenetrated at the nanoscopic scale. In the synthetic mesopores, the organic part often consists in a set of elongated micelles, aligned as in certain lyotropic liquid crystals, whereas the inorganic part lies in between. In skeletal structures, the organic part is made either of cell membranes arranged into sets of parallel tubes, or of polymers aligned into a matrix of thin fibrils. In both systems, synthetic or biological, micelles, bilayers or fibrils seem to form a template guiding the mineral deposition. Biomedical applications of synthetic mesopores are expected and the existence of analogues in cells and tissues could be very stimulating to design new bioinspired materials.

Mots-clés

Biominéralisations, composites, cristaux liquides, mésopores, pharmacie.

Key-words

Biomineralizations, composites, liquid crystals, mesopores, pharmacy.

Rappels

Définitions

Les mésopores sont des matériaux hybrides, associant une partie minérale finement ajourée, à l'échelle nanométrique, et une partie organique, distribuée dans les interstices de la partie minérale. Les diamètres de ces canaux ou cavités sont de quelques nanomètres et se situent par convention entre 2 et 50 nm [1]. On rencontre aussi le terme de nanopores pour désigner divers mésopores. Mais des diamètres plus fins ou plus larges interviennent (donnant lieu à des matériaux appelés parfois micro- et macropores). En élevant la température à quelques centaines de degrés, la partie minérale subsiste et conserve souvent les détails de son architecture, alors que la partie organique disparaît. Ces constructions peuvent être le siège de diverses réactions chimiques ou de phénomènes physiques, qui permettent d'envisager de nombreuses applications.

Historique

Les premières synthèses de mésopores datent de 1992 et un effet de mode s'est manifesté depuis quelques années, avec d'abord une croissance exponentielle du nombre des publications, mais cette progression s'atténue tout en restant importante. On trouvera un bref historique et les principales références dans les travaux de Attard *et al.* [2] ou de Göltner et Antonietti [3], ainsi que bien des perspectives d'applications dans ceux de Stein *et al.* (2000). Pourtant, le sujet peut être considéré comme bien antérieur aux années 90, ainsi que l'indique Behrens [1], et des structures mésoporeuses ou analogues furent décrites sous d'autres noms, en divers matériaux biologiques, dans les cellules et les tissus, animaux ou végétaux. Les mésopores biologiques sont intéressants à considérer, en raison de leur intégration au fonctionnement des organes. Les analogues biologiques

des mésopores présentent souvent des pores de diamètre plus élevé, au-delà de 50 nm et seraient donc des macropores.

Exemples naturels non biologiques

Il s'agit de minéraux cristallisés, connus sous le nom de zéolithes, dont les plus connus sont des aluminosilicates. Leur structure comporte des canaux ou cavités de diamètre généralement inférieur à 2 nm et ce sont des micropores [4-5]. On y trouve divers cations et de l'eau agencée elle-même de manière polyédrique par le jeu des liaisons hydrogène, sous forme de clathrates, c'est-à-dire de cages autour de ces ions ou de petites molécules ; ces corps servent d'échangeurs d'ions (voir les traités classiques comme [6]). Le terme de zéolithe signifie « pierre qui bout », ceci pour des raisons aisément compréhensibles. On sait également que le carbone peut constituer, à la faveur d'arcs électriques ou d'autres conditions, diverses architectures polyédriques fermées [7], plus ou moins régulières comme les fullerènes, mais aussi des nanotubes [8], que l'on sait aligner en simulant des mésopores, mais plutôt à l'échelle des micropores [9]. On peut également produire avec le carbone graphitique des structures finement réticulées et poreuses [10], avec des géométries proches de celles rencontrées dans les zéolithes.

Mésopores de synthèse et analogues biologiques

Le mésopore le plus classique aujourd'hui est la « silice en nid d'abeille », dont nous indiquerons plus loin la préparation et les applications espérées. La *figure 1* souligne les différences usuelles entre mésopores de synthèse et mésopores biologiques, mais ces différences iront en s'atténuant, en incorporant de nouveaux ingrédients à ces systèmes. Vu au microscope électronique par transmission (MET), un mésopore de synthèse [11] présente une structure ordonnée (*figure 1a, 1b*), régulièrement hexagonale, avec peu de

défauts, mais les mécanismes en jeu dans la préparation sont certainement plus complexes que ne le suggère la *figure 1c*, où l'on voit de la silice colloïdale s'insinuer entre des micelles cylindriques de molécules organiques. Notons cependant que des distributions de pores à échelles variables furent obtenues avec des alumino-phosphates lamellaires, à partir de préparations organo-minérales [12]. Au contraire, les mésopores biologiques, comme ceux rencontrés dans les piquants de certains vers marins (*figure 1d*), comportent des canaux parallèles, mais souvent de diamètre variable, dont la distribution est cependant contrôlée [13]. Les mésopores ou macropores biologiques sont hautement diversifiés dans leurs structures et leurs fonctions et nous en verrons plusieurs exemples. Les informations sur la genèse de ces systèmes biologiques ne manquent pas, mais demeurent partielles, et les gènes concernés n'ont pas encore été identifiés. Le fonctionnement des cellules impliquées n'a pas fait l'objet de toutes les investigations nécessaires. Nous allons reprendre ces questions plus en détail.

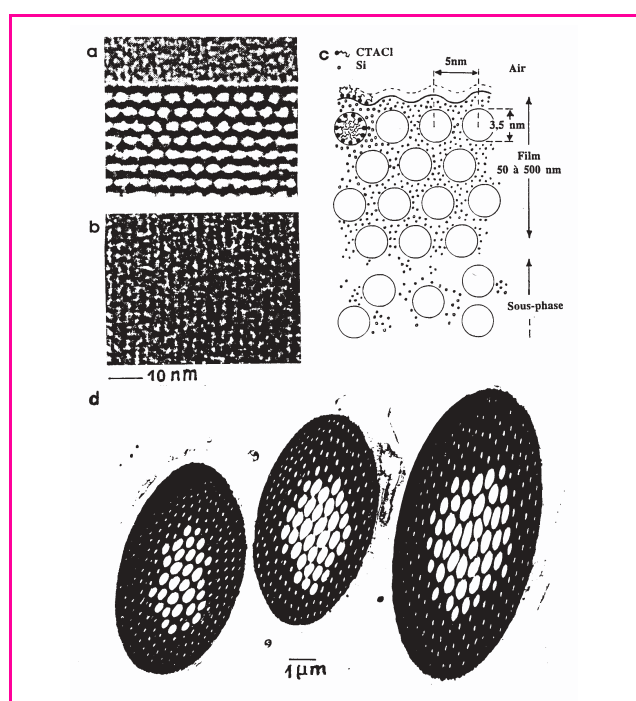


Figure 1 - Mésopores de synthèse (a, b) ou biologiques (d).
a : Vue transversale de silice en nid d'abeille en MET, au niveau de l'interface avec l'air. **b :** Vue de dessus d'un film semblable à celui examiné en (a), les cannelures ayant une période moitié de celle définie par un pore et son voisin en (a). **c :** Principe de formation d'un film mésopore, les structures circulaires représentant des micelles cylindriques en coupe. **d :** Coupe oblique de trois soies ou piquants d'un ver marin, *Haplosyllis depressa*. Le diamètre des pores cylindriques est donné par le petit axe des sections elliptiques et il descend au-dessous de 50 nm dans les parties les plus périphériques de la soie. La structure est donc majoritairement macropore, constituée de polysaccharides azotés (chitine) et de protéines, en étant plus ou moins minéralisée. (a-c) d'après [11] et (d) d'après [13].

La « silice en nid d'abeille »

Préparation

La production de ce mésopore met en jeu des micelles cylindriques en suspension dans l'eau, qui se maintiennent à égale distance en formant un réseau hexagonal et le système est consolidé en introduisant de la silice amorphe entre ces micelles. Le ciment siliceux peut être obtenu en appliquant la

méthode « sol-gel » de production de matériaux hybrides par hydrolyse d'alcoxydes tels que le tétraéthoxysilane, $\text{Si}(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5)_4$ ou TEOS, donnant de la silice SiO_2 qui polymérise sous forme de gel amorphe [11, 14-15]. Ces micelles adoptent souvent l'ordre caractéristique de certains cristaux liquides et, en général, la silice intercalée n'en modifie pas sensiblement la géométrie, sauf divers paramètres tels que les distances mutuelles. Si l'on passe ce genre de préparation dans un four à 450 °C, la matière organique se trouve décomposée et volatilisée. Seule subsiste la silice qui conserve le souvenir de la forme des micelles au niveau de cavités parfaitement dessinées dans les micrographies d'échantillons assez minces.

En pratique, pour préparer de la silice mésopore [11, 16], on utilise le TEOS en présence d'un surfactant cationique, le chlorure de cetyltriméthylammonium, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ ou CTACI, en milieu acide (HCl). La synthèse associée en proportions molaires : 100 H_2O (1 800 g) : 0,11 CTACI (35 g) : 7 HCl (255 g) : 0,07 à 0,13 TEOS (13 à 25 g). On mélange d'abord les trois premiers constituants à la température ordinaire et on ajoute le TEOS en agitant énergiquement quelques minutes. L'ensemble est conservé au fond d'un récipient fermé à 80 °C. Une mince pellicule apparaît en surface au contact de l'air. Son épaisseur est de quelques dizaines de nanomètres après cinq à dix minutes et peut atteindre un demi-micron au bout de quelques jours ou une semaine. Une pellicule similaire se forme à la surface de clivages de micas immergés dans la préparation.

Structure

Le film obtenu à l'interface de l'air peut être prélevé ou manipulé et se prête à la confection de coupes minces à l'ultramicrotome [11]. Si la section est bien transversale, la structure hexagonale apparaît parfaitement en MET, avec un maximum de contraste aux électrons au niveau de la silice (*figure 1a*). Quand le film est assez mince pour être déposé sur grille porte-objet, son examen en MET montre l'homogénéité de l'alignement de la structure hexagonale en surface (*figure 1b*).

Cette structure hexagonale est confirmée par la diffraction des rayons X, qui indique aussi l'état amorphe de la silice. On retrouve les mêmes structures dans les pellicules apparues au contact des micas. L'ordre hexagonal demeure intact après calcination à 450 °C. D'autres traitements furent proposés pour éliminer la matière organique, notamment par chauffage à 160 °C, et extraction dans l'éthanol au soxhlet, précédé ou non d'une exposition à des vapeurs d'ammoniac [16]. Les morphologies de ces systèmes sont parfois simples, comme celles des pellicules de surface dont il a été question, ou bien complexes (*figure 2a*) en microscopie électronique à balayage (MEB), au moins à première vue, quand on modifie les proportions citées plus haut, en particulier si l'on augmente celle du TEOS [18]. En fait, ces morphologies s'interprètent en supposant l'existence de défauts et de textures semblables à celles observées dans les cristaux liquides colonnaires de type hexagonal [19], comme l'indique la *figure 2b et c* et les travaux des références [11, 17-18, 20-23].

