

Étude de mécanismes de biominéralisation

Rôle des protéines et des polymères adsorbés ou en solution dans la nucléation et la croissance cristalline de matériaux inorganiques d'intérêt biologique

Vincent Ball et Jean-Claude Voegel

Abstract **Role of adsorbed or solubilized proteins and polymers in the crystal growth of biologically relevant inorganic materials**

After a description of the physicochemical backgrounds needed to study the nucleation and crystal growth kinetics, the main crystals appearing in the biological world will be described with particular emphasis on the calcium carbonates and phosphates. The second chapter of this article is aimed to overview the main experimental methods used up to now to measure the nucleation and crystal growth kinetics. Finally, we summarize the general rules which govern the growth kinetics and the final morphology of crystals grown in presence of biopolymers. Two examples from the recent literature will be described in more detail.

Mots-clés **Croissance cristalline, nucléation, biopolymères.**

Key-words **Crystal growth, nucleation, biopolymers.**

Le but de cet article est de décrire l'état des connaissances actuelles des mécanismes d'action des polymères synthétiques ou des biopolymères dans la nucléation et la croissance cristalline de minéraux d'intérêt biologique. On envisagera deux types de situations : le polymère libre en solution aqueuse ou à l'état adsorbé à une interface. Nous serons également amenés à discuter le rôle joué par des systèmes moléculaires organisés tels que des vésicules lipidiques qui constituent un modèle approché des matrices extracellulaires employées par les organismes vivants [1]. Volontairement, les aspects purement biologiques tels que la description de l'ultrastructure des cellules impliquées ne seront pas abordés ici. Nous essayerons plutôt de décrire le **mécanisme d'action** des biopolymères synthétisés par ces cellules et leur emploi éventuel pour la préparation de matériaux biocompatibles. Cette description se situera donc à deux niveaux :

- l'influence des polymères sur la taille et la morphologie des cristaux obtenus ;
- l'influence des polymères sur la cinétique de formation des cristaux, c'est-à-dire sur la nucléation de germes de croissance, sur la cinétique de croissance et sur la cessation de croissance.

Biominéralisation et polymères

Définitions

La biominéralisation est le domaine de la science, à l'interface de la physique, de la chimie et de la biologie, qui étudie la formation et la structure des cristaux que l'on rencontre dans les organismes vivants [2].

La formation d'une phase minéralisée impose la réalisation successive des trois étapes suivantes :

- (i) la formation d'**au moins un germe de croissance stable** ;

- (ii) la **croissance** de ces germes et leur fusion éventuelle ;
- (iii) la **cessation de croissance** et éventuellement la **maturation des phases formées** afin d'aboutir à la phase la plus stable si, bien sûr, il y a existence de polymorphisme. Le suivi de ces changements de phase successifs est un problème très délicat du point de vue expérimental, surtout si leur durée de vie est brève. C'est le cas des cristaux formés par les organismes vivants, surtout les phosphates et les carbonates de calcium.

La *figure 1* montre un exemple de cristal de nacre formé par le mollusque *Monodonta labio*. Il est évident, à partir de cette image de microscopie électronique à balayage, que l'obtention d'une morphologie déterminée nécessite non seulement un contrôle des paramètres physiques, tels que l'activité des ions, leur transport et leur adsorption sur le germe de croissance, mais encore la **formation d'un espace confiné** qui limite la formation du cristal. C'est le rôle de nombreux biopolymères qui jouent un rôle non seulement structural mais également un rôle fonctionnel. Nous allons approfondir ces différents points dans la suite de cet article. Il est admirable qu'il ait déjà été possible de reproduire *in vitro* des structures telles que celles représentées sur la *figure 1* par dépôt de films minces de chitosan (de la chitine, c'est-à-dire un polysaccharide déacétylé) [4]. Il s'agit là d'un exemple de biomimétisme. Mais avant de décrire les mécanismes d'action des polymères, il nous faut rappeler quelques généralités sur la croissance cristalline.

Généralités sur la croissance cristalline

Pour induire la croissance cristalline, il faut d'abord former un germe stable : c'est l'étape de **nucléation**. Par germe stable, on entend une particule solide dont la vitesse de croissance est supérieure à la vitesse de dissolution. La condition thermodynamique de formation d'une nouvelle phase à partir

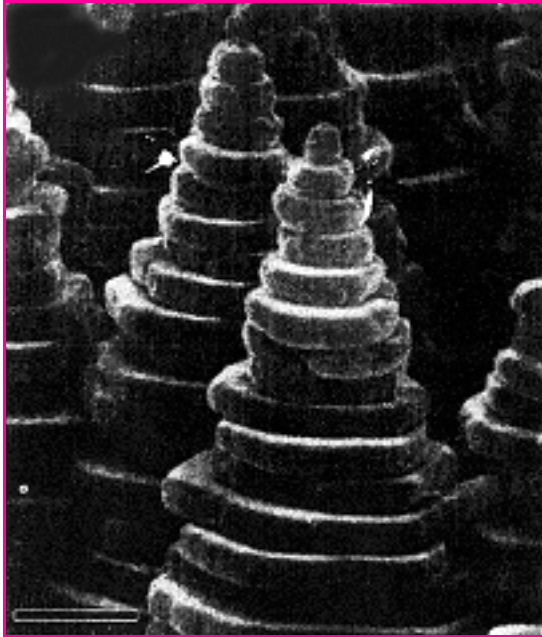


Figure 1 - Empilement de cristaux d'aragonite (CaCO_3) de la couche de nacre de *Monodonta labio*. La barre horizontale représente 2,5 μm [3].

d'un milieu homogène est que la variation d'enthalpie libre accompagnant le processus, à température et pression constantes, soit négative. C'est une condition nécessaire d'évolution spontanée du système, mais sa réalisation n'implique pas nécessairement l'observation du changement de phase escompté. Il faut encore que la cinétique du processus soit suffisamment rapide. Dans le cas de la croissance cristalline, la formation de liaison ionique entre ions se traduit par une diminution de l'enthalpie du système (avec cependant l'existence de plusieurs termes de signe opposé) et par une augmentation de l'entropie du système (augmentation des degrés de liberté des molécules de solvant libérées) : c'est un processus favorable pourvu que la diminution d'énergie libre associée soit supérieure (en valeur absolue) à l'augmentation d'énergie associée à la création d'une interface cristal-liquide. Ce terme énergétique dépend de la surface de l'interface formée et de la tension superficielle γ de l'interface considérée, c'est-à-dire de l'énergie d'adhésion de deux surfaces macroscopiques identiques. Si nous considérons une particule sphérique, en l'absence de toute contamination (qui peut abaisser la valeur de γ), alors la variation globale d'enthalpie libre aboutissant à une particule de rayon r vaut :

$$\Delta G_r = 4\pi r^2 \cdot \gamma - 4/3\pi r^3 [\Delta G_v / V_m] \quad (1)$$

où ΔG_v représente la variation d'enthalpie libre totale associée au changement de phase et V_m , le volume molaire de la nouvelle phase.

L'équation (1) constitue le point de départ de la théorie de la **nucléation homogène**. La **nucléation hétérogène** fait intervenir des particules d'une nature différente de celle de la phase que l'on désire former. On distingue également le phénomène de **nucléation secondaire** où les particules introduites sont de même nature que celles de la phase que l'on désire promouvoir. La forme générale de l'équation (1), ainsi que l'évolution de ses deux termes en fonction de r , sont représentées sur la *figure 2*.

On voit que ΔG_r atteint un maximum pour une valeur critique du rayon r^* qui est obtenue en différentiant (1) par rapport à r et en égalant la dérivée à zéro, soit :

$$r^* = (2 \cdot \gamma \cdot V_m) / \Delta G_v \quad (2)$$

Cela signifie que si les fluctuations thermodynamiques conduisent à la formation d'une particule sphérique de rayon r , deux cas sont possibles :

- si $r < r^*$: ΔG_r est positif, la particule se dissout spontanément et l'effet de la fluctuation est supprimé ;
- si $r > r^*$: ΔG_r est négatif et le « germe » peut grossir avec une diminution de l'énergie libre du système.

La condition nécessaire pour la formation d'une particule de taille critique est la mise à disposition d'une enthalpie libre d'activation :

$$\Delta G_r^* = (16\pi \cdot \gamma^3 \cdot V_m) / (3\Delta G_v^2) = 4/3\pi \cdot \gamma \cdot (r^*)^2 \quad (3)$$

On voit que cette enthalpie libre d'activation dépend de la tension superficielle de l'interface formée. Comment faire pour atteindre cette valeur critique de l'enthalpie d'activation et donc celle du rayon critique, sans « tricher », c'est-à-dire sans modification de la valeur de γ ?

Revenons à la définition générale de ΔG_r pour l'équilibre suivant :



où A^+ et X^- sont le cation et l'anion participant à la formation du cristal AX (pris monovalents pour simplifier les équations ! Mais fondamentalement, les équations ont une constitution identique pour des sels de type $A_m X_n$).

On a donc :

$$\Delta G_r = \Delta G^\circ + RT \cdot \ln[a_{AX} / (a_A \cdot a_X)] \quad (5)$$

or $a_{AX} = 1$, car AX est considéré comme un constituant pur.

Si l'on pose :

- $a_A \cdot a_X = IP$, **produit ionique** de la solution. Notons un point très important à ce niveau : le calcul de IP peut s'avérer particulièrement délicat puisqu'il nécessite le calcul du

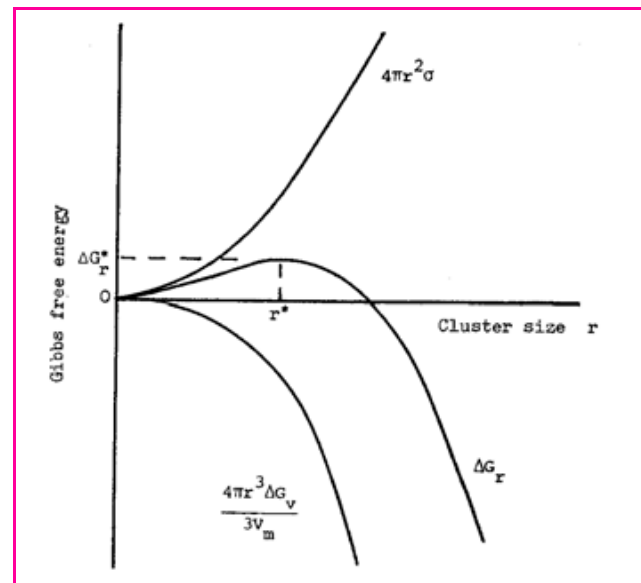


Figure 2 - Enthalpie libre d'un « cluster » atomique en fonction de son rayon.

Le terme en r^2 représente l'enthalpie libre de surface et celui en r^3 l'enthalpie libre de volume (reproduit de [5]).

coefficient d'activité de chaque ion (attention à la formule utilisée : pour des forces ioniques typiques de 0,1 à 0,2 M dans les milieux biologiques, la version de la formule de Debye-Hückel corrigée par Davies est bien adaptée [6]), ainsi que la connaissance de tous les équilibres auxquels cet ion participe. En particulier, les équilibres d'association d'ions ou de complexation peuvent jouer un grand rôle.

- Et $\Delta G^\circ = RT \cdot \ln[K_{sp}]$, où K_{sp} est appelé « produit de solubilité de AX », alors l'équation (5) devient :

$$\Delta G_r = -RT \cdot \ln[IP/K_{sp}] \quad (6)$$

$$\text{ou encore : } \Delta G_r = -RT \cdot \ln S \quad (7)$$

où S désigne la **sursaturation** de la solution par rapport à la phase solide considérée. La condition thermodynamique pour la formation de germes stables s'écrit donc :

$$S \geq 1 \text{ ou } IP \geq K_{sp}$$

Faisons maintenant l'hypothèse, fondamentale, que l'enthalpie libre d'activation pour la formation d'un germe stable s'écrit de manière analogue à l'équation (7) moyennant un changement de signe, c'est l'hypothèse de Gibbs-Thomson :

$$\Delta G_r^* = RT \cdot \ln S = 2V_m \cdot \gamma / r^* \quad (8)$$

où le dernier membre de (8) provient de l'équation (2).

$$\text{D'où : } \Delta G_r^* = 4/3\pi \cdot \gamma \cdot (r^*)^2 = (16\pi/3) \cdot (V_m/RT)^2 \cdot \gamma^3 \cdot 1/(\ln S^*)^2 \quad (9)$$

L'équation (9) est l'équation fondamentale de la théorie de la nucléation homogène, elle montre clairement que si on ne peut pas réduire la valeur de γ , **alors il faut augmenter S**.

Le lecteur intéressé par de plus amples détails concernant la théorie de la nucléation homogène pourra se reporter à des articles [7] et des ouvrages de référence [8].

Du point de vue de la cinétique de nucléation, la vitesse de formation de germes stables est reliée à l'enthalpie libre d'activation selon une loi de type Arrhenius [9] :

$$J = k_n \cdot \exp(-\Delta G_r^*/RT) = k_n \cdot \exp[-(16\pi/3) \cdot V_m^2 \cdot (\gamma/RT)^3 \cdot 1/(\ln S)^2] \quad (10)$$

où J est le nombre de germes stables formés par unité de temps et par unité de volume.

L'évolution de J avec S est représentée sur la *figure 3* pour la nucléation homogène et hétérogène : on observe que la vitesse de nucléation, dans les deux cas de figure considérés, n'atteint une valeur observable que si :

$$S > S^* \quad (11)$$

S^* est appelée la **sursaturation critique**, la valeur de S à partir de laquelle des germes stables peuvent effectivement être observés. La différence essentielle entre la nucléation homogène et hétérogène réside dans le fait que dans ce dernier type de mécanisme, on introduit des substances qui induisent une réduction de la valeur de γ . Il faut remarquer que la tension superficielle de l'interface intervient à la puissance 3 dans l'équation (10).

Dans le cas de la nucléation hétérogène, la région métastable, où le système d'ions libres en solution est instable du point de vue thermodynamique mais ne précipite pas spontanément, est donc beaucoup plus étroite que pour la nucléation homogène.

Dans notre étude du rôle des biopolymères dans la nucléation et la croissance cristalline de cristaux d'intérêt biologique, nous nous trouverons principalement dans des systèmes hétérogènes. De façon courante, il est

extrêmement difficile de définir les conditions favorables à la nucléation homogène : cela revient à constituer un système sans aucune impureté !

Notons que dans tous les cas de figure, l'existence d'une vitesse finie de nucléation entraîne l'existence d'un **temps d'induction** τ tel que :

$$\tau \propto 1/J \quad (12)$$

En pratique, la mesure de τ est extrêmement délicate, car une fois un germe stable formé, la vitesse de croissance peut être très rapide et rendre la nucléation difficilement détectable. Cette vitesse de croissance peut dépendre [10] :

- du transport des ions vers la face cristalline en croissance (rôle important du champ magnétique [11], du champ électrostatique, de la présence de convection) ;

- de la vitesse d'adsorption des ions sur la face cristalline en question : ce phénomène dépend fortement du champ électromagnétique local exercé par la face cristalline considérée et de la présence d'agents qui entrent en compétition avec les ions pour les sites d'adsorption du support ;

- de la vitesse de déshydratation des ions et donc en particulier de la nature du solvant (il peut y avoir de grandes différences selon la nature des contre-ions et le changement H_2O en D_2O peut également avoir des effets très marqués) ;
- de la présence de défauts tels des joints de grain, des dislocations, etc.

Les lois cinétiques correspondantes ont été explicitées [10, 12].

Pour en revenir à la nucléation, il faut signaler que le facteur pré-exponentiel de l'équation (10) qui est homogène à une fréquence doit dépendre de la sursaturation, puisque la fréquence de collisions efficaces doit être fonction de l'activité des ions. Il a été démontré que (10) et (12) peuvent s'écrire sous la forme [12] :

$$\tau = A \cdot (S-1)^{-3/4} \cdot S^{-1/4} \cdot \exp[(16\pi/3) \cdot V_m^2 \cdot (\gamma/RT)^3 \cdot 1/(\ln S)^2] \quad (13)$$

Ainsi, si l'on réussit à mesurer τ pour différentes sursaturations (avec $S > S^*$), un tracé de $\ln[\tau \cdot S^{1/4} \cdot (S-1)^{3/4}]$ en fonction de $1/(\ln S)^2$ permet d'obtenir la valeur de la tension superficielle de l'interface γ . On peut donc **estimer l'impact du biopolymère** sur le phénomène de nucléation. Mais ce point est particulièrement délicat car il suppose non seulement une mesure précise de τ , mais encore que la

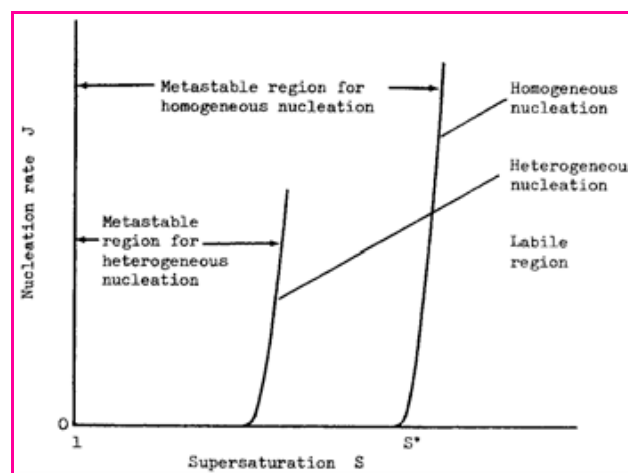


Figure 3 - Vitesse de nucléation en fonction de la sursaturation pour la nucléation homogène et hétérogène (reproduit de [5]).

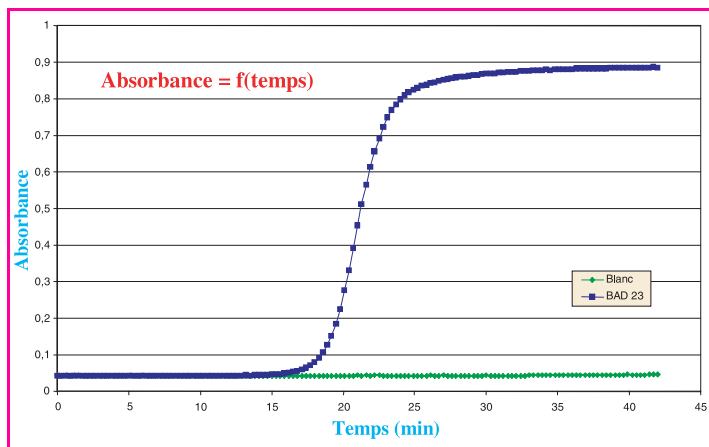


Figure 4 - Suivi de la croissance de phosphates de calcium par mesure de la turbidité à $\lambda = 500$ nm en présence de molécules de bisamidines.

La concentration en ions calcium et phosphates est de 6 mM, en présence de tampon TRIS (pH = 6,85) et de chlorure de sodium à 150 mM. La concentration en bisamidines rajoutées à la solution sursaturée à $t = 0$ est égale à $2,8 \cdot 10^{-4}$ M (reproduit de [14]).

théorie cinétique donnant l'expression de k_n en fonction de S est valable. De plus, il faut noter que même pour des expériences de nucléation hétérogène, on a tendance à utiliser les expressions théoriques établies pour la nucléation homogène. Cela induit de nombreuses discussions, voire des points de conflit. Il faut reconnaître cependant que la théorie de la nucléation hétérogène n'en est qu'à l'état de balbutiements. Volontairement, nous ne discutons pas ici des relations permettant d'estimer la taille des germes à partir des valeurs de τ , car ces relations font également le point de nombreux débats. Le lecteur intéressé pourra consulter les références [10] et [12]. Nous reviendrons sur l'utilisation de l'équation (13) dans le chapitre consacré aux mécanismes de minéralisation pour l'étude de la nucléation de phosphates de calcium sur des films de polyélectrolytes adsorbés à une interface silice-liquide.

Pour finir, notons que la mesure de τ dépend de la sonde de mesure utilisée ! Il s'agit en effet de détecter des germes de très petite taille à l'aide d'un rayonnement électromagnétique. Or, l'intensité diffusée dépend (dans le régime de Rayleigh, i.e. pour $r^* \ll \lambda$) de $1/\lambda^4$! Ainsi, on sera beaucoup plus sensible aux petites particules à des longueurs d'onde de travail plus faibles. Mais on risque alors d'être confronté à de l'absorption par le solvant ou par les ions présents en solution. L'utilisation de la diffusion des RX pose aussi un problème lié au temps d'accumulation élevé. En bref, c'est un problème délicat à résoudre. La figure 4 illustre l'utilisation d'un simple spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500 nm pour l'étude qualitative du rôle des molécules de bisamidine [13] dans la nucléation et la croissance cristalline des phosphates de calcium. Le temps d'induction τ est en général défini par l'intersection de la tangente à la courbe expérimentale au point d'inflexion (le point où la dérivée seconde du signal s'annule) avec l'axe des temps. Dans le cas de l'exemple de la figure 4, on obtient $\tau = (17 \pm 1)$ min en présence de bisamidine à $2,8 \cdot 10^{-4}$ M, alors qu'en l'absence de ces molécules le temps d'induction pour la germination est supérieur à 180 min dans la solution sursaturée d'un facteur 25 par rapport à l'hydroxyapatite.

Cette observation suggère que les bisamidines, connues pour former des chaînes linéaires en présence d'ions phosphate [13] (en solvant organique), permettent la

nucléation des phosphates de calcium. Cette augmentation de turbidité n'est pas observée en présence des seuls ions phosphate. Les particules formées ont des morphologies semblables aux phosphates de calcium des tissus osseux (plaquettes de $100 \times 50 \times 10$ nm environ) et leur rapport Ca/P est de l'ordre de 1,50. La caractérisation de la phase formée a montré qu'il s'agit d'une hydroxyapatite déficiente en Ca^{2+} et dont la neutralité est assurée par les molécules de bisamidines qui sont chargées positivement dans les conditions de pH de cette étude.

Dans les deux paragraphes suivants, nous explicitons l'importance des phases minéralisées dans les organismes vivants ; nous donnerons quelques détails concernant les propriétés des carbonates et des phosphates de calcium en raison de leur importance particulière. Enfin, nous donnons une brève description des principales difficultés expérimentales rencontrées lors de l'étude de la nucléation et de la croissance cristalline en présence de polymères ou d'assemblées moléculaires organisées.

Systèmes minéraux relevant pour la biologie

Les minéraux importants pour les systèmes biologiques sont à répartir dans trois catégories selon l'utilisation qui en est faite par les organismes [15] disposant de systèmes cellulaires capables de synthétiser de telles phases minérales à partir d'ions inorganiques :

a. Les cristaux ayant un rôle mécanique : les phosphates de calcium chez les vertébrés (os, dents), les carbonates de calcium chez les invertébrés (oursin, moule, coquillages), et les silicates chez de nombreux végétaux.

b. Les cristaux ayant un rôle de stockage et d'élimination d'ions toxiques : le fer III est ainsi stocké au sein de la cavité creuse d'une protéine spécialisée, l'apoferritine [16], constituée d'un assemblage de 24 sous-unités protéiques. Cette protéine est présente aussi bien chez les bactéries que dans le monde animal et stocke le fer sous forme de ferrihydrite ($5 \text{Fe}_2\text{O}_3, 9 \text{H}_2\text{O}$) en présence d'une quantité variable d'ions phosphate. Notons que le fer III utile est véhiculé dans le plasma sous forme d'un ion complexe au sein d'une protéine hydrosoluble : la transferrine.

On peut citer également diverses formes de sels de calcium, comme les oxalates de calcium qui interviennent dans la constitution des calculs rénaux.

c. Les systèmes magnétiques : ils jouent un rôle très important pour le déplacement des bactéries magnétostatiques et de certains oiseaux migrateurs [17].

Au total, plus d'une soixantaine d'espèces minéralisées ont été identifiées parmi les organismes vivants ou les fossiles de la biosphère terrestre [15].

Notons également qu'un grand nombre d'organismes animaux vivant dans les régions polaires sont munis de protéines jouant un rôle inhibiteur de la croissance cristalline de la glace (« antifreeze proteins ») [18-19].

Dans notre description du rôle des polymères sur la nucléation et la croissance cristalline, nous nous limiterons volontairement aux phosphates de calcium et aux carbonates de calcium. Ces phases cristallines sont particulièrement intéressantes car elles présentent toutes un polymorphisme caractéristique. Les carbonates de calcium peuvent exister sous forme de calcite ($K_{sp} = 3,31 \cdot 10^{-9}$), d'aragonite ($K_{sp} = 4,61 \cdot 10^{-9}$) et de vaterite ($K_{sp} = 1,22 \cdot 10^{-9}$) dans l'ordre de solubilité croissante et donc de stabilité décroissante.

Tableau I - Les phosphates de calcium [20].

Nom	Abréviation (anglaise)	Formule empirique	Rapport Ca/P	Produit de solubilité (298 K, pH = 7)
Brushite ou phosphate dicalcique dihydraté	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	$2,37 \cdot 10^{-7}$
Phosphate dicalcique anhydre	DCPA	CaHPO_4	1,0	$9,2 \cdot 10^{-7}$
Phosphate octacalcique	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	$5 \cdot 10^{-50}$
Phosphate tricalcique β	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	$2,8 \cdot 10^{-29}$
Hydroxyapatite	OHAP	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1,67	$1,18 \cdot 10^{-60}$
Apatites non stœchiométriques		$\text{Ca}_{10-u}(\text{HPO}_4)_u(\text{PO}_4)_{6-u}(\text{OH})_{2-u}$ $0 \leq u \leq 2$	$(10-u)/6$	

Les différents phosphates de calcium, ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont répertoriés dans le *tableau I*.

Notons que l'on connaît également diverses apatites carbonatées de type A ou B (selon que l'ion carbonate remplace un ion phosphate ou un ion hydroxyde) ainsi que des apatites fluorées. Le lecteur intéressé trouvera une description plus complète des apatites dans l'article de C. Combes et C. Rey [21].