Rôle présumé des cristaux liquides dans l'assemblage du mésopore

Ces films mésoporeux à structure interne hexagonale furent comparés aux cristaux liquides lyotropes, constitués de

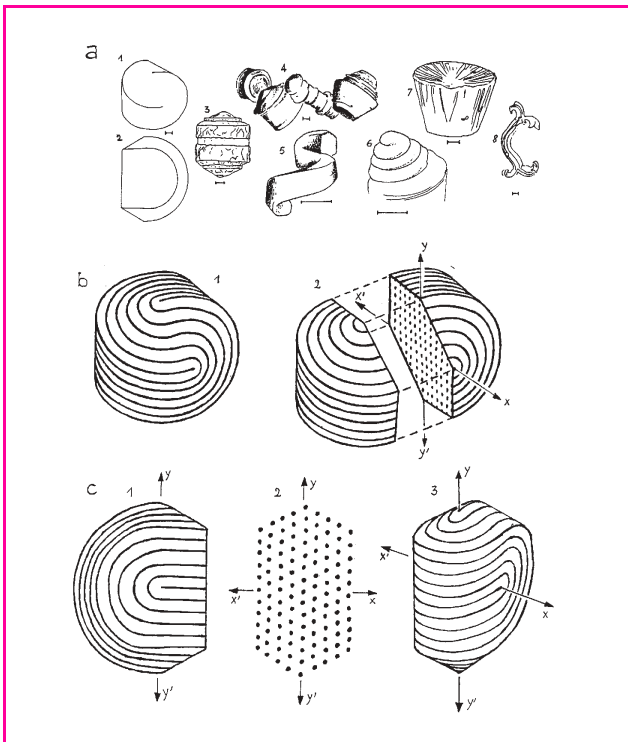


Figure 2 - Mésopores siliceux de formes complexes.

a : Série de huit objets obtenus avec de la silice en nid d'abeille passée au four à 450 °C, dessinés d'après les images en MEB (dans [11]) ; barres : 10 µm. b : Analyse de a1 avec deux disinclinaisons coplanaires d'axes xx' et yy' se coupant à 60°. Analyse similaire de a2, xx' et yy' se coupant à angle droit. La présence de ces deux textures démontre l'existence d'axes d'ordre 6 dans la structure, que l'on ne peut déduire des diagrammes de diffraction des rayons X, en raison de la centrosymétrie.

micelles cylindriques de molécules amphiphiles [2]. Dans certaines conditions, ces micelles s'alignent parallèlement en donnant un réseau hexagonal en coupe transversale. Il se trouve que le CTACI utilisé dans la synthèse de ce mésopore peut donner une telle phase, dans certaines conditions en présence d'eau, ce qui a suggéré le mécanisme d'assemblage de cette silice en nid d'abeille, conformément à la présentation très schématique de la figure 1c, en vue transversale. Cette hypothèse a donné lieu à discussion car le CTACI supposé former la phase cristalline liquide hexagonale dans l'eau ne la donne pas aux concentrations utilisées dans la préparation du mésopore et, de plus, le TEOS n'est guère soluble dans l'eau. Il est probable que la présence de TEOS modifie les diagrammes de phase, en leur ajoutant une dimension supplémentaire ; il pourrait également interférer avec certains mécanismes de nucléation. Cela a conduit à des interprétations différentes, parfois complexes : plusieurs auteurs ont pensé que la « nucléation » du mésopore comportait une interaction structurante entre silice, surfactant et mica ou un autre substrat comme l'interface avec l'air [11], différente de celle impliquée par l'ordre hexagonal spontané, observé dans les phases cristallines liquides produites par le CTACI dans l'eau et sensibles au pH [2-3, 24]. Les premiers auteurs ont conservé pour partie leur premier modèle, mais se sont ralliés à l'interprétation de type cristaux liquides quand ils ont observé les défauts et textures propres à ces phases, comme nous l'avons indiqué plus haut. Finalement, cet ordre cristallin liquide constituerait bien un guide pour le dépôt de la silice, c'est-à-dire un « template » (en anglais).

Les perspectives d'application de la silice mésoporeuse sont considérables d'après leurs auteurs [2-3, 11, 17, 24]. Elles concernent :

- les techniques de séparation de gaz, de liquides et de certaines molécules biologiques, ainsi que la purification de l'eau ;
- la réalisation de capteurs de macromolécules, de semi-conducteurs [25] ou de revêtement à faible constante diélectrique, de systèmes optoélectroniques, avec photochromes et d'autres composés à comportement optique non linéaire ;
- la constitution de matrices d'adsorption, porteuses de catalyseurs et de modificateurs de réactivité chimique, par divers effets de surface ;
- la création de composites de synthèse, de céramiques et divers biomatériaux ;
- l'encapsulation de médicaments à usage externe ou oral, à disponibilité prolongée [26-27].

Position centrale de la silice dans l'étude des mésopores

Les mésopores les plus communs ont une fraction minérale faite de silice amorphe, d'origine colloïdale, comme l'opale et d'autres minéraux. La silice colloïdale a toujours fasciné les scientifiques, puisqu'il existe une chimie organique du silicium, mais celle du carbone aurait triomphé au cours de l'histoire géologique en donnant naissance à la vie, alors qu'il y a tant de silice et de silicates disponibles à la surface de la Terre, souvent à l'état colloïdal, et que la silice cristallisée la plus commune, le quartz, présente une forme droite et une forme gauche. Beaucoup de choses restent à étudier sur la polymérisation de la silice amorphe, dans les deux contextes, biologique et non biologique.

La silice est présente dans le squelette de nombreux microorganismes aux morphologies très ouvragées (diatomées, radiolaires etc.) et les analogies avec les mésopores ne manquent pas, ce qui a conduit à plusieurs articles, en particulier celui de Mann et Ozin [28]. Ce qui éveille aussi l'attention est que la silice se trouve à très faible concentration dans l'eau et que les organismes savent la concentrer dans les cellules et en former des concrétions importantes, finement sculptées, dans des conditions physiologiques. En milieu non biologique, au contraire, les processus interviennent souvent dans des conditions physiologiquement inappropriées, en raison de la chimie, ou du pH, ou de la température plutôt élevée, comme au pied des geysers, où la silice amorphe s'accumule sous forme d'opale. La chimie douce et élaborée qui intervient au sein des organismes vivants en permettant des concrétions siliceuses hautement élaborées constitue un nouveau défi pour les chimistes [29-32].

La silice amorphe est connue de longue date comme « durcissant » et il en est question dans les travaux des paléontologistes, quand il faut dégager des fossiles friables. On utilise la « liqueur des cailloux », c'est-à-dire une solution aqueuse de silicate de sodium (SiO_3Na_2), sel obtenu en chauffant au rouge un mélange dans les bonnes proportions de sable de Fontainebleau (quartz pur, SiO_2) et de carbonate de soude ($\text{CO}_3\text{Na}_2, 10 \text{H}_2\text{O}$). On obtient ainsi du « verre soluble » que l'on pulvérise dans un mortier, et la poudre obtenue est soluble dans l'eau bouillante. L'addition à froid d'acide chlorhydrique au silicate de sodium en solution redonne la silice sous forme de gel amorphe. On peut conserver en entier un fossile calcaire et complètement

friable, à moitié dégagé, si on le badigeonne avec précaution au moyen d'un pinceau imbibé d'une solution de silicate alcalin. Du silicate de calcium et de la silice amorphe se déposent dans les interstices et donnent un composite résistant, mais il faut du doigté pour ne pas durcir aussi le reste du sédiment que l'on cherche à éliminer.

La silice et les silicates sont omniprésents dans la nature, sous forme immobile dans les roches cohérentes, ou sous forme circulante dans l'eau, les sols et la biosphère. Les trois formes circulantes de la silice ou des silicates dans la nature correspondent respectivement à trois états :

- 1- l'état dissous dans l'eau, à faible concentration ;
- 2- l'état solide, sous forme de poussières transportées par le vent, mais issues des sols et des roches, par les facteurs d'érosion ;
- 3- la fraction non négligeable transportée par les êtres vivants, de nombreux microorganismes, par les vers de terre et bien d'autres espèces dans les sols ; la silice ne manque pas dans la nourriture des animaux et est également présente dans les parois cellulaires de nombreux végétaux.

Les autres mésopores de synthèse et leurs applications

Parmi les facteurs donnant leur diversité aux mésopores, quatre semblent essentiels :

- la chimie du gel intercalé entre les micelles,
- la chimie de la phase cristalline liquide,
- la nature de la phase cristalline liquide constituant le moule ou « template »,
- la texture adoptée par cette phase, c'est-à-dire les défauts et le découpage en domaines.

Ces quatre facteurs pourraient conduire à une classification, mais elle est peut-être prématurée parce que rien ne prouve encore que l'autoassemblage soit strictement de type cristallin liquide, avec d'autres processus importants encore ignorés ou sous-estimés, les recherches n'étant qu'à leur début, avec des surprises en perspective. Pour l'instant et à défaut de mieux, ce principe de classification garde sa logique et nous nous y tiendrons.

À la place de la silice, on a introduit du sulfure de cadmium, du séléniure de cadmium [24], des alumino-phosphates [13], du phosphate de calcium [28] ou du platine colloïdal [3], etc. Au lieu d'un surfactant cationique, on a pris des amphiphiles non ioniques produisant aussi des phases hexagonales en présence d'eau, ce qui permet, en les associant aux sels de cadmium considérés plus haut, de créer un semi-conducteur pour des applications photocatalytiques et photosynthétiques [24]. De même, un amphiphile non ionique fut associé sous forme hexagonale à du platine colloïdal, pour en améliorer les propriétés catalytiques, en lui conférant une forme mésopore [3].

Au lieu de micelles cylindriques produites par assemblage de surfactants, on a eu recours à des copolymères associant une chaîne soluble dans un solvant et une chaîne qui ne l'est pas. Ces deux blocs reliés, mais incompatibles quant à la solubilité, ou bloc-copolymères, produisent aussi des cristaux liquides et beaucoup d'entre eux le font en présence d'eau. Ils furent adoptés pour la synthèse de nouvelles variétés de silice mésopore, en changeant le diamètre et la forme des pores. Plus récemment, des tribloc-polymères furent utilisés pour construire des silices à très larges pores [33].

Les structures cristallines liquides furent également modifiées et, au lieu de phases hexagonales, on a examiné

ce qui se passait en phase lamellaire [13] ou dans des systèmes micellaires réticulés [28]. Pour les premières, on parle de corps mésolamellaires. On peut discuter de savoir s'il s'agit de véritables mésopores, puisque les canalicules sont remplacés par des cavités de formes et connexions différentes. Mais l'interpénétration des fractions minérale et organique demeure intime dans ces structures qui sont considérées dans les mêmes articles que les mésopores classiques.