Le fait qu'il existe différentes phases possibles implique que la phase la plus soluble se forme en premier (loi du mûrissement d'Ostwald) et peut évoluer ultérieurement vers la phase la plus insoluble si la sursaturation est suffisante (principe de stabilité à température et pression constantes : $\Delta G \leq 0$). L'hydroxyapatite est le polymorphe le plus insoluble à 298 K et pH 7, mais ce n'est plus vrai en milieu nettement acide. Le lecteur intéressé trouvera un graphe représentant l'évolution de la stabilité relative des phosphates de calcium en fonction du pH dans l'article de G.H. Nancollas [10].

L'hydroxyapatite cristallise dans le système hexagonal (groupe spatial $P6_3/m$) et sa structure est représentée sur la *figure 5*. On remarquera avec intérêt la disposition des ions OH^- en colonne.

Difficultés et problèmes

Une molécule quelconque ou un polymère peut agir, comme cela a été expliqué dans le paragraphe précédent, soit :

- en agissant sur le phénomène de nucléation,
- en agissant sur la croissance cristalline. Dans ce cas, deux mécanismes sont possibles :

(i) une réduction de la sursaturation locale, et donc du degré de sursaturation par rapport à la phase solide considérée. Cela peut se produire par un effet de complexation spécifique de l'un des ions prenant part à la formation du solide.

(ii) une adsorption sur des sites de croissance de la phase solide et une inhibition de la croissance dans la direction perpendiculaire à la face (ou aux faces) contenant une forte concentration en tels sites. Si ces sites d'adsorption sont uniformément répartis sur les différentes faces du cristal (ce qui est assez improbable si l'on se rappelle que les cristaux ont des propriétés anisotropes résultant de la disposition périodique des ions constituant la base), alors une adsorption d'une telle molécule peut induire une cessation totale de la croissance si tous les sites de croissance sont recouverts. Dans le cas

d'une adsorption préférentielle sur une face, il y a nécessairement modification de la morphologie du cristal [22-23] si la nucléation n'est pas inhibée par elle-même. Nous décrivons ce principe avec plus de détails dans le chapitre sur les mécanismes.

Il n'est pas exclu, *a priori*, qu'une combinaison des mécanismes (i) et (ii) soit possible.

Un très grand nombre d'études ont été consacrées à l'influence de divers polymères sur la croissance cristalline, en mettant dans la solution sursaturée non seulement des cristaux de la phase d'intérêt, mais encore des polymères [10, 24-26]. Dans ces études, on compare la vitesse de croissance en présence de polymère avec la vitesse de croissance en son absence. Les techniques d'étude employées sont décrites dans le chapitre suivant.

Le grand problème de toutes ces études tient pour l'essentiel à la **difficulté de distinguer le rôle des polymères dans la catalyse ou dans l'inhibition de la phase de nucléation**. Cela tient essentiellement à la difficulté de mesure de la formation de germes de très petite taille. Ces difficultés sont liées non seulement à la précision et à la sensibilité intrinsèques des dispositifs expérimentaux, comme nous l'avons déjà souligné, mais encore à la résolution temporelle des mesures : il faut en effet être capable d'acquérir le signal

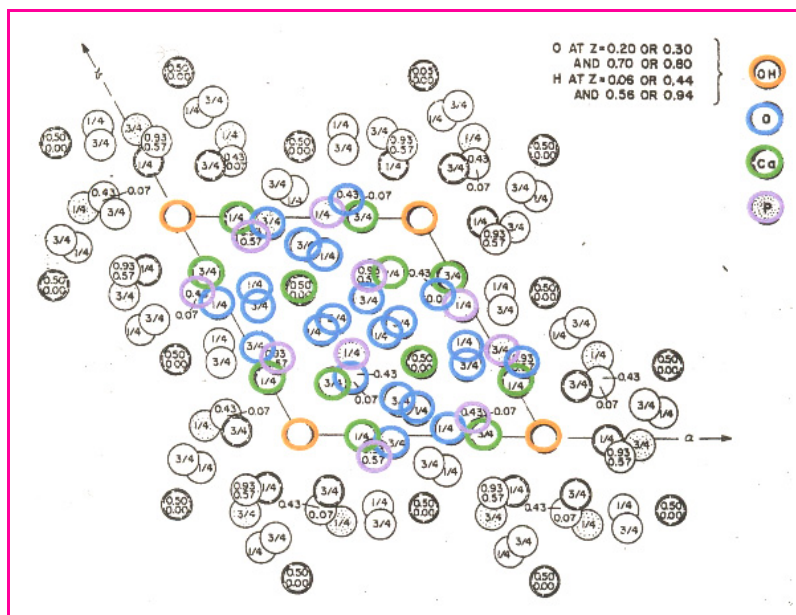


Figure 5 - Représentation de la maille conventionnelle de l'hydroxyapatite selon une coupe perpendiculaire à l'axe c.

avec un temps de mesure inférieur ou égal au temps caractéristique de formation des germes. Des progrès très importants ont été réalisés dans la mesure des cinétiques de nucléation de gouttes liquides au sein de phases gazeuses [27], ainsi que dans la modélisation des résultats expérimentaux obtenus essentiellement par diffusion de la lumière au sein de chambres de nucléation avec des simulations numériques [28]. Le fait que les avancées ont été beaucoup moins spectaculaires pour les études de nucléation d'espèces ioniques tient à la présence du solvant et à la nécessité de prendre en compte des interactions à longue portée comme les interactions électrostatiques.

Techniques d'étude

Méthodes physico-chimiques

• Techniques d'étude des cinétiques de croissance et de nucléation

*a. Mesures à composition constante : techniques électrochimiques

Cette technique, basée sur l'utilisation d'électrodes spécifiques aux ions H^+ et aux ions Ca^{2+} , permet de suivre la réduction d'activité des ions Ca^{2+} et l'augmentation de celle des protons lors de la croissance de phosphates de calcium. De façon plus subtile, lorsque ces électrodes sont liées à des systèmes de rétroaction commandant l'injection de volumes connus de réactifs, on peut suivre les phénomènes étudiés **à activité constante** [29]. Cela est très important, car la sur-saturation, force motrice de la nucléation et de la croissance cristalline, est alors maintenue constante. Cela revient à faire les études dans un système ouvert, proche de la réalité biologique. En effet, du calcium et des ions phosphates sont acheminés (en l'absence de carence alimentaire ou de dérèglement du métabolisme) de façon relativement régulière vers les sites de croissance osseuse grâce à un ensemble de systèmes de régulation (pompes spécifiques d'ions, calmoduline pour le cas des Ca^{2+} , phosphatase alcaline et hydrolyse de l'ATP pour les phosphates). De nombreux travaux ont été effectués grâce à ce type de dispositif expérimental, non seulement pour l'étude de la croissance de phases minéralisées en présence de biopolymères [30-32], mais encore pour l'étude de leur dissolution [33].

Dans ce type d'études, le temps d'induction τ est identifié comme l'instant auquel les microburettes commencent à injecter des réactifs dans la solution suite à une consommation ou une production d'espèces chimiques induites par la nucléation.

Des électrochimistes ont récemment mis au point un algorithme destiné à distinguer les phases de nucléation et de croissance cristalline d'espèces réductibles ou oxydables à une interface électrolyte-électrode [34]. A notre connaissance, ce type de méthode n'a pas encore été utilisé pour l'étude de systèmes d'intérêt biologique.

*b. Mesures à des interfaces liquide-air : croissance cristalline sous des films de Langmuir-Blodgett

L'influence du rôle de couches monomoléculaires auto-assemblées sur la nucléation et la croissance cristalline peut être étudiée en sursaturant la phase aqueuse avec les ions d'intérêt. A notre connaissance, la cinétique de croissance n'a pas encore été suivie à de tels interfaces (par exemple par diffusion de RX résolue en temps aux petits angles). Mais le rôle joué par la nature chimique des groupements polaires des molécules amphiphiles, ainsi que leur distance moyenne (contrôlée par la barrière mobile de la cuve de Langmuir et

par la mesure de la pression interfaciale du film, *figure 6*) ont clairement pu être mis en évidence. L'orientation préférentielle des cristaux ainsi que la sélection d'un polymorphe au détriment d'un autre ont également été observées [36-37] par suite du prélèvement des cristaux formés et leur analyse par microscopie électronique et par diffraction des rayons X. Ce type d'études est très important pour la compréhension de phénomènes de cristallisation naturels se produisant sur la paroi interne des membranes des vésicules matricielles synthétisées par des cellules spécifiques, tels les ostéoblastes au sein du tissu osseux, car en dehors de protéines spécifiques (dont nous allons décrire le rôle), les surfaces membranaires chargées sont connues pour jouer un rôle non négligeable.

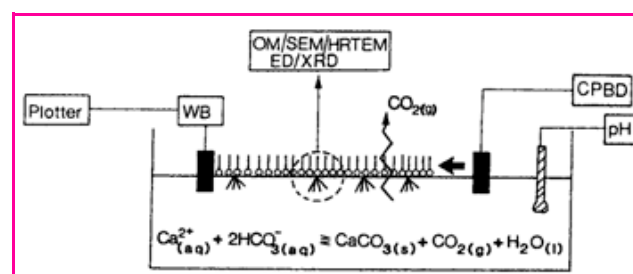


Figure 6 - Étude de la croissance cristalline de carbonate de calcium sous une monocouche adsorbée à l'interface air-eau au sein d'une cuve de Langmuir.

OM : microscopie optique ; SEM : microscopie électronique à balayage ; HRTEM : microscopie électronique de haute résolution ; ED : diffraction des électrons ; XRD : diffraction des rayons X ; WB : balance de Wilhelmy ; CPBD : barrière permettant le contrôle de la pression interfaciale (reproduit de [35]).

Ce type d'études est particulièrement développé dans les groupes de M. Lahav [38] et J.T. Groves [39] qui ont réussi à démontrer le rôle de l'épitaxie et de la promotion de changements de phases dans la sélection des phases minérales formées sous le film auto-assemblé.

Il faut noter encore que la technique des films minces fonctionnalisés est très utile pour la production de cristaux bidimensionnels de protéine, permettant ainsi leur étude structurale par microscopie électronique à haute résolution [40]. Cette approche se révèle très fructueuse dans le cas où la protéine est difficilement cristallisable.

*c. Mesures de diffusion de la lumière et de turbidité

Nous avons déjà montré un exemple d'utilisation de mesures de turbidité pour l'étude de la croissance cristalline (*figure 4*). L'utilisation de la diffusion quasi-élastique de la lumière peut permettre non seulement de déterminer des temps d'induction, le temps à partir duquel la solution commence à diffuser fortement, mais encore la distribution de taille des particules formées. Cependant, de nombreuses difficultés se présentent, notamment celles liées à la présence d'une solution sursaturée et donc la forte probabilité de se trouver dans un régime où les particules interagissent fortement. On est alors en régime de diffusion multiple et l'analyse du signal devient fort complexe. La diffusion de la lumière a été très utilisée pour l'étude de la cristallisation des protéines [41], mais à notre connaissance, il n'y a pas eu d'étude effectuée dans le domaine de la biominéralisation, probablement en raison des difficultés évoquées.

*d. Mesures couplant l'interférométrie et la microscopie par force atomique

Les mesures interférométriques (à l'aide d'interféromètres de Michelson ou de Mac Zhender) sont utilisées depuis de

nombreuses années pour l'étude de la croissance cristalline car elles permettent de suivre le gradient d'indice de réfraction à l'interface cristal-solution et ainsi de donner des informations sur la vitesse de croissance et l'importance des phénomènes de transport dans le mécanisme de croissance [42].

Cependant, cette technique ne permet pas l'étude du phénomène de nucléation. Récemment, ces techniques interférométriques ont été couplées à la microscopie à force atomique (en mode contact et en mode oscillant) pour étudier l'effet d'impuretés tels que les ions Mg^{2+} et Zn^{2+} sur la nucléation secondaire induite par les faces (0001) des cristaux d'hydroxyapatite immobilisés [43]. Une autre étude a permis la mesure des temps d'induction et des vitesses de croissance de phosphates de calcium sur des monocouches auto-assemblées d'acide-11-mercaptoundécanoïque sur l'or [44]. Cette dernière étude est également intéressante par l'utilisation de la spectroscopie des photoélectrons X pour la mesure de l'évolution du signal Ca2p et P2p qui révèle l'évolution du taux d'occupation des cristaux sur le film auto-assemblé.