Pour ce qui est de la texture, c'est-à-dire les distorsions, les défauts et la distribution en domaines, nous avons déjà abordé le problème dans la *figure 2* et le reprendrons plus loin. La silice mésopore présente soit un alignement uniforme de ses pores canaliculaires, soit des dispositions fortement recourbées, et ceci suivant la proportion du TEOS rapportée à celle du surfactant, mais sans avoir changé la phase qui est hexagonale [22]. Disons que la question des défauts et des textures est d'un abord complexe et, en même temps, c'est d'elle en grande partie que dépendra la mise en œuvre des applications. La plus immédiate d'entre elles concerne l'analyse plus approfondie des défauts et textures des cristaux liquides eux-mêmes, que nous considérons dans le paragraphe suivant. Le deuxième type d'application se baserait sur une meilleure approche des mésopores biologiques, parce que leur diversité réside surtout dans la texture et leur intégration fonctionnelle. Les autres applications sont à espérer très nombreuses dans le domaine biomédical, avec des barrières psychologiques importantes à franchir, en raison de ces systèmes minéraux encore rares dans la pharmacopée. Le point le plus prometteur pour les perspectives pharmaceutiques est que beaucoup de mésopores permettent la nanoencapsulation de médicaments et constituent aussi des céramiques utilisables dans des dispositifs nanoélectroniques. Le but serait de délivrer un médicament encapsulé dans des nano- ou microparticules véhiculées par la circulation du sang, quand celles-ci se trouvent à proximité des cellules ou des tissus cibles. Il faudrait donc concentrer dans ces particules la nanoélectronique permettant la reconnaissance de signaux complexes, caractéristiques de l'environnement cellulaire ou tissulaire, et le déclenchement de mécanismes de libération du principe actif. Il s'agit de science-fiction, mais les nanotechnologies progressent très vite.

Les mésopores, outils de visualisation de détails texturaux

L'examen des mésopores de synthèse ou de ceux d'origine biologique nous a permis de comprendre le rôle de « template » souvent assuré par les cristaux liquides, surfactants ou polymères, ou par des membranes cellulaires également cristallines liquides. Les cristaux liquides peuvent s'ordonner selon des motifs à grande distance bien étudiés au microscope polarisant, appelés textures [19, 34-39]. Nous avons vu le parti que l'on peut retirer de l'examen morphologique de certains mésopores pour analyser des défauts semblables à ceux des cristaux liquides colonnaires hexagonaux (*figure 2b, 2c*). Il existe des textures dont les dimensions des domaines se situent dans une gamme d'échelles accessibles seulement en microscopie électronique, et les méthodes de préparation actuelles (cryofracture, cryomicroscopie électronique) ne sont pas toujours appropriées. Les mésopores que l'on peut en retirer, passés au four et pulvérisés en morceaux assez fins pour être transparents aux électrons, permettront peut-être d'accéder aux détails

texturaux qui nous manquent, notamment ceux des régions se situant au cœur des défauts et dont l'étude est à peine esquissée dans les cristaux liquides. Leur examen se ferait donc dans des conditions assez éloignées de celles qui règnent dans une phase cristalline liquide, mais ne manquerait pas d'intérêt pour autant.

Les principaux mésopores et macropores biologiques

On trouvera réunies dans le livre publié par Simpson et Volcani [40] un bel ensemble d'articles généraux sur la silice dans le monde vivant, avec tous les types de microsquelettes qu'elle constitue. Ce minéral est très répandu dans certains groupes animaux et végétaux, ainsi que chez beaucoup d'espèces unicellulaires. La bibliographie récente a été analysée par Coradin dans *Biomimétisme et Matériaux* [41], avec plusieurs autres chapitres essentiels notamment sur les phosphates de calcium par Lebugle et Rey (2001).

Le squelette siliceux des diatomées et des radiolaires

Lorsque les structures siliceuses sont très minces, comme chez les diatomées (algues unicellulaires), on peut les observer directement en MET et les pores présentent souvent une organisation hiérarchisée, avec deux échelles de diamètres (*figure 3*). Les plus petits pores font 20 nm de large (*figure 3a*) et on est encore dans la gamme des mésopores, mais ils peuvent être allongés et dépasser 50 nm selon le plus long diamètre (*figure 3a, 3b*). Les pores plus larges atteignent 1 à 3 μm de diamètre (*figure 3c*) chez beaucoup de diatomées et sont visibles au microscope à lumière, mais les petits pores de 100 nm ne sont pas résolus dans les mêmes conditions (*figure 3c*). L'origine de ces pores reste la même semble-t-il, que l'on soit dans la gamme des macropores ou celle des mésopores. La silice amorphe

est produite au contact d'une bicouche membranaire qui se plisse selon un dessin précis, contrôlant la forme définitive de la sécrétion minérale. On pourrait imaginer l'inverse, avec la membrane qui suivrait des formes différenciées directement par la silice, mais cela ne paraît pas vraisemblable étant donné l'aptitude des membranes à produire des morphologies complexes [42], alors que l'on ne connaît pas de propriétés similaires pour la silice.

La silice est présente sous forme hautement fenêtrée chez bien d'autres organismes unicellulaires, comme les chrysophycées, mais les pores dépassent en général 100 nm de diamètre et chez les radiolaires, ils varient d'un à plusieurs dizaines de μm . Ces édifices sont remarquablement organisés comme l'indique la *figure 4*.

Les réseaux peuvent être hiérarchisés (*figure 4d*), mais les mailles les plus fines sont résolues avec les microscopes à lumière. On est donc dans le domaine des macropores chez les radiolaires, mais la formation du squelette siliceux se fait encore au contact d'une bicouche membranaire.

On trouvera dans l'ouvrage de Simpson et Volcani [40] des indications sur la mise en place des premiers éléments du test des diatomées à l'intérieur de vésicules très aplaties, limitées par une membrane cellulaire spécialisée ou silicallemme, avec certaines ATPases impliquées dans le métabolisme de la silice.

Les recherches récentes sont focalisées sur les protéines telles que les pleuralines, les frustulines etc., ou divers peptides souvent cationiques, extraits des diatomées, dont on démontre l'aptitude à précipiter la silice à l'état amorphe. Des bloc-polypeptides inspirés de ces recherches permettent la synthèse biomimétique de silice mésopore. Des polyamines variables d'une espèce à l'autre sont susceptibles de modifier la morphologie du test. Pour la bibliographie, on se reportera à Coradin (2001), ainsi que Kroger *et al.* [44-48].

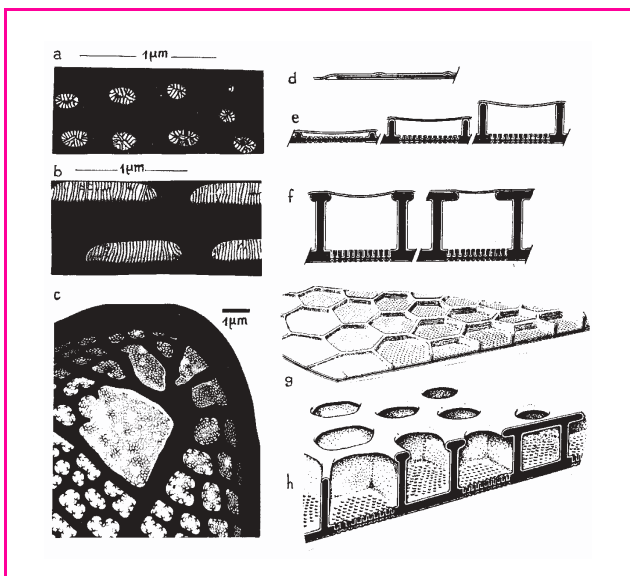


Figure 3 - Test siliceux de diatomées.

a-c : Valves de *Cocconeis* (a, b) et *Achnanthes* (c) en MET (d'après [40]). d-f : Schéma du développement des valves siliceuses de *Thalassiosira eccentrica*. La silice (en noir) est déposée au contact de membranes cellulaires. Des pores sont construits à deux échelles distinctes. g-h : Reconstitution 3D de la valve en cours de formation et terminée (d'après [40]).

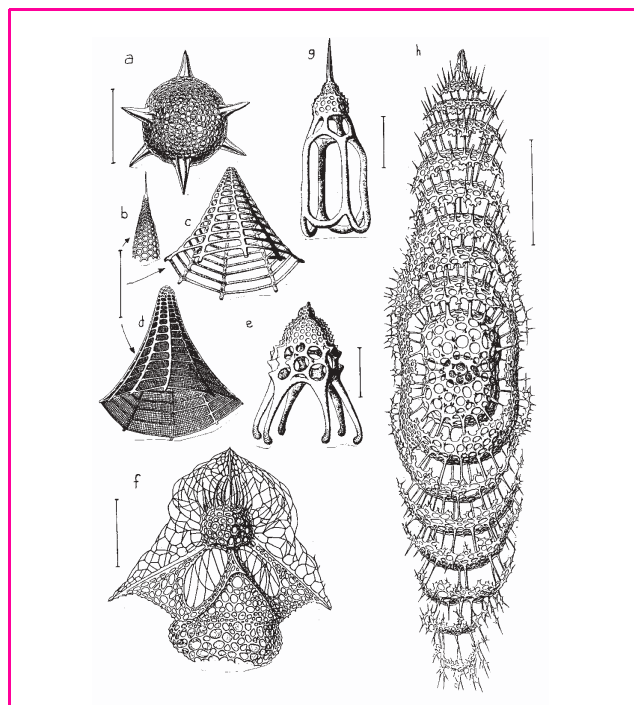


Figure 4 - Squelette siliceux de radiolaires.

a : *Hexastylus dimensibus*, avec la symétrie d'un octaèdre. b : *Cornutella hexagonella*. c : *Bathropyramis trapezoides*. d : *Plectopyramis trapezomma*. e : *Alacorys guilelmi*. f : *Pteropilium clathrocanium*. g : *Cladophora goetheana*. h : *Zygartus chrysalis* (d'après [43]). Barres : 100 μm .

Les spicules d'invertébrés

Lorsque la silice forme des agrégats massifs et durs, la technique des coupes fines est généralement impraticable. Elle fut pourtant appliquée avec succès chez certaines éponges, au moyen de couteaux de diamant montés sur ultramicrotome [40]. Beaucoup d'éponges doivent leur consistance à un dense réseau de collagène, une protéine fibreuse fort répandue dans le règne animal, et à la présence de concrétions minérales, appelées spicules, souvent en aiguilles, ou présentant des formes originales, différentes d'une espèce à l'autre, ramifiées ou non, avec divers ornements (*figure 5a-f*). Les spicules sont calcaires chez certaines éponges, mais siliceux chez la plupart des autres, sauf celles dépourvues de spicules, comme l'éponge de toilette.

Certains spicules siliceux présentent un filament axial (*figure 5g*), d'un tiers de micron de diamètre en général, montrant sur coupe transversale un réseau hexagonal d'espaces clairs de 2 nm de diamètre environ, distants de 3 nm centre à centre (*figure 5h*), bien résolus en MET. En coupe longitudinale, on observe parfois une striation de 10 à 12 nm de période (*figure 5i*). La matière du spicule autour du filament axial est souvent perforée de canaux curvilignes et plus larges (~10 nm).

La présence de silice dans ces réseaux a été vérifiée en examinant l'action de l'acide fluorhydrique sur des coupes minces de 50 nm d'épaisseur environ et par des méthodes analytiques locales (microsonde de Castaing). L'observation d'un résidu structuré au terme de l'attaque acide permet de supposer la présence d'un template au niveau du filament axial (Garrone *et al.* dans [40]). S'agit-il d'une phase micellaire hexagonale, comme dans les mésopores de synthèse, constituée de molécules amphiphiles, proches de celles des membranes cellulaires, ou d'une trame organique fibreuse ? Les canaux de 2 nm de diamètre paraissent un peu étroits pour admettre l'hypothèse micellaire. On sait de plus que des protéines fibreuses de ces éponges, les silicatéines, interviennent effectivement dans la construction du réseau de silice (cf. [41]).

La classification des mésopores de synthèse s'étend aux mésopores biologiques. Sur la *nature du minéral*, disons que la silice est souvent remplacée par du carbonate de calcium, pour de nombreux spicules, et pas seulement chez certaines éponges, mais aussi chez beaucoup d'invertébrés marins [40-41, 51].

La calcite ou l'aragonite des espèces unicellulaires ou invertébrées, de même que ces formes minérales obtenues *in vitro*, en l'absence de cellules, présentent un aspect poreux lorsqu'elles sont examinées à haute résolution sur échantillon mince et qu'un certain axe cristallographique est bien aligné sur le faisceau d'électrons [52-53]. Mais les « pores » sont distants de 4 Å environ, soit à peu près dix fois plus serrés et petits que ceux décrits dans les mésopores. Ces structures sont strictement cristallines et se situent dans la gamme minimale des micropores. Leur contraste provient uniquement de la structure rhomboédrique de la calcite ou de celle orthorhombique de l'aragonite, mais la matière organique ne paraît pas entrer dans leur constitution, en première approximation.

Très généralement, chez les invertébrés, les spicules sont produits à l'intérieur du cytoplasme, au sein d'une vésicule limitée par une membrane cellulaire. Ainsi, le template ne se limite pas à une trame organique interne ou à un système de micelles, mais comporte une membrane

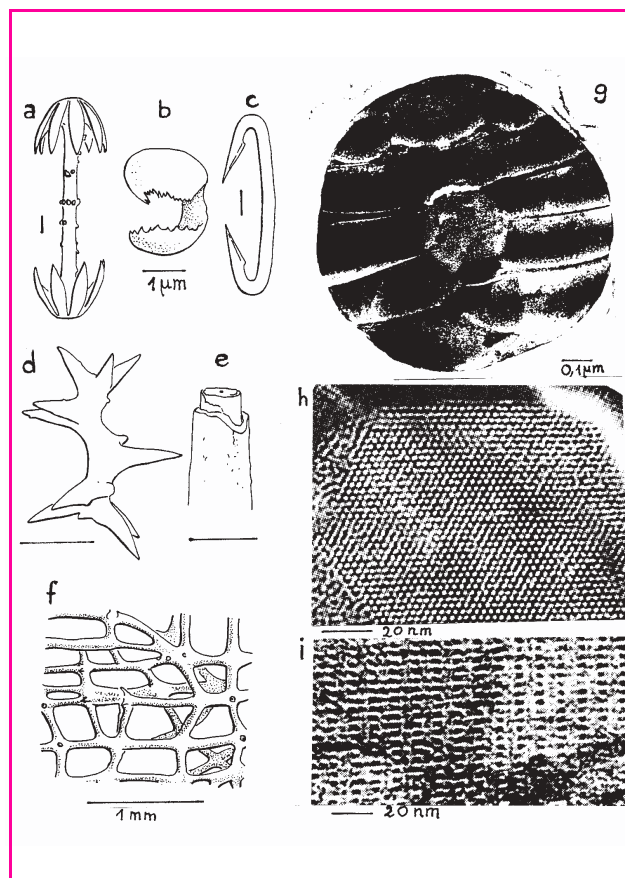


Figure 5.

a-f : Divers spicules siliceux d'éponge, examinés en MEB ; leurs noms sont au moins aussi extraordinaires que leurs formes. a : Amphidisque de *Hyalonema sieboldii*. b : Bipocillum de *Iophon pattersoni*. c : Diancistron de *Hypsispongia popana*. d : Microscillère de *Spirastrella coccinea*. e : Spicule brisé d'*Ephydatia fluviatilis*. f : Réseau siliceux de *Farrea facunda*. g-h : Jeunes spicules de *Haliclona* (mégascières) vus en coupe en MET. g : On distingue le filament axial de contour hexagonal. h-i : Coupes transversale et longitudinale du filament axial. a-d, f dessinées d'après W.D. Hartman ; e, g-i d'après R. Garrone, T. Simpson et J. Pottu-Boumendil [40]. Sauf indication contraire, les barres représentent 10 µm.

cellulaire dont la morphologie guide le dépôt minéral, plutôt que l'inverse, comme nous l'avons déjà indiqué pour les diatomées.

Nous avons évoqué des templates lamellaires à propos des mésopores de synthèse. Leur existence paraît probable chez beaucoup d'organismes, mais la question n'est pas toujours simple : le spicule d'éponge de la *figure 5e* montre une cassure suggérant un clivage facile selon des couches cylindriques emboîtées, comme peuvent l'être les couches smectiques de CTACI lorsqu'elles forment des textures myéliniques dans l'eau, ainsi que de nombreux cristaux liquides lyotropes. Ces clivages selon des cylindres coaxiaux sont remarquables dans le spicule d'ancrage d'une éponge du genre *Monoraphis*, découverte à un peu plus de mille mètres de fond au large des côtes de Somalie, avec un spicule de 3 m de long et 1 cm de diamètre. Le spicule de ces éponges fut étudié par Lévi et Barton, des spongiologues, et par Guillemet à Saint-Gobain (voir [54]) sur des exemplaires de Nouvelle Calédonie avoisinant un mètre de longueur et quelques mm de diamètre, parfois transparents comme le verre, mais beaucoup plus souples, et constitués de silice amorphe.

On peut proposer deux hypothèses : soit la présence d'un template de type smectique gonflé, c'est-à-dire formé de bicouches presque équidistantes, séparées par de l'eau, comme dans une forme myélinique, laquelle accueillerait de la silice amorphe, l'eau étant presque intégralement remplacée par la silice. Les bicouches smectiques, si elles existent, constitueraient un lubrifiant, n'altérant pas la dureté de la silice. Au contraire, ces fines lamelles cylindriques intercalaires, au lieu d'être des bicouches, pourraient être constituées par une trame organique de type silicatéine. La recherche demeure ouverte et difficile. Elle est à entreprendre sur des espèces moins rares que les *Monoraphis*, susceptibles d'être maintenues en élevage et dont les spicules présentent des clivages cylindriques similaires, comme dans la figure 5e.

Les figures 5 a-f nous permettent d'entrevoir la complexité des textures et des questions qui s'y rapportent. Dans ces spicules d'éponge, la structure est souvent mésoporeuse au niveau axial et plus ou moins lamellaire à la périphérie, les branchements latéraux impliquant la présence de défauts, dont l'ordonnance est vraisemblablement sous le contrôle des cellules. Des spicules existent en d'autres groupes, chez les didemnidés (tuniciers) et chez les échinodermes (oursins, étoiles de mer, ophiures, crinoïdes), mais sont principalement calcaires [55].

Ces concrétions prennent un développement considérable chez les oursins et d'autres échinodermes, en formant des plaques jointives ou des piquants. Très généralement dans ce groupe, les spicules, les plaques et les piquants sont constitués chacun d'un monocristal de calcite, ajouré par la pénétration du cytoplasme [56], qui en reste toutefois séparé par une bicouche membranaire. On sait qu'il s'agit d'un monocristal parce que chacune de ces plaques, lorsqu'elle est suffisamment mince et transparente, s'éteint d'un seul coup, entre polariseurs croisés, quand on tourne la platine du microscope polarisant. On le vérifie également en diffraction des rayons X pour de plus gros échantillons.

Ces monocristaux vermiculés forment des systèmes bicontinus, associant le monocristal multiplement connexe et le cytoplasme qui le pénètre, adoptant lui-même la connexité complémentaire, également multiple (figure 6a). Parmi les formes les plus remarquables de ces monocristaux de calcite, il y a certaines plaques où la bicouche membranaire forme une surface triplement périodique, à courbure moyenne proche de zéro (figure 6b-c), comme on en trouve dans certains cristaux liquides lyotropes, cubiques, bicontinus et gonflés. Il en existe d'autres exemples biologiques et leur structure est rappelée sur la figure 6d inspirée de [57]. Les aspects géométriques et topologiques des membranes cellulaires susceptibles de servir de template sont discutés dans deux articles, dont l'un de revue, où nous avons rassemblé les principales références [42, 58]. Nous ignorons s'il existe un couplage ou non entre certains axes de la calcite et ceux du réseau cubique formé par la membrane dans ces structures squelettiques des échinodermes. Les rapports entre calcite et cytoplasme sont représentés schématiquement en coupe (figure 6e).

Mésopores biologiques peu ou pas minéralisés

La matière squelettique de type mésopore ou macropore peut être strictement organique. L'exemple nous en est fourni par les soies des vers marins considérés en introduction dans la figure 1. Le constituant principal en est la chitine,

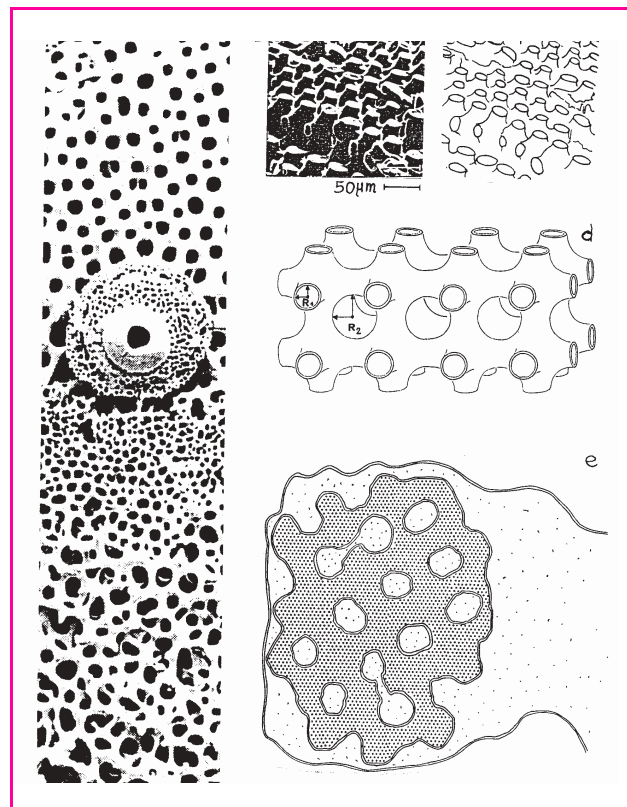


Figure 6.