***e. Mesures de réflectivité aux interfaces : une technique permettant le suivi cinétique de la nucléation et de la croissance cristalline à des interfaces solide-liquide**

Cette approche, proposée par notre équipe, permet de suivre *in situ* et en temps réel, la nucléation et la croissance cristalline à une interface solide-liquide. On utilise pour cela la propriété de la dépendance des coefficients de réflexion avec la polarisation de l'onde électromagnétique incidente. En particulier, la réflectivité de l'onde p , l'onde polarisée dans le plan d'incidence est donnée par :

$$r_p = [n_2 \cos \theta_1 - n_1 \cos \theta_2] / [n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2] \quad (14)$$

En combinant cette relation avec la loi de Snell-Descartes pour la réfraction, il est facile de démontrer que r_p s'annule pour un angle d'incidence θ_1 particulier, l'angle de Brewster, dans le cas d'un profil d'indice de réfraction en marche d'escalier, c'est-à-dire en l'absence de film adsorbé. Cet angle, noté θ_p , est donné par :

$$\tan \theta_p = n_2 / n_1 \quad (15)$$

L'onde s , polarisée perpendiculairement à l'onde p , ne possède pas une telle propriété d'extinction pour un angle d'incidence particulier.

Ainsi, la technique expérimentale de la réflectométrie à balayage angulaire, développée au sein de notre laboratoire [45] et dérivée de l'ellipsomètre classique, utilise uniquement l'onde p sélectionnée par un polariseur avant l'incidence sur l'hypoténuse d'un prisme rectangle isocèle qui sert de surface d'étude. C'est ainsi une technique très sensible à la présence d'un film mince adsorbé. En effet, l'adsorption de dipôles conduit à l'apparition d'un signal au niveau de la photodiode de détection pour une incidence égale à l'angle de Brewster. On mesure le signal réfléchi autour de l'angle de Brewster par rotation de la cellule et du bras qui porte la photodiode D (figure 7).

L'épaisseur optique et l'indice de réfraction du film adsorbé sont alors calculés en ajustant la courbe de l'intensité réfléchie en fonction de l'angle d'incidence (pour l'onde p) par un modèle adéquat de l'interface : modèle de la monocouche homogène et isotrope, modèle de bicouche, modèle des invariants optiques...

Cette technique nous a permis d'étudier les cinétiques d'adsorption de protéines [46], de particules colloïdales [47], les mécanismes de reconnaissance antigène-anticorps [48]

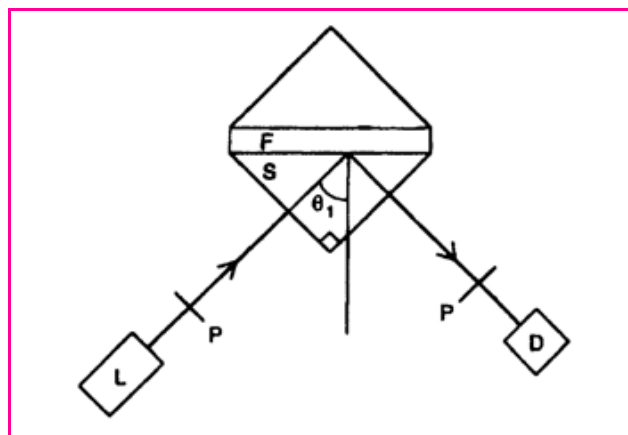


Figure 7 - Schéma de principe du réflectomètre à balayage angulaire.

L : laser He-Ne, $\lambda = 632,8 \text{ nm}$; P : polariseur permettant de sélectionner l'onde p , polarisée dans le plan d'incidence ; S : prisme isocèle à angle droit permettant le dépôt de polymères et l'étude de la croissance cristalline à l'interface silice-eau ; D : détecteur, photodiode permettant la mesure de l'intensité lumineuse réfléchie.

et le mécanisme de construction de films de polyélectrolytes auto-assemblés par interactions électrostatiques [49-50].

Nous avons pensé à utiliser cette technique pour le suivi de la nucléation et de la croissance cristalline pour trois raisons :

(i) la sensibilité optique : possibilité de détecter des couches minces (quelques Å) pourvu que l'indice de réfraction soit élevé, ce qui est le cas pour des phases minérales considérées ;

(ii) la possibilité d'injecter des solutions sursaturées de façon continue dans la cellule du réflectomètre : on peut ainsi éviter la diminution de sursaturation subséquente au début de la croissance cristalline et se placer ainsi dans des conditions identiques à celles utilisées dans les expériences effectuées à composition constante (voir le paragraphe a) ;

(iii) la mesure de la nucléation hétérogène uniquement au niveau de l'interface. En effet, la profondeur de pénétration de l'onde dans la solution aqueuse n'est que de l'ordre d'une centaine de nanomètres. De plus, si des cristaux se forment en solution et s'ils sédimentent, ils viendront se déposer au fond de la cellule mais pas sur la surface d'étude qui est verticale.

Hélas, la réalisation du point (ii) s'est révélée impossible puisque les solutions sursaturées en ions Ca^{2+} et phosphates (d'un facteur 25 par rapport à OHAP) ont précipité spontanément lors de l'introduction dans la cellule. La cellule du réflectomètre a ainsi été remplie avec la solution sursaturée, mise en place sur le porte cellule, et l'intensité réfléchie suivie en fonction du temps. Le temps d'induction τ correspond alors à l'intervalle de temps séparant le remplissage de la cellule et le début de l'augmentation du signal correspondant à l'intensité de l'onde p réfléchie autour de l'angle de Brewster. Nous détaillerons, dans la dernière partie de ce cours, l'influence de la poly(allylamine) (PAH) et du poly(styrène-4-sulfonate) (PSS) adsorbés comme couche ultime d'un film de polyélectrolytes sur la nucléation et la croissance cristalline de phosphates de calcium [51].

Notons qu'une étude préliminaire [52], effectuée en l'absence de polymère adsorbé sur le prisme en silice, nous a permis de montrer que la surface de silice induisait la nucléation et la croissance cristalline de brushite (identifiée par IRTF et par diffraction des RX), à partir d'une solution

sursaturée par rapport à l'apatite. Nous avons réussi à expliquer ce phénomène par le calcul du pH local au voisinage immédiat des groupements silanols de la surface à l'aide du modèle de Healy et White [53]. Dans les conditions expérimentales utilisées, le pH calculé au voisinage immédiat de la surface est de 5,34 (pour une valeur de 6,8 en solution) : on se trouve donc dans des conditions moins favorables pour la formation de OHAP. Néanmoins, pour une telle valeur du pH, l'hydroxyapatite reste la phase la plus insoluble, et on se trouve donc en présence d'un effet cinétique : c'est la brushite qui est formée le plus rapidement, mais la barrière d'activation permettant la transformation en une phase plus insoluble ne peut pas être franchie.

La technique du guide d'onde à optique intégrée [54] permet également de mesurer les épaisseurs, les indices de réfraction et donc les quantités adsorbées à l'interface, suite à la mesure des vitesses de phase des ondes *s* et *p* confinées au sein d'un guide d'onde plan (constitué d'un mélange de SiO₂ et de TiO₂) pris en sandwich entre la phase aqueuse et le substrat en silice. Nous avons récemment utilisé cette technique [55] pour mesurer la nucléation et la croissance cristalline interfaciale du lysozyme de blanc d'œuf en présence d'ions SCN⁻, qui sont connus pour induire la cristallisation de cette protéine [56]. Cette technique est maintenant utilisée pour l'étude de la nucléation secondaire de phosphates de calcium induite par des cristaux d'hydroxyapatite adsorbés sur un film de polyélectrolytes.

*f. Techniques de diffusion d'ions dans des gels

Cette technique, développée initialement par le groupe d'H.A. Goldberg [57-59], présente l'inconvénient que les ions diffusent progressivement dans un gel d'agarose de manière à ce que la sursaturation évolue progressivement au cours de l'expérience. En contrepartie, le grand avantage de la technique repose sur l'analogie qu'offre cette approche avec l'environnement présent au sein des

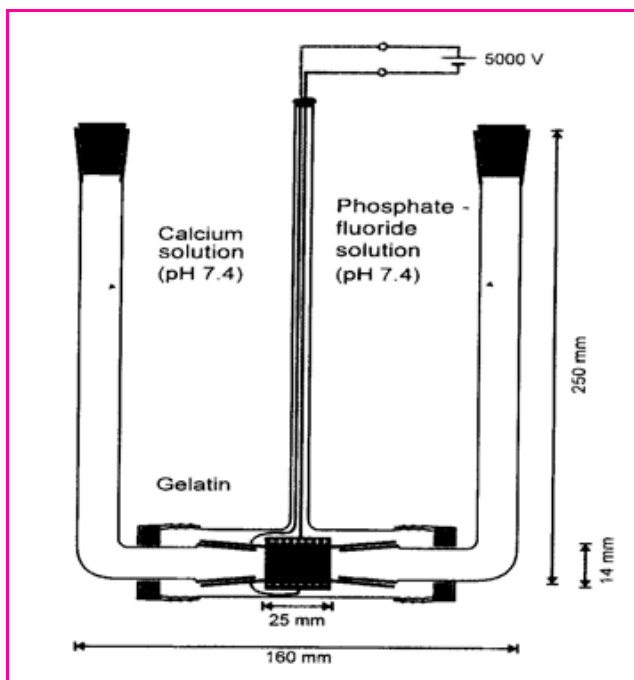


Figure 8 - Chambre permettant la diffusion double des ions vers la région d'étude où l'on applique un champ électrique uniforme. Le gel de collagène se trouve entre les deux électrodes (reproduit de [61]).

matrices extracellulaires. Les processus de biominéralisation se produisent au sein de telles assemblées supramoléculaires, en présence de collagène, de polysaccharides tels l'acide polyhyaluronique et diverses protéines spécifiques. Des protéines trouvées dans les matrices extracellulaires telles que l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la protéine de la morphogénèse osseuse (BMP) peuvent être introduites dans un tel environnement après une étape d'extraction et de purification. Les cristaux formés sont alors analysés par les techniques de caractérisation classiques.

Cette approche a été étendue récemment à des gels de collagène en présence de chondroïtine sulfatée et de biglycane [60]. Les premiers polymères induisent une rupture du gel, tandis que les seconds induisent une réticulation du gel et permettent de limiter la taille des cristaux d'hydroxyapatite formés.

Notons enfin l'approche introduite par le groupe de R. Kniep [61] où les ions calcium d'une part, les ions phosphates et fluorure d'autre part, diffusent progressivement vers le gel de collagène compris dans un conteneur en verre (figure 8). Les différents stades de la croissance cristalline ont pu être étudiés *in situ* en présence d'un champ électrique uniforme. Nous discuterons les résultats obtenus dans le chapitre sur les mécanismes.

• Techniques de caractérisation des phases formées

Nous ne décrivons pas cet aspect classique de la biominéralisation qui est développé de façon détaillée dans des ouvrages de référence ainsi que dans de nombreux travaux de notre groupe [62] et d'autres [63-64]. Les techniques utilisées sont essentiellement les différentes techniques de microscopie électronique, la diffraction des rayons X, la spectroscopie infrarouge et la microspectroscopie IR à transformée de Fourier [65-66]. Notons que toute étude cinétique nécessite la caractérisation des phases formées, car la mesure d'un temps d'induction ou d'une vitesse de croissance cristalline ne donne aucune information sur la nature et le degré de cristallinité de la phase formée. De plus, la compréhension des mécanismes de croissance de phases minérales peut aussi faire intervenir des techniques d'études structurales. Les études effectuées au sein des groupes de S. Mann et de L. Addadi-S. Weiner sont très significatives de ce type d'approche. Nous y reviendrons dans le chapitre consacré aux mécanismes de minéralisation.

Approches biologiques

Les avancées de la biologie moléculaire, notamment la réaction de la polymérase en chaîne, permettent de produire des mutants de protéines dont on suspecte le rôle dans la biominéralisation. Ces mutants diffèrent de la protéine native par remplacement d'un ou plusieurs acides aminés en des positions soigneusement sélectionnées le long de la séquence de la protéine. On peut ainsi déterminer les acides aminés qui jouent un rôle critique dans l'inhibition ou la promotion de la croissance cristalline. Une étude remarquable [67] a montré que la mutation de six résidus acides de la protéine G des streptocoques induisait une réduction de la vitesse de croissance de l'oxalate de calcium de plus de 60 % par rapport à la protéine native à quantité adsorbée constante (figure 9). Dans cette étude, les protéines ont été adsorbées sur des cristaux précurseurs d'oxalate de calcium, leur adsorption a été quantifiée par radiomarquage à ¹²⁵I et la vitesse de croissance mesurée

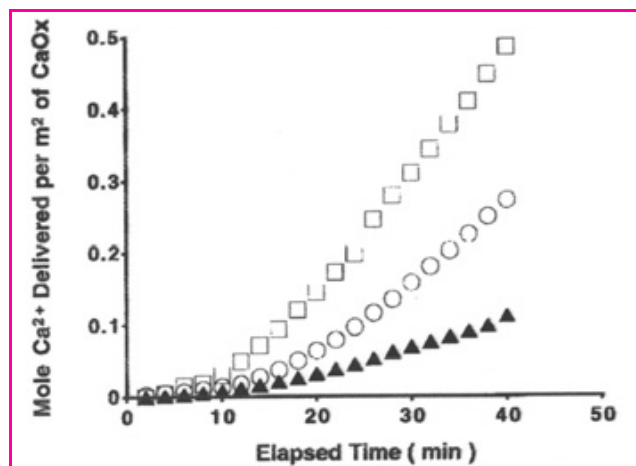


Figure 9 - Croissance cristalline d'oxalate de calcium (sursaturation = 3, force ionique totale = 10 mM) sur des cristaux d'oxalate de calcium en l'absence de protéine adsorbée (○) et en présence de $0,14 \mu\text{mol.m}^{-2}$ de protéine native (◻) ou mutée (mutant ▲) (reproduit de [67]).

par la méthode de la composition constante (voir a). Les auteurs ont également calculé la modification du potentiel électrique de surface induite par les six mutations grâce au module Delphi du logiciel Insight II.