Les plaques et les piquants du squelette des oursins associent une phase cristalline continue, multiplement connexe, et une phase aqueuse qui l'est également, les deux étant séparées par une membrane cellulaire, analogue d'une phase cristalline liquide lyotrope de type éponge (a) ou cubique (b). a : Vue au MEB du squelette d'un oursin, avec un tubercule où s'articulait un piquant, retiré ici (d'après [55]). Un même cristal de calcite forme chaque plaque ou chaque piquant, mais ce monocristal est vermiculé par des cavités qui communiquent et sont pénétrées de cytoplasme. b : Fracture d'une plaque de calcite de l'oursin *Cidaris rugosa*, d'après [56]. c : Dessin interprétatif de b. d : Schéma du type de surface observée en b, définie par une courbure moyenne constante nettement inférieure en valeur absolue aux deux courbures principales maximales, correspondant aux rayons R1 et R2. e : Schéma en coupe d'une plaque monocristalline de calcite, avec son réseau (représenté par une trame hexagonale) pénétré par le cytoplasme (en pointillés beaucoup plus espacés), dont il est séparé par une membrane figurée par une bicouche.

un polysaccharide azoté que l'on retrouve dans les parois cellulaires des champignons, dans la carapace des arthropodes (insectes, crustacés, mille-pattes, etc.), ainsi que chez bien d'autres invertébrés. La chitine est alignée parallèlement à l'allongement des soies de ces vers et est associée à des protéines. Le template des canaux longitudinaux observés sur coupe est assuré par une cellule appelée chéto-blaste, qui forme une plage de microvillosités, c'est-à-dire des digitations parallèles, allongées, cylindriques ou coniques de cytoplasme fibrillaire, limitées par une bicouche membranaire [12].

On connaît des gènes impliqués dans la formation de telles microvillosités, en particulier dans les cellules absorbantes de l'intestin, mais ce genre de recherche n'est toujours pas entrepris dans ce type de cellule productrice d'une structure « épineuse ». La sécrétion se fait entre les microvillosités, principalement à leur base, et par d'autres cellules latérales de la soie qui apportent de nouveaux matériaux entre les fibrilles déjà déposées. Ces processus sont présentés en microscopie électronique sur coupe dans la figure 7.

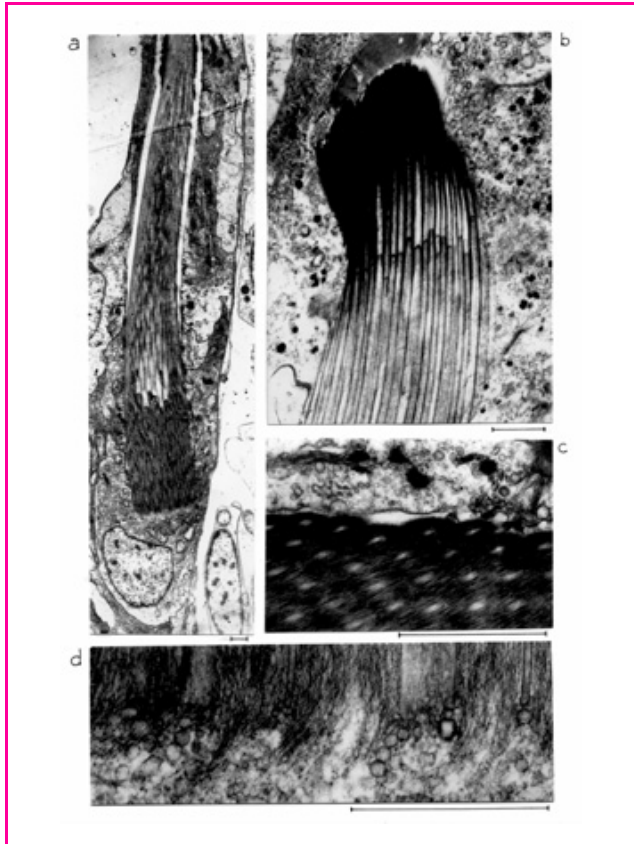


Figure 7 - Coupes ultrafines de soies d'un ver marin, *Haplosyllis depressa*, montrant la formation de ce mésopore ou macropore naturel, guidée par un ensemble de digitations cytoplasmiques ou microvillosités, chargées d'un contenu fibreux, probablement de l'actine [13].

a : Vue générale d'une soie en coupe presque longitudinale, avec la cellule à sa base, ou chétoblaste, et ses microvillosités directrices, ainsi que des cellules latérales très actives, qui viennent compléter la sécrétion entre les fibrilles d'une matrice produite par le chétoblaste. **b** : Une jeune soie, plus agrandie, avec ses microvillosités en coupe exactement longitudinale. **c** : Détail d'une cellule latérale au contact d'une soie témoignant d'une forte activité de sécrétion. **d** : Fusion de vésicules avec la membrane cytoplasmique située à la base des microvillosités. Barres : 1 μm .

Une représentation tridimensionnelle de ces processus est indiquée sur la *figure 8*. Un quart seulement de la base de la soie est indiqué, montrant ses relations avec la cellule de base, munie de microvillosités qui guident la sécrétion, et celles aussi avec les cellules latérales très actives. Certaines microvillosités se différencient pendant que d'autres disparaissent et leur diamètre varie également. Ces processus sont programmés et déterminent les formes souvent complexes des soies, fidèlement reproduites chez les individus, d'une génération à la suivante.

Un composite de type mésopore : la carapace des crabes

Les crabes et la plupart des crustacés de grande taille sont enfermés dans une carapace rigide, qui est souple et mince au niveau des articulations. La structure d'un fragment de carapace et de son épiderme sécréteur est représentée sur la *figure 9*.

La croissance des crabes, comme celle des autres crustacés et arthropodes, se fait par mues successives et le problème est de se créer un nouvel habit plus grand, sous un autre plus

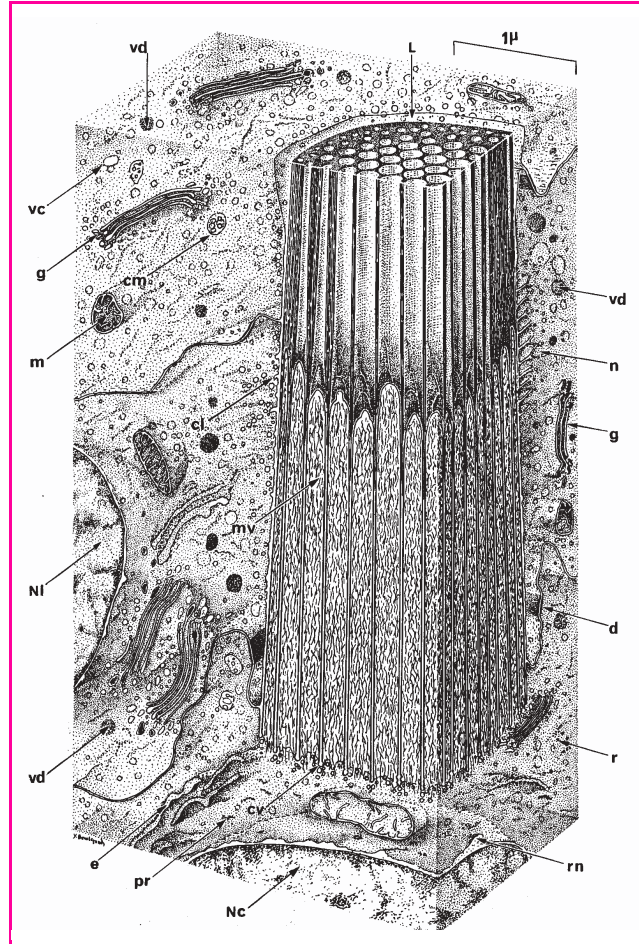


Figure 8 - Reconstitution dans un secteur de 90° des principales structures cellulaires à la base d'une soie de ver marin (*Haplosyllis depressa*) et dans les premières cellules latérales.

cm : corps multivésiculaire. **cl** : communication entre vésicule et espace extracellulaire au contact de la soie. **cv** : communication entre une vésicule et l'espace séparant deux microvillosités voisines. **d** : structure de jonction entre cellules. **e** : ergastoplasme. **g** : corps de Golgi. **L** : espace latéral dû au décollement des cellules périphériques. **m** : mitochondrie. **mv** : microvillosité. **n** : cytoplasme différencié en nid d'abeille, au niveau des premières cellules latérales. **Nc** : noyau du chétoblaste. **ni** : noyau d'une cellule latérale. **pr** : polyribosome ou polysome. **r** : ribosome. **rn** : replis latéraux du feuillet externe de l'enveloppe nucléaire. **vc** : vésicules claires aux électrons. **vd** : vésicules denses aux électrons (d'après [13]).

ancien, devenu trop petit. Pour y parvenir, l'épiderme constitué d'une seule couche de cellules se décolle de la face interne de l'ancienne carapace, et la plupart de ses cellules entrent en mitose, ce qui double à peu près leur effectif, ainsi que la surface de l'épiderme. De ce fait, celui-ci se plisse et débute la sécrétion d'une nouvelle carapace qui restera souple jusqu'à la mue. Certaines cellules de l'épiderme sécrètent entre l'ancienne et la nouvelle carapace des enzymes et divers sucs qui érodent et digèrent les couches les plus profondes de l'ancienne carapace, sur une épaisseur plus ou moins importante selon les régions.

La construction de la nouvelle carapace commence par le dépôt d'une « épicuticule », c'est-à-dire un revêtement imperméable, sauf à la base des poils ou au niveau de certains pores. Cette épicuticule a la structure d'un mésopore, sauf dans sa pellicule la plus externe, et les tubes y sont orientés normalement à la carapace [60]. La nature chimique de cette épicuticule est encore mal connue (lipides complexes et protéines).

Sous l'épicuticule se déposent alors la couche pigmentaire, constituée de filaments cristallins orthorhombiques de chitine, polymère d'acétyl-glucosamine (figure 10a), de 2 nm de diamètre [61], associés à des protéines agencées de manière hélicoïdale [62]. Ces baguettes (figure 10b) enrobées de leur ciment protéique sont agrégées en fibrilles (figure 10c) et forment un ensemble réticulé (ou anastomosé), avec une direction moyenne locale des fibrilles bien définie (figure 10d). A plus grande distance, on constate que ces fibrilles présentent un ordre cholestérique [34, 63], c'est-à-dire que, si x et y sont deux axes parallèles au plan de la carapace, z l'axe local, normal à cette carapace, p la longueur d'un pas hélicoïdal orienté selon z , et \mathbf{n} un vecteur unitaire parallèle à l'orientation locale des fibrilles, ses trois composantes vérifient :

$$n_x = \cos 2\pi z/p, \quad n_y = \sin 2\pi z/p, \quad n_z = 0$$

La véritable période selon z est $p/2$, parce que les fibrilles ne paraissent présenter aucune polarité (figure 11a). On retrouve donc la structure d'un cristal liquide cholestérique, mais non fluide. Des cristaux liquides cholestériques ont été obtenus *in vitro* à partir de ces cristallites de chitine fragmentés en baguettes, de rapport longueur/largeur proche de 20, et traités en surface de manière à être fortement polyélectrolytes [64]. *In vivo*, la sécrétion semble se produire sous forme cristalline liquide, avec \mathbf{n} parallèle aux membranes cellulaires externes de l'épiderme, et un processus de stabilisation viendrait rapidement abolir le caractère fluide initial de cette sécrétion, mais la nature précise des mécanismes en jeu reste à établir.

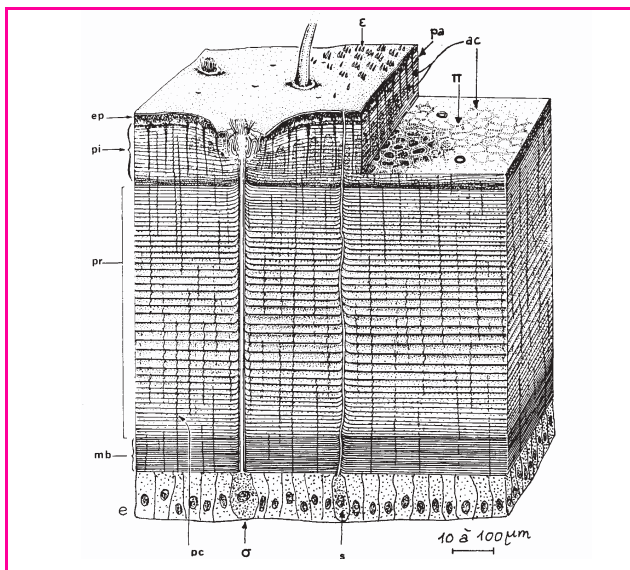


Figure 9. Fragment de carapace de crabe, avec son épicuticule (ep) formant divers types de poils et denticules (e) et la couche pigmentaire (pi), qui présente en de nombreuses régions des cloisons prismatiques que l'on voit en coupe horizontale dans la partie droite, et dont les positions correspondent aux limites des cellules de l'épiderme (e), lors de la sécrétion de la (pi) avant la mue. Viennent ensuite la couche principale (pr), plus développée, et la couche membraneuse (mb), toutes deux déposées après la mue. Des phosphatases alcalines (pa) sont présentes dans la (pi), juste sous (ep), et de l'anhydrase carbonique au niveau des cloisons (p). L'ensemble des couches (pi), (pr) et (mb) est stratifié avec une géométrie cholestérique (figure 11a) et est traversé de fins canaux (pc) contenant chacun un prolongement cylindrique du cytoplasme épidermique. Les couches (pi), (pr) ou (mb) sont stratifiées et leur épaisseur correspond à un demi-pas hélicoïdal de l'arrangement des fibrilles chitino-protéiques, c'est-à-dire une rotation de 180° (voir figures 10 et 11). Une ou plusieurs cellules (s) se trouvent à la base de chaque poil et d'autres cellules (s) sont munies de canaux sécréteurs qui traversent même l'épicuticule [59].

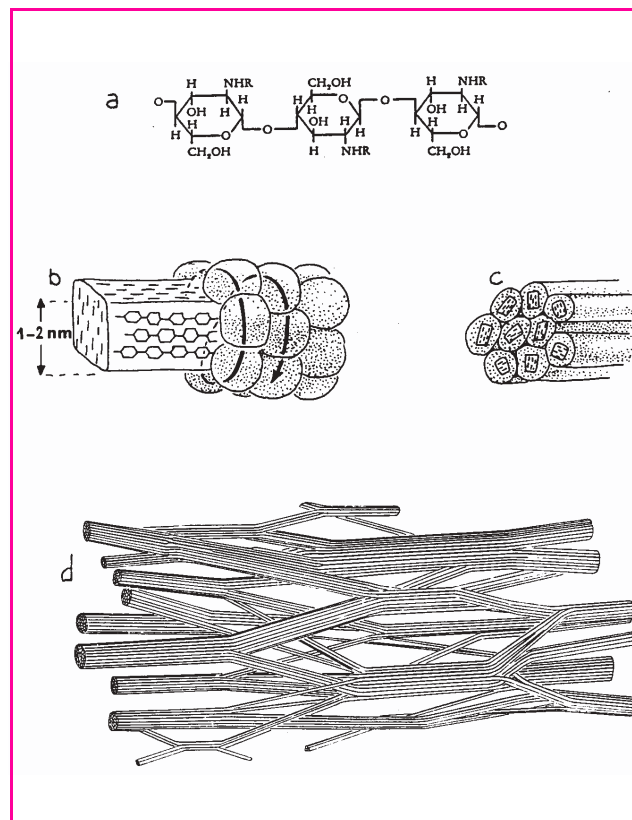


Figure 10.

a : Formule de la chitine, polysaccharide azoté, polymère d'acétylglucosamine ($R = \text{CH}_3\text{CO}-$ ou acétyle). b : Cristallite orthorhombique de chitine (filament) entouré de protéines agencées en hélice en formant une microfibrille (d'après [62]). c : Fibrilles résultant de l'association de quelques microfibrilles. d : Distribution des microfibrilles dans la couche principale des carapaces des crustacés supérieurs (le dessin est à dilater en longueur, pour une plus juste représentation mais, de cette façon, on voit mieux les branchements, d'après [36]).

Cet ensemble de l'épicuticule et de la couche pigmentaire est déposé avant la mue et constitue la carapace préexuviale. Elle est relativement mince par rapport à ce que sera la carapace définitive et elle est encore souple, mais non extensible dans les conditions physiologiques. Le crabe entreprend alors de se dépouiller de son ancienne carapace, et y parvient en ingérant des quantités d'eau suffisantes, ce qui le gonfle en dépliant la nouvelle carapace [65]. Les produits d'altération de l'ancienne carapace paraissent former un lubrifiant qui facilite la mue, dans son aspect « déshabillage ». Quand cette mue est terminée, la minéralisation de la nouvelle carapace complètement dépliée peut commencer, ce qui lui donne rapidement une consistance parcheminée, puis résistante, alors qu'un nouveau dépôt chitino-protéique débute avec une géométrie cholestérique, cette sécrétion étant à son tour rapidement stabilisée sous forme d'un réseau de fibrilles non fluides, avant d'être minéralisée. Pour les couches préexuviales ou postexuviales, c'est-à-dire déposées avant ou après la mue, le minéral est principalement du carbonate de calcium sous forme de calcite en général.

La carapace est doublement un composite, d'abord au niveau des baguettes de chitine localement parallèles, qui sont serties dans un ciment de protéines en formant divers types d'agrégats fibrillaires [61], selon leur localisation (figure 11).

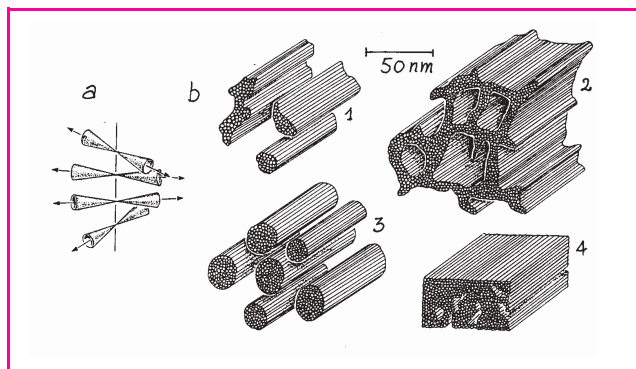


Figure 11.

a : La carapace, une fois débarrassée de sa matière calcaire par un acide ou un chélateur, devient souple ; elle est constituée de fibrilles chitino-protéiques qui suivent des orientations semblables à celles adoptées par les molécules dans les cristaux liquides cholestériques, mais le caractère liquide est aboli par des liaisons entre polymères, dont certaines sont covalentes. Cette géométrie comporte des orientations fibrillaires horizontales constantes à un même niveau, mais avec une rotation progressive dans le sens des aiguilles d'une montre, quand on s'élève dans l'épaisseur de la carapace (horizontal signifie ici parallèle au plan local de la carapace). Les cônes autour de chaque direction moyenne renferment localement 95 % au moins des orientations fibrillaires dans un proche voisinage du point considéré. **b** : Les divers types d'agrégation des microfibrilles observés dans la partie externe (1) et la partie profonde (2) de la (pi), ainsi que dans la (cp) et la (mb), en (3) et (4). La calcite se dépose dans les interstices libres de la trame organique, c'est-à-dire dans (pi) et (pr) et pratiquement pas dans (ep) et (mb) (d'après [66]).

De plus, l'espace restant libre entre ces agrégats est progressivement occupé par du carbonate de calcium, comme le montre la *figure 12* [59], généralement sous forme de calcite, ce qui est connu depuis longtemps (bibliographie dans [49, 65]), et confirmé par mes diagrammes de diffraction des électrons, sur coupe fine de carapace non déminéralisée, qui furent publiés par Neville [67]. Ces dépôts carbonatés peuvent aussi demeurer amorphes dans certaines régions. De plus, on a signalé parfois la présence de vaterite, une autre forme cristalline du carbonate de calcium. Les phosphates sont plus ou moins abondants, mais il existe certaines espèces de crustacés où ils sont majoritaires, notamment les cigales de mer. La minéralisation est souvent incomplète, notamment dans les parties profondes des prismes, en raison d'autres sécrétions organiques entre les fibrilles chitino-protéiques [68].

La carapace est pratiquement un mésopore, si l'on en juge par les distances séparant les fibrilles chitino-protéiques qui constituent le template, 50 nm environ dans la couche principale. La carapace est aussi un macropore en raison des prolongements cylindriques du cytoplasme épidermique qui la pénètrent, en traversant perpendiculairement les couches à géométrie cholestérique, mais certaines ramifications de ces prolongements cytoplasmiques ont la finesse des canaux de mésopores [60, 69].

En pratiquant des cupules d'érosion dans la carapace au moyen d'une fraise de dentiste, et en pénétrant jusque dans les niveaux post-exuviaux, nous avons observé après une dizaine de jours, que les canalicules des régions concernées véhiculaient des produits se déposant à la surface de la zone érodée, comme pour y reconstituer une épicuticule [69].