Les mutations effectuées entraînent la disparition d'un des deux lobes présentant un potentiel de surface négatif et une réduction de la quantité maximale adsorbée d'un facteur deux. La conformation d'ensemble de la protéine n'est pas altérée par ces mutations et les régions chargées positivement sont conservées. On peut alors penser que la protéine native s'adsorbe préférentiellement avec un de ses lobes négatifs sur la surface des cristaux de CaC_2O_4 , en laissant cependant une région chargée négativement orientée vers la solution sursaturée. C'est grâce à cet excédent de charge négative que la protéine native est capable d'accélérer la croissance cristalline par rapport aux cristaux dépourvus de protéines adsorbées. En revanche, la protéine mutée ne peut s'adsorber sur la surface qu'à l'aide de son unique région négative (et donc avec une affinité et une quantité maximale adsorbée moindres), laissant ainsi une région chargée positivement au contact de la solution sursaturée. C'est cette augmentation de densité de charge positive à la surface de certaines faces cristallines qui est supposée être à l'origine du ralentissement de la croissance cristalline.

Ce travail remarquable constitue, à notre connaissance, la première étude combinant une approche de biologie moléculaire, de physico-chimie et de modélisation moléculaire visant à comprendre un mécanisme moléculaire de biominéralisation. Il constitue donc une extension intéressante du travail de précurseur effectué par les groupes de G.H. Nancollas [68] et L. Addadi [22-23].

Approches biomimétiques : l'apport de la chimie

Il s'agit de produire à l'aide de polymères ou de systèmes moléculaires auto-assemblés des édifices présents dans les organismes vivants et d'utiliser ces systèmes pour la synthèse de nouveaux matériaux. Le lecteur intéressé pourra se référer aux études récentes du groupe de W. Tremel [69], de A. Bigi [70] et de T. Kato [4]. Ces travaux portent tous sur

l'immobilisation de polymères sur des surfaces et l'étude de leur influence sur la croissance cristalline de carbonates de calcium [4, 69] ou de phosphates de calcium [70]. L'étude de Bigi montre que la seule présence du gel de gélatine-polyacrylate ne suffit pas à obtenir de l'hydroxyapatite, il faut encore leur appliquer une **déformation importante** (100 % d'élongation longitudinale). Cette dernière observation pourrait avoir une forte relevance biologique puisque le plus souvent les matrices extracellulaires sont au contact d'un faisceau de microtubules capable d'orienter les composants actifs de cette matrice. De plus, il est bien connu que l'application de contraintes mécaniques peut favoriser le remodelage osseux (on consultera avec attention l'article d'A. Meunier [71]). Ce genre d'aspects mécaniques semble avoir été négligé dans les études des mécanismes de biominéralisation (on consultera cependant avec intérêt l'article de revue récent de S. Mann [72]).

Un matériau idéal pour la croissance osseuse doit posséder une porosité et une orientation mésoscopique identiques à celles des tissus au sein duquel il doit être implanté, sans induire de réponse immunitaire. Des émulsions d'eau dans des solvants organiques ont été utilisées pour la préparation de carbonates de calcium poreux en forme de nids d'abeille [73]. Dans le même ordre d'idée, on a pensé à utiliser de la nacre poreuse pour la biominéralisation osseuse en présence d'ostéoblastes [74]. On pourra trouver une bibliographie étendue de l'importance de la biomimétisme dans la compréhension des phénomènes de biominéralisation dans un article récent de A.L. Boskey [75].

Mécanismes de minéralisation en présence de polymères

Jusqu'à présent, nous avons décrit des principes généraux décrivant les modes d'action possibles des biopolymères, ainsi que les méthodes expérimentales utilisées pour étudier leur effet. Il est temps maintenant de décrire plus en détail l'état des connaissances sur le rôle de différents groupements chimiques présents ainsi que sur le rôle de la conformation des biopolymères. Nous avons déjà souligné le fait qu'un polymère pouvait jouer un rôle en abaissant le degré de sursaturation en solution (par complexation des ions) ainsi que par adsorption sur des faces en croissance, entraînant ainsi un blocage ou une augmentation de l'affinité de certains sites.

Influence sur la morphologie

Si une molécule quelconque s'adsorbe sur les sites de croissance d'une face cristallographique donnée, disons la face notée C (figure 10), et entraîne une inhibition de la croissance, alors la vitesse de croissance de C est fortement réduite par rapport à celle des faces non affectées (notées A). En conséquence, en fin de croissance cristalline, l'aire relative des faces C est beaucoup plus importante que celle des faces A.

Ce principe général a été grandement exploité pour comprendre le rôle des glycoprotéines acides extraites de divers mollusques sur la croissance cristalline de carbonates de calcium [22-23]. Pourtant, la première protéine acide extraite d'un tissu minéralisé est la phosphoryne de la dentine [77], i.e. une protéine issue d'un vertébré. Hélas, l'état des connaissances est beaucoup moins développé pour les tissus minéralisés à base de phosphates de

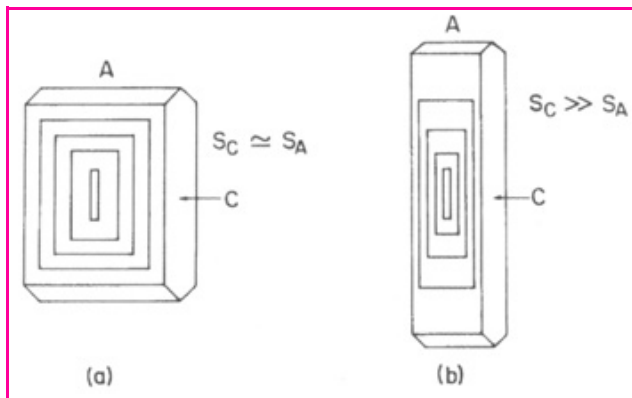


Figure 10 - Représentation schématique de la croissance d'un cristal sous forme de plaquette en l'absence d'inhibiteur spécifique (a) et en présence d'un inhibiteur spécifique de la face C (b).

La vitesse de croissance dans la direction perpendiculaire à C est fortement ralentie et le cristal se développe sous forme d'une aiguille le long de la direction perpendiculaire aux faces A (reproduit de [76]).

calcium que pour ceux à base de carbonates de calcium : commençons donc par ces derniers.

L'adsorption des glycoprotéines fortement acides sur les faces affectées a été directement mise en évidence par l'utilisation de protéines marquées à l'aide de fluorophores. Une analyse en acides aminés a montré que ces protéines contenaient jusqu'à 40 % en acides aspartiques (ionisés à pH 7) et leur séquençage partiel a montré l'existence de structures du type $(\text{Asp-R-Asp})_n$, où Asp représente un aspartate et R un acide aminé quelconque. Ce genre de motif favorise la formation d'éléments de structure secondaire en feuillet β , i.e. des chaînes parallèles ou antiparallèles semblables à un morceau de tôle ondulée. De plus, le calcul de la distance entre deux résidus Asp successifs donne une valeur comprise entre 6,7 et 6,8 Å, en très bon accord avec la distance moyenne entre deux anions de nombreux sels de calcium. Ces sels existent souvent sous forme de feuillets de cations alternés entre deux couches d'anions. Ainsi, en s'adsorbant avec la bonne conformation, la protéine peut bloquer des sites négatifs et ainsi inhiber la croissance. Il s'agit donc d'un genre d'épitaxie, mais qui conduit à une inhibition de croissance dans une direction donnée. **Ce qu'il faut retenir, c'est que**

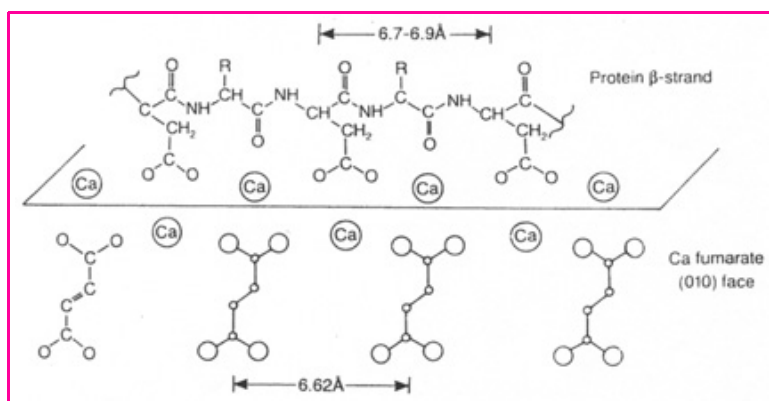


Figure 11 - Représentation schématique d'un feuillet β d'une protéine riche en acide aspartique, adsorbée sur la face (010) du fumarate de calcium (bas de la figure).

Le même motif structural a été identifié pour d'autres sels d'acides dicarboxyliques du calcium, pour la calcite et même pour des phosphates de calcium.

ce n'est pas seulement la densité de charge qui importe, mais encore un arrangement régulier des groupements chargés ainsi qu'une conformation adéquate des polymères adsorbés sur une face cristalline particulière.

Il est surprenant que ces glycoprotéines acides fassent davantage appel aux résidus aspartates qu'aux glutamates. Les premiers résidus comportent un seul groupement méthylène entre le carbone α et le groupement carboxylique, alors que le groupement glutamate en comporte deux. Cela devrait assurer davantage de flexibilité au groupement carboxylique et un meilleur ajustement de la distance entre deux COO^- voisins. Ceci reste une question encore irrésolue... mais en relation probable avec une tendance marquée des résidus aspartates à favoriser des conformations sous forme de feuillets β .

La situation est illustrée sur la figure 11 pour l'interaction d'une protéine riche en aspartate avec la face (010) du fumarate de calcium [78].

Qu'en est-il de la disposition de ces protéines au sein du cristal formé ? Elles peuvent apparaître à deux niveaux : soit à l'intérieur du cristal (qui est donc un matériau composite), soit à la frontière entre le cristal et la matrice extracellulaire.

Dans ce dernier cas, elles sont souvent adsorbées sur un film de chitine (le polymère le plus abondant dans la nature). Il a été démontré que la constitution d'un film mixte chitine-polyaspartate sur la surface d'une boîte de Pétri permettait de reproduire *in vitro* des feuillets de calcite tels que ceux représentés sur la figure 1 [4]. Il est clair que dans tous les cas étudiés, ces protéines ne représentent jamais plus que quelques % en masse de l'ensemble du tissu minéralisé, ce qui suggère donc que leur action est importante plutôt à l'état adsorbé qu'à l'état libre en solution. Cela incite aussi à être prudent : ces expériences *in vitro* reproduisent-elles nécessairement les mécanismes qui ont lieu *in vivo*, c'est-à-dire en présence d'un mélange de protéines et de polysaccharides différents ?

Nous venons de voir que les protéines acides pouvaient inhiber, par épitaxie, la croissance de certaines faces spécifiques. Mais elles n'inhibent pas l'ensemble du processus car des cristaux sont bien observés ! Notons que même pour un polymorphe donné, l'aragonite par exemple, la forme des cristaux formés change d'un mollusque à l'autre (figure 12). C'est que la nature des glycoprotéines acides change ainsi que la façon dont ces protéines s'arrangent au sein de la matrice extracellulaire.

Il est remarquable que les protéines acides considérées sont non seulement spécifiques d'une espèce, mais également d'un polymorphe du carbonate de calcium. Ainsi, des protéines acides issues des couches aragonitiques de certains mollusques induisent spécifiquement la croissance du même polymorphe lorsque ces macromolécules sont adsorbées sur de la β -chitine ou de la fibroïne de soie après purification [79]. Les protéines acides considérées jouent non seulement sur le contrôle de la forme des cristaux et leur vitesse de croissance, mais favorisent également la nucléation des phases considérées par le biais d'un mécanisme coopératif (figure 13) entre les groupements aspartates et les polysaccharides sulfonés qui sont liés à certains acides aminés par le biais d'oligosaccharides. Ces groupements sulfonates semblent attirer les ions calcium vers les groupements carboxylates de la protéine adsorbée sur la matrice extracellulaire. Cela a été démontré de façon fort élégante [80]. Ainsi, la coopérativité des groupements sulfonates et carboxylates permet de nucléer une



Figure 12 - Images de cristaux d'aragonite formés par les cavités internes de deux bivalves : a) *Eliptio complanata* et b) *Brachiodontus variabilis*. La barre d'échelle horizontale représente 10 µm sur les deux parties de la figure (reproduit de [78]).

phase à partir d'une protéine adsorbée. Mais cette protéine existe aussi en solution ou à l'autre extrémité de la matrice extracellulaire : quand elle vient s'adsorber sur la face appropriée du cristal en croissance, elle joue alors son rôle d'inhibiteur de croissance cristalline. La même protéine joue donc les deux rôles fondamentaux en induisant la nucléation et l'inhibition contrôlée et stéréosélective de la croissance. C'est ce double rôle qui justifie que l'on trouve ces protéines à la fois sur la surface de la matrice extracellulaire (rôle de nucléation) et entre les cristaux (inhibition).

Il semble aussi que les groupements acides ne doivent pas complexer le calcium avec une affinité trop élevée, mais doivent être disposés de façon ordonnée sur une surface afin de guider la disposition des cations de la phase minérale. S. Mann suggère également l'importance de la **concavité de la matrice extracellulaire** [35] : ainsi, une protéine acide déposée sur un substrat convexe n'a pas le même effet que la protéine identique dans un environnement concave. En effet, au sein d'un environnement concave, les ions sont piégés pendant une durée plus longue, ce qui optimise la probabilité de trouver le site d'interaction optimal. Notons que ce critère n'est pas absolu puisque l'on observe la croissance cristalline à la surface de monocouches lipidiques [36, 64]. Peut-être faut-il prendre en compte les ondulations de la membrane et la présence de défauts comme sites de nucléation potentiels ?

L'acide polyaspartique et l'acide polyacrylique en solution aqueuse inhibent fortement la nucléation et la croissance cristalline des carbonates de calcium [81], tandis que les mêmes polymères favorisent la nucléation hétérogène et la

croissance cristalline lorsqu'ils sont adsorbés sur un film de chitosan.

Notons enfin qu'il n'est pas à exclure que les polymères hydrophobes des matrices extracellulaires participent également au processus de minéralisation. Ainsi Manoli et Dalas [32] ont montré que l'élastine, une protéine présente au sein des parois artérielles, hydrophobe et riche en glycine, pouvait induire la nucléation hétérogène et la croissance de calcite à partir de solutions faiblement sursaturées (sursaturation de l'ordre de 10 par rapport à la calcite). Qu'en est-il de la fibroïne et du chitosan qui sont fréquemment employés comme substrats d'adsorption pour les protéines acides ? Ils peuvent bien sûr jouer un rôle, mais celui-ci peut être masqué si le taux de couverture des protéines acides adsorbées est élevé...

Pour en finir avec ces aspects, qu'en est-il pour les phosphates de calcium ?

De nombreuses protéines acides et/ou phosphorylées sont connues pour leur rôle d'inhibiteur ou de promoteur de la croissance des phosphates de calcium. La première fut la phosphophoryne issue de la dentine [77]. Il est clair que la présence d'inhibiteur et d'activateur de croissance doit être modifiée au cours des différents stades de croissance de l'individu [26]. De nombreuses études de biologie du développement sont consacrées à ces aspects, mais nous ne pouvons nous y intéresser ici. Des mécanismes de réparation doivent également pouvoir être mis en œuvre et des pathologies telles que l'ostéoporose sont liées à des déficits en protéines inductrices. D'où l'importance d'identifier les principales protéines impliquées et leur mécanisme d'action. Il est ainsi connu que la sialoprotéine osseuse et la phosphophoryne de la dentine sont des activateurs de la nucléation des phosphates de calcium sans affecter la croissance cristalline ultérieure [59]. D'un autre côté, l'ostéopontine [58], l'ostéocalcine et l'ostéonectine ne jouent pas de rôle dans la nucléation mais sont des inhibiteurs efficaces de la croissance cristalline [59]. L'importance de l'ostéopontine semble liée à la présence de résidus phosphorylés : en effet, l'action de la phosphatase alcaline permet d'hydrolyser 84 % des résidus phosphorylés de cette protéine et entraîne une réduction de son pouvoir inhibiteur d'un facteur 40 [58]. Les résidus portant des groupements carboxylates jouent également un rôle important puisque leur estérification (quasi quantitative)

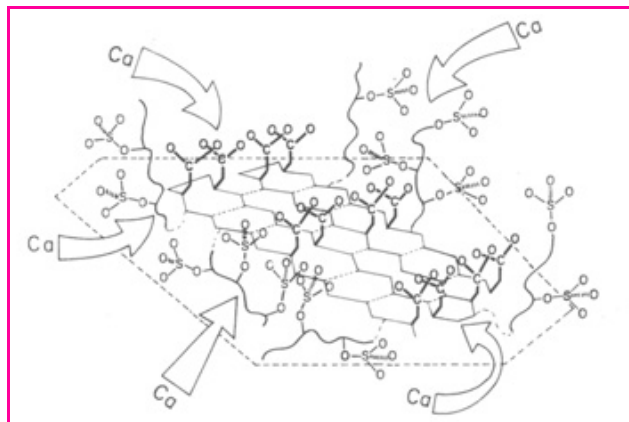


Figure 13 - Représentation schématique d'un site de nucléation d'une glycoprotéine acide adsorbée sur un substrat rigide.

Les groupements sulfonates servent à augmenter localement la concentration en ions Ca^{2+} au voisinage des groupements carboxylates présents dans les feuillets β de la protéine (reproduit de [76]).

entraîne une réduction supplémentaire du pouvoir inhibiteur d'un facteur 6 [58]. La phosvitine, également riche en acides aminés phosphorylés, joue aussi un rôle d'inhibiteur de la croissance cristalline [58]. L'effet de l'ostéonectine a été confirmé de façon indépendante par le groupe de K.G. Mann [25]. De même, l'acide poly- γ -carboxyglutamique issu de l'os a un rôle d'inhibiteur de croissance qui est réduit suite à une décarboxylation partielle [25]. Dans toutes ces études, l'activité inhibitrice est mesurée « à la façon des enzymologies », à savoir par la concentration en protéine nécessaire à la réduction de la vitesse de croissance d'un facteur 2 par rapport à la même solution sursaturée mais en l'absence de protéine.

Il a également été établi que l'acide polyaspartique jouait un rôle d'inhibiteur de croissance lorsqu'il est présent en solution aqueuse et ceci à une concentration aussi faible que $3,9 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [58]. De façon toute aussi intéressante, l'acide polyglutamique est un inhibiteur nettement moins efficace. Ceci est peut-être à relier à l'importance des résidus d'acide aspartique au sein des glycoprotéines acides de la matrice extracellulaire des coquillages et mollusques [76]. Il a également été démontré que dans une série de polymères phosphorylés, l'efficacité des groupements phosphonates dépendait de leur densité le long de la chaîne ainsi que de leur accessibilité au solvant [82]. Ainsi, seuls les groupements phosphonates accessibles aux ions calcium sont efficaces pour l'augmentation de la vitesse de précipitation.

Force est de reconnaître que la connaissance des mécanismes impliqués dans la croissance des phosphates de calcium est moins avancée que celle des carbonates de calcium. Ceci est dû au grand nombre de biopolymères impliqués et illustre bien que les vertébrés, qui minéralisent des phosphates de calcium, sont des organismes qui mettent en jeu des systèmes de régulation bien plus sophistiqués que les mollusques. Et il est loin d'être sûr que toutes les protéines impliquées aient été identifiées ! Elles sont en effet pour la plupart fortement liées au collagène et de ce fait très difficiles à purifier. Il est cependant établi que les protéines jouant un rôle inhibiteur de la croissance cristalline s'adsorbent sur l'hydroxyapatite [83-85]. Afin de clarifier la situation, de nombreuses recherches se concentrent sur l'effet d'acides aminés individuels en présence de cristaux d'hydroxyapatite [86-88]. L'influence de ces acides aminés sur la croissance cristalline à partir des germes d'OHAP introduits dans la solution sursaturée est ainsi corrélée à leur adsorption sur les cristaux. De façon très intéressante, le pouvoir inhibiteur est directement corrélé à l'hydrophobie des acides aminés [86] : leur parties polaires interagissent préférentiellement avec les faces chargées de l'OHAP, tandis que les groupes apolaires sont exposés au solvant dont ils modifient la structure locale et contribuent à réduire la concentration des ions libres au voisinage de l'interface cristal-solution. Ce mécanisme d'action rappelle celui des protéines « antigels » évoqué précédemment [18-19].

De nombreuses études récentes se focalisent sur l'influence de polymères diblocs amphiphiles sur la morphologie des phosphates de calcium [72, 89]. Le groupe de S. Mann a ainsi démontré l'influence du pH, et donc de la conformation du polymère utilisé (figure 14).

Quel est le rôle des fibres **collagène** au sein desquelles les cristaux d'apatite sont rangés dans l'os [90] ? Le collagène représente une fraction massique élevée au sein des tissus calcifiés. Rappelons que le collagène forme une triple hélice,

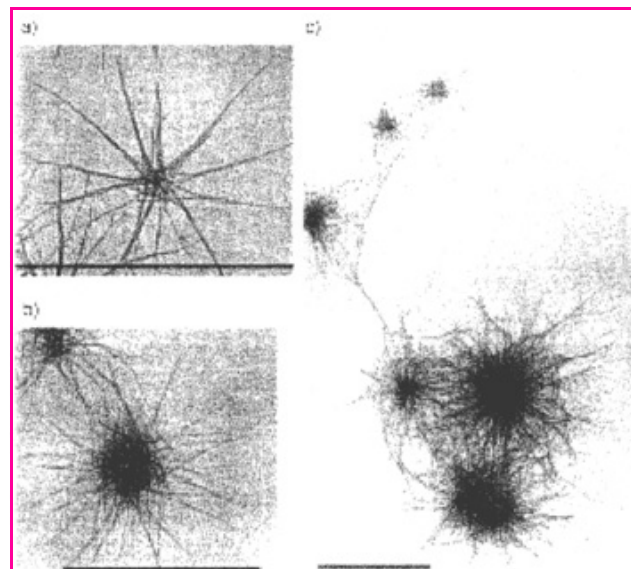


Figure 14 - Images de microscopie électronique en transmission de colloïdes constitués de l'association de polymères diblocs à base de poly(éthylène oxyde) et d'acide polyméthacrylique en présence d'ions Ca^{2+} et d'ions phosphates : a) morphologie obtenue à pH = 3,5 ; b) même valeur de pH mais à un temps ultérieur ; c) pH = 5,5. La barre horizontale représente 0,5 μm (reproduit de [72]).

formée de l'association de trois polypeptides par le biais de liaisons covalentes et très riche en unités répétitives du type Gly-X-Y, où Gly est la glycine, X et Y des acides aminés quelconques mais avec une forte proportion de proline. C'est cet acide aminé qui impose la tendance à l'hélicité, et le rôle de la glycine, dont la chaîne latérale est réduite à un simple atome d'hydrogène, est essentiellement stérique. Dans les tissus minéralisés, les fibrilles de collagène sont rangées parallèlement selon une direction parallèle à l'axe de symétrie principal des fibrilles. Elles sont également décalées de façon régulière les unes par rapport aux autres de sorte que l'ensemble de l'ultrastructure présente des orifices régulièrement espacés. Il semble que le rôle de ces orifices est de favoriser l'acheminement des ions Ca^{2+} et phosphates vers les sites de minéralisation. **Les protéines acides et/ou phosphorylées dont nous venons de décrire le rôle sont essentiellement associées au collagène** [91]. Il semble donc que le collagène synthétisé par les ostéoblastes joue surtout **un rôle de support mécanique** identique à celui de la chitine chez les invertébrés. L'étude récente du groupe de R. Kniep suggère cependant que la gélatine joue également un rôle de nature électrostatique [61]. Nous y reviendrons dans le chapitre suivant.

Pour la minéralisation de l'émail dentaire, une protéine appelée amélogénine, synthétisée par les améloblastes, constituée par une assemblée de plusieurs sous-unités en forme de nanosphères qui s'assemblent elles-mêmes sous forme de chaînette [92], joue un rôle essentiel dans la croissance directionnelle des cristaux constituant l'émail. Le contenu en amélogénine diminue brutalement lorsque le contenu en matériau inorganique atteint une valeur critique. Les stimuli moléculaires responsables de l'assemblage de l'amélogénine en chaînette et leur résorption ultérieure induite par protéolyse [93] ne sont pas encore connus. Voilà un problème bien intéressant, à l'interface de la physique, de la chimie et de la biologie.