Ce composite méso- et macropore est organisé, avec une distribution précise des enzymes et des structures nécessaires à la minéralisation :

1- Des phosphatases alcalines sont localisées sous l'épicuticule [70], résultat que nous avons vérifié. Il s'agit des

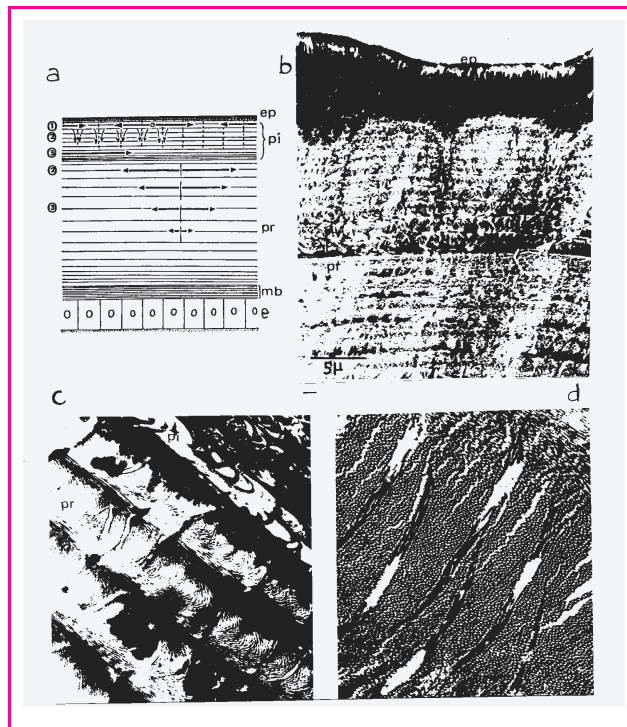


Figure 12 - Quelques aspects de la progression de la calcite au cours de la minéralisation d'une carapace de crabe (*Carcinus maenas*, MET, voir légendes dans la *figure 9*).

a : Trois stades ont été distingués : 1- immédiatement après la mue, quand la nouvelle cuticule s'est entièrement dépliée, on observe la croissance radiale de la calcite sous forme de disques sous l'épicuticule, à partir de centres plus ou moins dispersés ; 2- la minéralisation progresse le long des parois interprismatiques dans la (pi) et dans les couches les plus superficielles de la (pr) ; 3- la minéralisation se poursuit dans les couches profondes de la (pi) et progresse aussi dans la (pr). **b** : Coupe d'une cuticule en cours de minéralisation, au début du stade 2. L'épicuticule échappe à la minéralisation. Les cloisons interprismatiques sont progressivement recouvertes de calcite. **c** : Fin de la phase 2 observée en coupe à la limite des couches pré- et post-exuviales. Les couches cholestériques sont inclinées dans la micrographie de gauche à droite. **d** : Coupe de la (pr) intégralement minéralisée. Dans le milieu de la figure, les filaments chitino-protéiques apparaissent en section transversale sous forme de trous clairs par contraste avec la calcite beaucoup plus dense aux électrons. En haut à droite, ils sont en coupe oblique, en raison de la torsion cholestérique. L'axe hélicoïdal est dans le plan de la coupe selon la diagonale allant de bas en haut et de gauche à droite. Cette direction est suivie par les canaux cytoplasmiques, qui se trouvent ici entièrement cernés par le minéral. Barre : 1 μm (d'après [59]).

premières couches minéralisées et on sait que des phosphates bloquent facilement la croissance de la calcite. Ces phosphatases pourraient libérer les phosphates qui s'attachent au réseau de calcite et donc faciliter sa croissance [71].

2- Dans les couches préexuviales également, on trouve de l'anhydrase carbonique qui accélère la précipitation des carbonates et est localisée le long de parois prismatiques dont la position correspond aux limites des cellules épidermiques, comme si cette enzyme avait été sécrétée au niveau des jonctions entre cellules [70, 72].

3- Les fibrilles chitino-protéiques seraient semi-conductrices et interviendraient dans certains mécanismes électrochimiques de la minéralisation [73].

4- Le pas hélicoïdal de la matrice chitino-protéique introduit des dissymétries favorables à la formation de dislocations vis dans la calcite, un facteur de croissance du minéral [68], et il se trouve que les régions qui doivent être minéralisées au plus vite après la mue sont précisément celles où le pas

hélicoïdal est le plus petit, c'est-à-dire celles les plus fortement « twistées » (ou torsadées).

Les « templates » des mésopores et macropores biologiques

Nous avons rencontré jusqu'ici deux types de templates :

- soit des *molécules amphiphiles*, agrégées en micelles, en bicouches ou en des structures plus complexes,
- soit des *polymères*, qui fonctionnent comme des molécules amphiphiles, notamment certains bloc-copolymères.

Dans tous les cas, la géométrie de ces matériaux entre lesquels se fera la minéralisation est comparable à celle de *cristaux liquides*.

Pour ce qui est des systèmes biologiques, ces diverses situations sont peut-être réalisées, mais celles que nous avons rencontrées, et partiellement décrites, comportent uniquement des *membranes cellulaires* et des *polymères fibrillaires*, lesquels sont en grande partie assemblés au contact des membranes.

De plus, on peut s'interroger sur la situation *intracellulaire* ou *extracellulaire* des mésopores ou macropores biologiques. Une brève récapitulation des exemples montre que toutes ces formations sont séparées du cytoplasme par une bicouche membranaire. La situation extracellulaire est évidente pour les épines (ou soies) des vers marins chez les vers de terre. C'est le cas également des carapaces de crustacés, même si elles sont traversées par de fins prolongements cytoplasmiques des cellules de l'épiderme, puisque ces prolongements sont toujours limités par une bicouche de membrane cellulaire. On montrerait que la situation est comparable dans le tissu osseux des vertébrés.

Pour les structures squelettiques minéralisées des espèces unicellulaires, elles semblent localisées, au moins au début de leur formation, dans des vésicules membranaires closes, enfermées dans le cytoplasme, mais elles se trouvent parfois libérées à la surface de la cellule par fusion de la bicouche de la vésicule avec la membrane plasmique externe de la cellule. Les spicules d'invertébrés demeurent généralement intracellulaires, enfermés dans une vésicule intracytoplasmique, limitée elle-même par une membrane de type bicouche phospholipidique qui sert de template pour la forme externe du spicule. Parfois plusieurs cellules interviennent dans la formation d'un même spicule, notamment chez les spongiaires et les échinodermes, mais bien des choses restent à préciser au niveau cytologique au sujet des vésicules limitantes des spicules. Une trame organique fibrillaire est fabriquée au sein de ces vésicules chez les octocoralliaires, en formant un template interne de la structure du spicule, alors que la membrane de la vésicule constituera le template externe.

Les templates des mésopores biologiques ou des systèmes apparentés sont des cristaux liquides ou des analogues stabilisés. Leurs morphologies souvent complexes sont liées, comme pour les mésopores de synthèse, aux textures très élaborées de ces phases ordonnées. Il faut prendre en compte aussi la capacité des cellules à contrôler certaines étapes de la mise en place de ces matériaux, en raison notamment de la fluidité de ces systèmes aux premiers stades de leur sécrétion. L'intégration de ces matériaux en des fonctions très diversifiées devrait attirer l'attention des chercheurs, l'exemple de la carapace des crustacés étant très riche d'enseignement dans cette perspective, parce que ce composite de type mésopore intervient dans l'organisation de nombreux récepteurs sensoriels, tactiles,

chimiques, visuels, etc. Les cellules y prennent une part importante, par chimie douce et par une subtile biomécanique mettant en jeu des filaments qui déterminent la structuration et la motricité du cytoplasme (consulter à ce sujet ce qui concerne le cytosquelette dans les traités récents bien documentés et par exemple [74]). Les problèmes encore en suspens dans ce domaine concernent la coordination du fonctionnement du cytosquelette à l'intérieur de chaque cellule, mais aussi au niveau des populations cellulaires.

Perspectives

Les recherches ultérieures sur les mésopores seront donc inspirées en partie par les travaux sur les cristaux liquides et par les progrès concernant leurs analogues biologiques. A ce sujet, il faut rappeler que beaucoup de phases cristallines liquides sont métastables, ce qui ne simplifie pas les représentations des diagrammes de phases, et certaines d'entre elles ne sont accessibles qu'au terme d'un parcours défini au sein des diagrammes [42, 69, 75]. Ajouter une fraction minérale directement ou par l'intermédiaire d'un matériau hybride apporte un peu plus de complexité, mais les résultats n'en sont pas moins prometteurs.

On sait également que chaque phase ordonnée présente ses défauts propres, mais que les associations de défauts ou textures dépendent de la position du point représentatif du système dans le domaine de cette phase. On peut même distinguer des sous-domaines dans les diagrammes de phases correspondant à certaines textures. Les morphologies de mésopores étant essentiellement liées aux défauts et aux textures, les progrès exigeront peut-être beaucoup de patience, celle d'établir les diagrammes jusque dans les sous-domaines de certaines phases métastables.

Les mésopores peuvent servir de céramiques et s'intégrer à des dispositifs nano-électroniques, mais on peut les remplir aussi de certains médicaments. D'ici quelques années, les mésopores seraient donc de bons candidats pour constituer des nanoparticules, support de principes actifs, libérables de manière contrôlée, à proximité de cellules ou de tissus cibles, à soigner ou à éliminer. Cela suppose la mise au point aux nanoéchelles de mécanismes permettant de reconnaître certaines caractéristiques moléculaires des cibles et de provoquer au bon site et au bon moment la libération des principes actifs. Il s'agit encore d'une fiction.

Toute ma gratitude à plusieurs amis pour des discussions très utiles : les Professeurs J.-M. Devoisselle, J. Livage et S. Hyde, ainsi que les Docteurs H. Arribart, C. Charnay, M.-M. Giraud-Guille et C. Sanchez.

Références

- [1] Behrens P., Mesoporous inorganic solids, *Advanced Materials*, **1993**, 5, p. 127.
- [2] Attard G.S., Glyde J.C., Goltner C.G., Liquid crystalline templates for the synthesis of mesoporous silica, *Nature*, **1995**, 378, p. 366.
- [3] Göltner C.G., Antonietti M., Mesoporous materials by templating of liquid crystalline phases, *Advanced Materials*, **1997**, 9, p. 431.
- [4] Patarin J., Kessler H., Les chimistes jouent avec des polyèdres pour fabriquer des solides poreux : une percée dans les trous, *La Recherche*, sept. **2000**, 334, p. 18.
- [5] Sanchez C., Lebeau B., Patarin J., Structures à base inorganique, Chap. VIII, p. 151, *Biomimétisme et Matériaux*, OFTA, Arago 25, Masson, Paris, **2001**.
- [6] van Meerssche M., Feneau-Dupont J., *Introduction à la Cristallographie et à la Chimie Structurale*, Peeters, Louvain, 3^e éd., **1984**.
- [7] Curl R., Smalley R., Les fullerènes, *Pour la Science*, déc. **1991**, 170, p. 46.