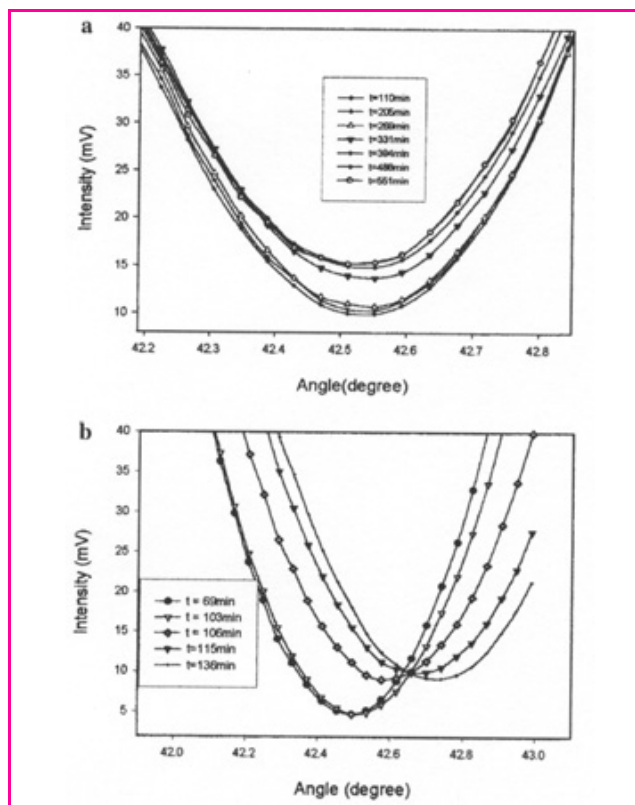


Figure 15.

a) Évolution des courbes de réflectivité, mesurées à l'aide d'un réflectomètre à balayage angulaire, en présence d'une solution tamponnée à pH = 6,85 (et de 150 mM NaCl) contenant des ions Ca^{2+} et phosphates (rapport 1:1) à 6,12 mM, pour différents temps de contact entre la solution et le film PEI-(PSS-PAH)₂-PSS adsorbé à la surface du prisme en silice.

b) Courbes identiques pour un film PEI-(PSS-PAH)₂ et pour une solution contenant des ions Ca^{2+} et phosphates à 6,75 mM.

PEI : poly(éthylène imine) ; PAH : poly(allyl amine) ; PSS : poly(styrène-4-sulfonate), sel de sodium (reproduit de [51]).

Influence sur les paramètres cinétiques

Implicitement, lorsque nous avons parlé de l'influence des polymères sur le contrôle morphologique, nous avons été amenés à discuter de cinétique chimique. Les études citées précédemment ont fait appel à la méthode de composition constante ou à l'effet direct de l'adsorption sur le blocage de sites et la modification de morphologie. Il nous semble intéressant de montrer de façon plus précise l'apport des méthodes optiques (voir techniques e) et des expériences de croissance en gel (voir techniques f) dans la compréhension des mécanismes de nucléation et de croissance cristalline.

Utilisation de la réflectométrie à balayage angulaire pour l'étude de l'influence de polyélectrolytes adsorbés à l'interface silice-eau dans la nucléation et la croissance de phosphates de calcium [51]

L'expérience a débuté par l'adsorption d'un film de polyélectrolyte selon la méthode de l'adsorption séquentielle alternée [94]. Le support est donc constitué de PEI-(PSS-PAH)₂ ou de PEI-(PSS-PAH)₂-PSS adsorbés sur la silice. Cette surface est alors mise en contact avec des solutions sursaturées en ions Ca^{2+} et phosphates à pH constant

($6,8 \pm 0,1$) et en présence d'un sel de fond (NaCl 0,15 mol.L⁻¹). Le rapport Ca/P est maintenu constant et égal à 1 dans la solution mise en contact avec le substrat, mais la sursaturation est variée d'une expérience à l'autre dans le but de détecter la sursaturation critique sur chacune de ces surfaces (cf. figure 3). L'occurrence du phénomène de nucléation est détectée par l'augmentation de l'intensité réfléchie au minimum des courbes de réflectivité (voir techniques e pour le principe de la réflectométrie à angle variable autour de l'angle de Brewster) : figure 15. On peut ainsi déterminer le temps d'induction τ (figure 16) pour chacune des sursaturations employées. Enfin, des expériences de contrôle ont été effectuées avec les mêmes

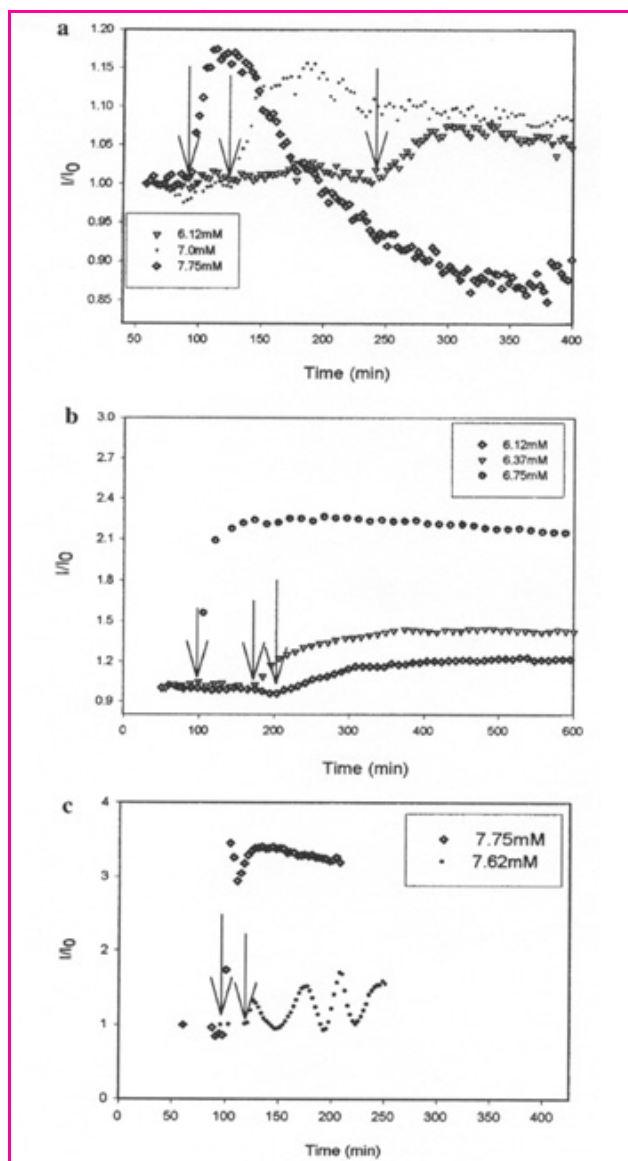


Figure 16 - Évolution des rapports I/I_0 , déterminés à l'aide des courbes de réflectivité analogues à celles de la figure 15, en fonction du temps pour différentes concentrations en ions Ca^{2+} et phosphates (rapport 1:1).

I_0 représente l'intensité réfléchie en l'absence de croissance cristalline (à $t = 0$ où la solution sursaturée est introduite dans la cellule) pour un angle d'incidence donné. I est l'intensité réfléchie à l'instant t pour le même angle d'incidence.

Signaux obtenus : **a)** sur le film PEI-(PSS-PAH)₂-PSS ; **b)** sur un film PEI-(PSS-PAH)₂ ; **c)** sur la silice, en l'absence de polyélectrolyte adsorbé.

Les flèches verticales représentent le début du processus de nucléation (reproduit de [51]).

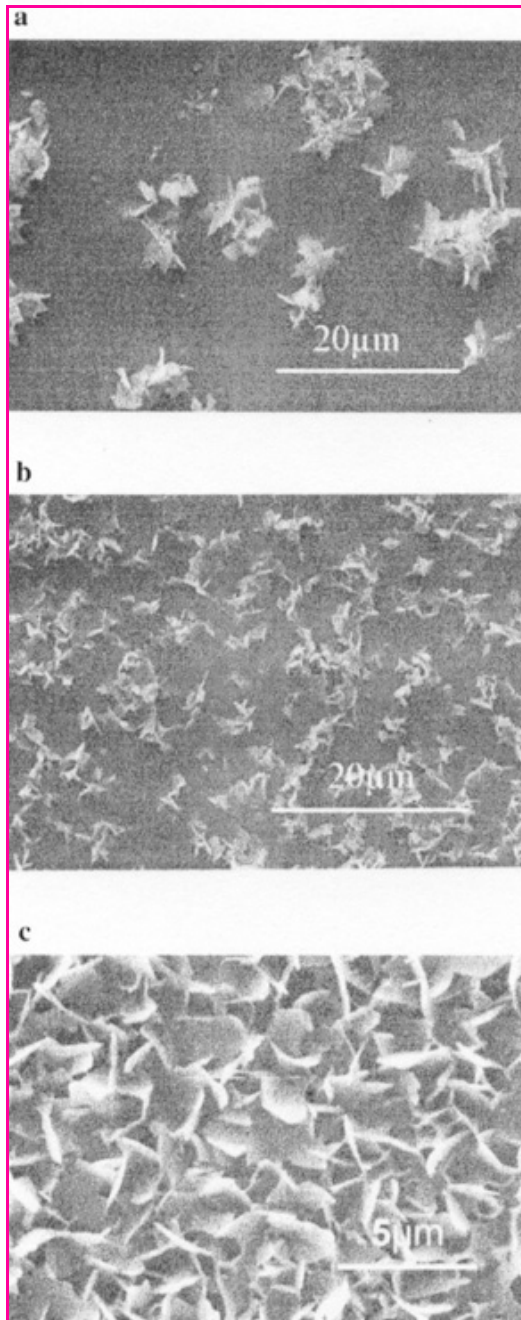


Figure 17 - Images de microscopie électronique à balayage de la surface de silice : **a)** recouverte d'un film PEI-(PSS-PAH)₂-PSS après mise en contact avec une solution d'ions Ca²⁺ et phosphates (6,75 mM) pendant 20 h ; **b)** recouverte d'un film PEI-(PSS-PAH)₂ après mise en contact avec une solution d'ions Ca²⁺ et phosphates (6,75 mM) pendant 20 h ; **c)** en l'absence de film de polyélectrolytes, après 20 h de mise en contact avec une solution d'ions Ca²⁺ et phosphates (7,62 mM).

Dans toutes ces expériences, le rapport Ca²⁺/phosphates en solution aqueuse est égal à 1 (reproduit de [51]).

solutions sursaturées mises en contact avec des lames de silice soumises au même traitement avec des polyélectrolytes identiques. Cela a permis d'étudier la morphologie des cristaux formés (figure 17) et de démontrer qu'il s'agissait de phosphate octacalcique (OCP) ou d'hydroxyapatite (OHAP) (figure 18).

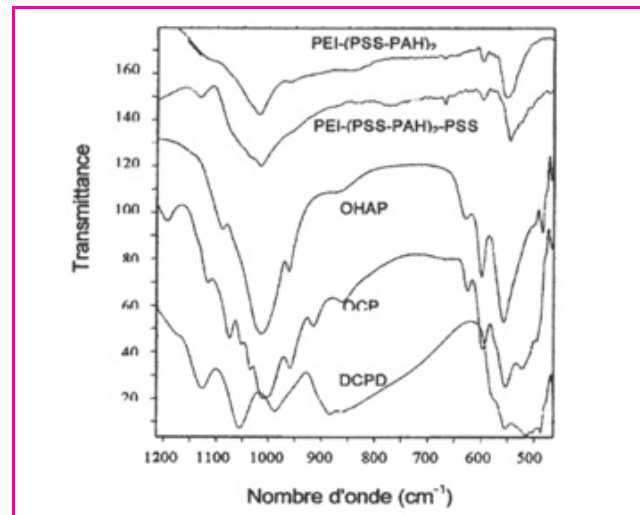


Figure 18 - Spectres infrarouge des cristaux de phosphates de calcium formés sur les films PEI-(PSS-PAH)₂, PEI-(PSS-PAH)₂-PSS adsorbés sur la silice.

A titre de comparaison, sont également fournis les spectres de l'hydroxyapatite (OHAP), du phosphate octacalcique (OCP) et de la brushite (DCPD) (reproduit de [51]).

De façon surprenante, les deux types de films, chargés positivement et négativement, induisent la nucléation et la minéralisation ; alors que l'on sait que les protéines et polymères impliqués dans les processus de minéralisation naturels sont essentiellement chargés négativement. Les sursaturations critiques ont été de $5,4 \pm 0,4$ mM et $5,9 \pm 0,2$ mM sur les films PEI-(PSS-PAH)₂-PSS et PEI-(PSS-PAH)₂ respectivement.

L'utilisation des tracés $\ln[S^{1/4} \cdot (S-1)^{3/4} \cdot \tau]$ en fonction de $1/(\ln S)^2$, c'est-à-dire l'utilisation des résultats de la théorie de la nucléation homogène (cf. les remarques faites au 1^{er} chapitre), permet de calculer les tensions superficielles de l'interface polyélectrolyte-germe (figure 19). Ces valeurs sont égales à $32 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ et $37 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ pour les films se terminant par le PSS et le PAH respectivement. Elles sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour divers systèmes polyélectrolytes-phosphates de calcium [32].

Cette étude montre donc l'intérêt de méthodes optiques pour l'étude du rôle des polymères adsorbés sur l'induction de croissance cristalline à des interfaces. Nous envisageons de l'étendre à des polymères naturels ou des polymères recouverts de protéines connues pour jouer un rôle dans la cristallisation des phosphates de calcium.