- [8] Iijima S., Helical micotubules of graphite carbon, *Nature*, **1991**, 354, p. 56.
- [9] Terrones M., Grobert N., Olivares J., Zhang J.P., Terrones H., Kordatos K., Hsu W.K., Hare J.P., Townsend P.D., Prassides K., Cheetham A.K., Kroto H.W., Walton D.R.M., Controlled production of aligned-nanotube bundles, *Nature*, **1997**, 338, p. 52.
- [10] Lenosky T., Gonze X., Teter M., Elser V., Energetics of negatively curved graphitic carbon, *Nature*, **1992**, 355, p. 333.
- [11] Yang H., Coombs N., Sokolov I., Ozin G.A., Free-standing and oriented mesoporous silica films grown at the air-water interface, *Nature*, **1996**, 381, p. 589.
- [12] Oliver S., Kuperman A., Coombs N., Lough A., Ozin G., Lamellar aluminophosphates with surface patterns which mimic diatom and radiolarian microskeletons, *Nature*, **1995**, 378, p. 47.
- [13] Bouligand Y., Les soies et les cellules associées chez deux annélides polychètes, *Zeitschrift für Zellforschung*, **1967**, 79, p. 332.
- [14] Sanchez C., Babonneau F., Chimie des matériaux hybrides élaborés par la méthode sol-gel, *Matériaux Hybrides*, C. Sanchez éd., OFTA, Masson, Paris, **1996**, p. 33.
- [15] Livage J., Procédés sol-gel et biologie, *Matériaux Hybrides*, C. Sanchez éd., OFTA, Masson, Paris, **1996**, p. 299.
- [16] Grosso D., Balkenende A.R., Albouy P.A., Lavergne M., Mazerolles L., Babonneau F., Highly oriented 3-D hexagonal silica thin films produced with cetyltrimethylammonium bromide, *J. Mater. Res.*, **2000**, 10, p. 2085.
- [17] Yang H., Kuperman A., Coombs N., Mamiche-Afara S., Ozin G.A., Synthesis of oriented films of mesoporous silica on mica, *Nature*, **1997**, 379, p. 703.
- [18] Yang H., Coombs N., Ozin I., Ozin G.A., Morphogenesis of shapes and surface patterns in mesoporous silica, *Nature*, **1997**, 386, p. 692.
- [19] Bouligand Y., Geometry of (non smectic) hexagonal mesophases, *J. Physique, Paris*, **1980**, 41, p. 1297 ; Defects and textures of hexagonal discotics, *J. Physique, Paris*, **1980**, 41, p. 1307.
- [20] Ozin G.A., Kresge C.T., Yang H., Nucleation, growth and form of mesoporous silica. Role of defects and a language of shape, *Studies in Surface Science and Catalysis*, **1998**, 117, p. 119.
- [21] Yang H., Coombs N., Ozin G.A., Thickness control and defects in oriented mesoporous silica film, *J. Material Chemistry*, **1998**, 8, p. 1205.
- [22] Yang H., Ozin G.A., Kresge C.T., The role of defects in the formation of mesoporous silica, *Advanced Materials*, **1998**, 10, p. 883.
- [23] Sokolov I., Yang H., Ozin G.A., Kresge C.T., Radial patterns in mesoporous silica, *Advanced Materials*, **1999**, 11, p. 637.
- [24] S. Schacht, Q. Huo, I.G. Voigt-Martin, G.D. Stucky & F. Schüth, Oil-water interface templating of mesoporous macroscale structures, *Science*, **1996**, 273, p. 768.
- [25] Braun P.V., Osenar P., Stupp S.I., Semiconducting superlattices templated by molecular assemblies, *Nature*, **1996**, 380, p. 325.
- [26] Unger K., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1983**, 9 (1, 2), p. 69.
- [27] Vallet-Regi M., *Chem. Mat.*, **2001**, 13(2), p. 308.
- [28] Mann S., Ozin G.A., Synthesis of inorganic materials with complex form, *Nature*, **1996**, 382, p. 313.
- [29] Livage J., Le mariage du verre et du vivant, *La Recherche*, mai **2001**, 342, p. 4.
- [30] Livage J., Chimie douce: from shake-and-bake processing to wet chemistry, *New J. Chem.*, **2001**, 25, p. 1.
- [31] Arribart H., Bensaude-Vincent B., Les beautés du vivant défient les chimistes, *La Recherche*, nov. **1999**, 325, p. 56.
- [32] Bensaude-Vincent B., Arribart H., Bouligand Y., Sanchez C., Chemists and the school of nature, *New J. Chem.*, **2002**, 26, p. 1.
- [33] Muth O., Schellbach C., Froba M., Triblock copolymer assisted synthesis of periodic mesoporous organosilicas (PMOs) with large pores, *Chem. Commun. (Camb)*, **2001**, 7(19), p. 2032.
- [34] Bouligand Y., Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases, *Tissue & Cell*, **1972**, 4, p. 189.
- [35] Bouligand Y., Recherches sur les textures des états mésomorphes, série de six articles, *J. Physique, Paris*, **1972**, 33, p. 525 et p. 715 ; **1973**, 34, p. 603 et p. 1011 ; **1974**, 35, p. 215 et p. 959.
- [36] Bouligand Y., Defects and textures in cholesteric analogues given by some biological systems, *J. Physique, Paris*, **1975**, 36, C1, p. 331.
- [37] Bouligand Y., Liquid crystals and their analogs in biological systems, *Solid State Physics*, **1978**, Suppl. 14, p. 259.
- [38] Bouligand Y., Liquid crystalline order in biological materials, *Liquid Crystalline Order in Polymers*, A. Blumstein éd., Acad. Press, **1978**, Chap. 8, p. 261.
- [39] Bouligand Y., Potentialités biomimétiques des défauts et textures, *Biomimétisme et Matériaux*, Chap. XI, OFTA, Masson, Paris, **2001**, Arago 25, p. 281.
- [40] *Silicon and siliceous structures in biological systems*, S.T.L. Simpson, B.E. Volcani eds., Springer Verlag, N.-Y., Heidelberg, Berlin, **1981**.
- [41] Coradin T., *Biomimétisme et Matériaux*, C. Sanchez éd., OFTA, Arago 25, Masson, Paris, **2001**.
- [42] Bouligand Y., Remarks on the geometry of micelles, bilayers and cell membranes, *Liquid Crystals*, **1999**, 26, p. 501.
- [43] Haeckel E., Die Radiolarien (Rhizopoda Radiata), eine Monographie, G. Reimer, Berlin, **1862** ; voir aussi *Radiolaria, The Voyage of H.M.S. « Challenger »*, **1887**.
- [44] Kroger N., Bergsdorf C., Sumper M., A new calcium binding glycoprotein family constitute a major diatom cell wall component, *EMBO J.*, **1994**, 13, p. 4676.
- [45] Kroger N., Bergsdorf C., Sumper M., Frustulins: domain conservation in a protein family associated with diatoms cell walls, *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 239, p. 259.
- [46] Kroger N., Wetherbee R., Pleuralins are involved in theca differentiation in the diatom, *Cylindrotheca fusiformis*, *Protist.*, **2000**, 151, p. 263.
- [47] Kroger N., Deutzmann R., Bergsdorf C., Sumper M., Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2000**, 97, p. 14133.
- [48] Kroger N., Deutzmann R., Sumper M., Silica precipitating peptides from diatoms: the chemical structure of silaffin-1A, *Cylindrotheca fudiformis*, *J. of Biol. Chem.*, **2001**.
- [49] Prenant M., Les formes minéralogiques du calcaire chez les êtres vivants et le problème de leur déterminisme, *Biological Reviews*, **1927**, 2, p. 365.
- [50] *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants*, N. Watabe, K.M. Wilbur eds, Univ. South Carolina Pr., **1976**.
- [51] *Biological Mineralization and Demineralization*, Dahlem conferences, G.H. Nancollas ed., Springer Verlag, **1981**.
- [52] Mann S., Parker S.B., Ross M.D., Skarnulis A.J., Williams R.J.P., The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ear: an ultra-high resolution electron microscope study, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **1983**, 218, p. 415.
- [53] Parker S.B., Skarnulis A.J., Westbroek P., Williams R.J.P., The ultrastructure of coccoliths from the marine alga *Emiliana huxleyi* (Lohman) Hay and Mohler: an ultra-high resolution electron microscope study, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **1983**, 219, p. 111.
- [54] *Biomimétisme et Matériaux*, C. Sanchez éd., OFTA, Arago 25, Masson, Paris, **2001**.
- [55] David B., Néraudeau D., La symétrie d'ordre cinq des échinodermes, *Revue du Palais de la Découverte*, oct. **1994**, 23, n° 221, p. 69.
- [56] Nyssen H.-U., Crystal orientation and plate structure in echinoid skeletal units, *Science*, **1969**, 166, p. 1150.
- [57] Günning B.E.S., The greening process in plastids. 1. The structure of the prolamellar body, *Protoplasma*, **1965**, 60, p. 111.
- [58] Bouligand Y., Geometry and topology of cell membranes, *Geometry in Condensed Matter Physics*, J.F. Sadoc éd., World Scientific, **1990**, p. 193.
- [59] Bouligand Y., Aspect ultrastructuraux de la calcification chez les crabes, *7^e Cong. internat. de microscopie électr.*, Grenoble, **1970**, 3, p. 105.
- [60] Compère P., Goffinet G., Ultrastructural shape and three dimensional organization of the intracuticular canal systems in the mineralized cuticle of the green crab, *Tissue & Cell*, **1987**, 19, p. 839.
- [61] Giraud-Guille M.-M., Chanzy H., Vuong R., Chitin crystals in arthropod cuticles revealed by diffraction contrast transmission electron microscopy, *J. of Structural Biology*, **1990**, 103, p. 232.
- [62] Blackwell J., Weih M.A., Structure of chitin-protein complexes: ovipositor of the ichneumon fly, *Megarhyssa*, *J. Mol. Biol.*, **1980**, 137, p. 49.
- [63] Bouligand Y., Sur une architecture torsadée répandue en de nombreuses cuticules d'arthropodes, *C.R. Acad. Sci., Paris*, **1965**, 261, p. 3665.
- [64] Revol J.F., Marchessault R.H., *In vitro* chiral nematic ordering of chitin crystallites, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1993**, 15, p. 339.
- [65] Drach P., Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés décapodes, *Ann. Inst. Océan., Paris (N.S.)*, **1939**, 19, p. 3.
- [66] Giraud-Guille M.-M., Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle, *Tissue & Cell*, **1984**, 16, p. 75.
- [67] Neville C.A., *Biology of the Arthropod Cuticle*, Springer Verlag, **1975**.
- [68] Giraud-Guille M.-M., Bouligand Y., Crystal growth in a chitin matrix, the study of calcite development in the crab cuticle, *Chitin World*, Karnicki et al. eds, Neue Wissenschaft Verlag, **1994**, p. 136.
- [69] Bouligand Y., Problèmes de morphogenèse cuticulaire chez les crustacés, *Aspects Récents de la Biologie des Crustacés, IFREMER Actes de Colloques*, **1988**, 8, p. 13.
- [70] Travis D.F., The deposition of skeletal structures in Crustacea, *Acta Histochemica*, **1963**, 15, p. 251 ; p. 269 ; **1965**, 20, p. 193.
- [71] Simkiss K., Phosphates as crystal poisons, *Biol. Rev.*, **1964**, 34, p. 487.
- [72] Giraud-Guille M.-M., Carbonic anhydrase activity in the integument of the crab *Carcinus maenas* during the intermolt cycle, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1981**, 69A, p. 381.
- [73] Digby P.S.B., Calcification and its mechanism in the shore crab, *Proc. Linn. Soc., London*, **1967**, 178, p. 129.
- [74] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., *Molecular Biology of the Cell*, Trad. française dirigée par N. Butor, 3^e éd., Médecine-Sciences Flammarion, **2000**.
- [75] Gray G.W., *Molecular Structure and the Properties of Liquid Crystals*, Academic Press, London, **1962**.



Yves Bouligand

dirige le Laboratoire d'histophysique et de cytophysique*.

* Histophysique et cytophysique, École pratique des hautes études et INSERM, 10 rue André Bocquel, 49100 Angers et 12 rue Cuvier, 75005 Paris.

Tél. : 02 41 73 59 04.

E-mail : bouligand@ibt.univ-angers.fr