Étude de l'influence d'un champ électrique uniforme sur la croissance de fluoroapatite au sein d'un gel de gélatine [61]

Le principe de l'expérience a déjà été décrit (voir techniques dans § f) et nous voulons simplement montrer ici que les cristaux précurseurs se développent parallèlement à la direction des fibres de gélatine (figure 20, en haut à gauche) et que la croissance ne devient isotrope qu'après union des demi-sphères droite et gauche (figure 20, en bas à droite). Une simulation numérique a permis de démontrer que les étapes intermédiaires de la croissance pouvaient être décrites par un mécanisme de croissance fractale (figure 21). De plus, les lignes de croissance suivent la direction des lignes du champ électrique émergeant des fibres de collagène. Il s'agit là d'un bel exemple de compréhension d'un mécanisme de biominéralisation.

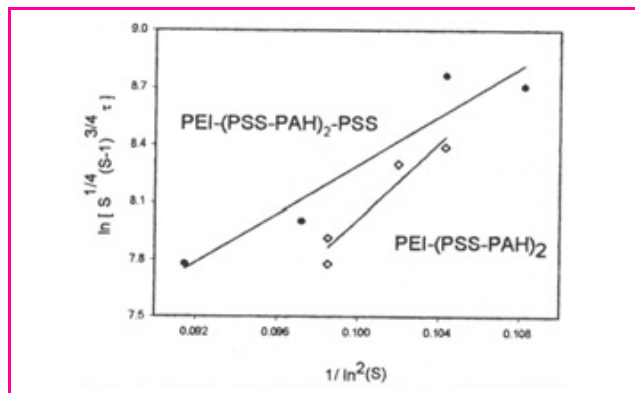


Figure 19 - Courbes représentant $\ln[S^{1/4} (S-1)^{3/4} \tau]$ en fonction de $1/\ln^2(S)$ pour un film de PEI-(PSS-PAH)₂-PSS (•) et de PEI-(PSS-PAH)₂ (◊) mis en contact avec des solutions sursaturées en ions Ca²⁺ et phosphates. τ représente le temps de latence mesuré expérimentalement par réflectométrie à balayage angulaire (reproduit de [51]).

Perspectives : vers la synthèse contrôlée de nouveaux matériaux composites

Nous venons de décrire l'état des connaissances du rôle joué par les polymères et les biopolymères dans le contrôle de la nucléation et de la croissance cristalline de cristaux d'intérêt biologique. Les mécanismes moléculaires impliqués sont bien connus pour la régulation de la croissance des carbonates de calcium : **ce sont à la fois la structure et la conformation des glycoprotéines acides utilisées par les mollusques qui permettent le contrôle de la nucléation, de la croissance cristalline et donc aussi de la morphologie des cristaux formés.** Dans le domaine des phosphates de calcium, on peut distinguer **des protéines à caractère acide spécialisées dans le contrôle de la nucléation et des protéines de même nature impliquées dans le contrôle de l'inhibition de la croissance cristalline.** Il existe clairement des messages cellulaires qui modulent l'expression des gènes associés à ces protéines au cours du développement de l'individu.

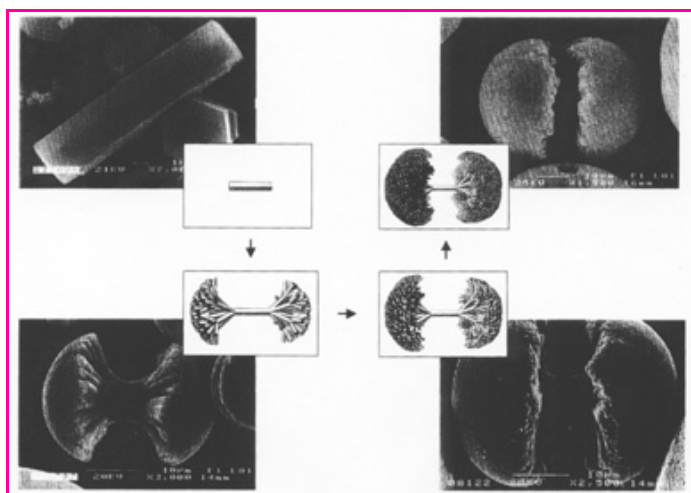


Figure 20 - Images de microscopie électronique à balayage de cristaux de fluoroapatite à différents stades de croissance et images de simulation numérique de croissance fractale (reproduit de [61]).

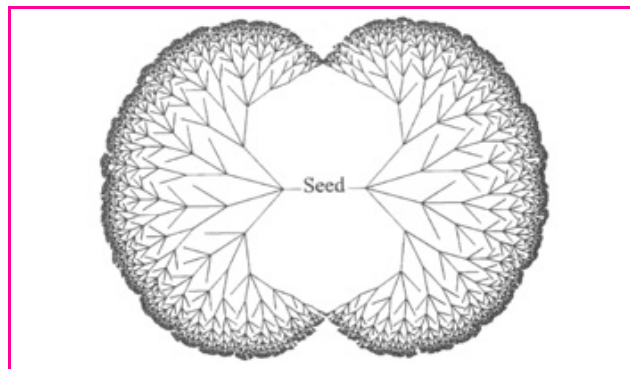


Figure 21 - Modèle de croissance fractale des cristaux de fluoroapatite en présence de fibres de collagène et d'un champ électrique uniforme (reproduit de [61]).

A chaque étape de croissance, il y a formation de 4 nouvelles branches. Les intersections entre branches sont interdites par les règles suivantes :

- (i) toutes les branches individuelles croissent avec la même vitesse ;
- (ii) les membres des générations d'ordre élevé sont supprimés si elles rencontrent des branches formées lors d'une génération antérieure ;
- (iii) si les branches d'une même génération se rencontrent à un instant donné, l'une de ces branches est supprimée de façon aléatoire. Si la rencontre se fait avec une branche de même génération, mais déjà formée, c'est la dernière branche formée qui est détruite ;
- (iv) pour simuler la croissance à l'intérieur de l'enveloppe, toutes les branches faisant un angle supérieur à 160 ° avec le noyau sont supprimées.

Il existe **un point commun fondamental** aux carbonates et aux phosphates de calcium : les biopolymères impliqués sont fonctionnels lorsqu'ils sont liés (essentiellement adsorbés) à un polymère rigide qui joue le rôle de **matrice organisatrice**. Dans le domaine des invertébrés (carbonates de calcium), il s'agit de la chitine et dans celui des vertébrés (phosphates de calcium), il s'agit du collagène.

Il reste clairement beaucoup de travail dans ce domaine, non seulement du point de vue fondamental (étude des phénomènes de nucléation, théorie de la nucléation hétérogène, développement de méthodes expérimentales), mais encore pour la mise au point de polymères mimant le rôle des biopolymères afin de pouvoir mettre au point des systèmes implantables favorisant la régénération de tissus osseux. De nombreux articles récents montrent ainsi que des matériaux composites associant l'hydroxyapatite et des polymères tels que les alginate, les acides polyhaluroniques et le collagène, la nacre et des protéines telles que la BMP (protéine de la morphogénèse osseuse) sont d'excellents systèmes ostéoinducteurs tant du point de vue de leurs propriétés chimiques que mécaniques [95-97].

Remerciements

Nous adressons nos remerciements les plus sincères au professeur P. Schaaf et aux docteurs B. Senger et F. Cuisinier pour leur collaboration. Leur contribution réelle apparaît dans les références de nos groupes respectifs.

Références

- [1] Schenk R.K., Hunziker E., Herrmann W., *Biological Mineralization and Demineralization*, G.H. Nancollas (ed.), Dahlem Konferenzen, **1982**, p. 143.
- [2] Williams R.J.P., The functional forms of biominerals, *Biomineralization. Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams (eds), VCH, Weinheim, **1989**, p. 1.
- [3] Nakahara H., *Biomineralization and Biological Metal Accumulation*, P. Westbroeck (ed.), P. de Jong, Amsterdam, **1983**, p. 225.
- [4] Kato T., *Adv. Mater.*, **2000**, *12*, p. 1543.
- [5] Garside J., *Biological Mineralization and Demineralization*, G.H. Nancollas (ed.), Dahlem Konferenzen, **1982**, p. 23.

- [6] Davies C.W., *Ion association*, Butterworth, London, **1962**.
- [7] Turnbull D., Fisher J.C., *J. Chem. Phys.*, **1949**, *17*, p. 71.
- [8] Zettlemoyer A.C. (ed.), *Nucleation*, Marcel Dekker, New York.
- [9] Volmer M., *Kinetik der Phasenbildung*, Teinkopf, Dresden und Leipzig, **1939**.
- [10] Nancollas G.H., In vitro studies of calcium phosphate crystallisation, *Biomaterialization. Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams (eds), VCH, Weinheim, **1989**, p. 157.
- [11] Sørensen J.S., Lundager Madsen H.E., *J. Cryst. Growth*, **2000**, *216*, p. 399.
- [12] Verdoes D., Kashchiv D., Rosmalen G.H., *J. Cryst. Growth*, **1992**, *118*, p. 401.
- [13] Félix O., Hosseini M.W., De Cian A., Fischer J., *Chem. Comm.*, **2000**, p. 281.
- [14] a) Ball V., document de synthèse présenté en vue de l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches, université Louis Pasteur, Strasbourg, **2001** ; b) Ball V., Planeix J.-M., Felix O., Hemmerle J., Schaaf P., Hosseini M.W., Voegel J.-C., *Cryst. Growth & Des.*, **2002**, *2*, p. 489.
- [15] Lowenstam H., *Science*, **1981**, *211*, p. 1126.
- [16] Harrisson P.M., Artymiuk P.J., Ford C.C., Lawson D.M., Smith J.M.A., Treffy A., White J.L., Ferritin: function and structural design of an iron-storage protein, *Biomaterialization. Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams (eds), VCH, Weinheim, **1989**, p. 257.
- [17] Mann S., Frankel R.B., Magnetite biomineralization in unicellular microorganisms, *Biomaterialization. Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams (eds), VCH, Weinheim, **1989**, p. 389.
- [18] Devries A.L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **1982**, *73A*, p. 627.
- [19] Lavalley P., Devries A.L., Cheng C.C.C., Scheuring S., Ramsden J.J., *Langmuir*, **2000**, *16*, p. 5785.
- [20] Elliott J.C., *Structure and Chemistry of Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- [21] Combes C., Rey C., *L'Act. Chim.*, juillet **2003**, p. 16.
- [22] Addadi L., Weiner S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, p. 4110.
- [23] Addadi L., Weiner S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1992**, *31*, p. 153.
- [24] Aoba T., Moreno E.C., *J. Colloid Interface Sci.*, **1985**, *106*, p. 110.
- [25] Romberg R.W., Werness P.G., Riggs B.L., Mann K.G., *Biochemistry*, **1986**, *25*, p. 1176.
- [26] Burgess S.K., Carey D.M., Oxendine S.L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**, *297*, p. 383.
- [27] Laasonen K., Wronczak S., Strey R., Laaksonen A., *J. Chem. Phys.*, **2000**, *113*, p. 9741.
- [28] Senger B., Schaaf P., Corti D.S., Bowles R., Pointu D., Voegel J.-C., Reiss H., *J. Chem. Phys.*, **1999**, *110*, p. 6438.
- [29] Thomson M.B., Nancollas G.H., *Science*, **1978**, *200*, p. 1059.
- [30] Dalas E., Koutsoukos P.G., *Langmuir*, **1988**, *4*, p. 907.
- [31] Dalas E., Kalitsis J.K., Koutsoukos P.G., *Langmuir*, **1991**, *7*, p. 1822.
- [32] Manoli F., Dalas E., *J. Cryst. Growth*, **1999**, *204*, p. 369.
- [33] Tang R., Wu W., Haas M., Nancollas G.H., *Langmuir*, **2001**, *17*, p. 3480.
- [34] Deutscher R.L., Fletcher S., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1998**, *94*, p. 3527.
- [35] Mann S., Crystallochemical strategies in biomineralization, *Biomaterialization. Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams (eds), VCH, Weinheim, **1989**, p. 35.
- [36] Rajam S., Heywood B.R., Walker J.B.A., Mann S., Davey R.J., Birchall J.D., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1991**, *87*, p. 727.
- [37] Küther J., Seshadri R., Knoll W., Tremel W., *J. Mater. Chem.*, **1998**, *8*, p. 641.
- [38] Konopny L., Berfeld M., Popovitz-Biro R., Weissbuch I., Leiserowitz L., Lahav M., *Adv. Mater.*, **2001**, *13*, p. 580.
- [39] Xu G., Yao N., Askay I.A., Groves J.T., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, p. 11977.
- [40] Brisson A., Mosser G., Huber R., *J. Mol. Biol.*, **1991**, *220*, p. 199.
- [41] Mikol V., Giegé R., The physical chemistry of protein crystallization, *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins. A. A practical approach*, A. Ducruix, R. Giegé (eds), Oxford University Press, **1996**, p. 219.
- [42] Vekilov P.G., Ataka M., Katsura T., *Acta Cryst.*, **1995**, *D51*, p. 207.
- [43] Kanzaki N., Onuma K., Treboux G., Tsutsumi S., Ito A., *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, p. 1991.
- [44] McPherson A., Malkin A.J., Kuznetsov Y.G., Plomp M., *Acta Cryst.*, **2001**, *D57*, p. 1053.
- [45] Schaaf P., thèse de doctorat, université Louis Pasteur, **1987**.
- [46] Schaaf P., Déjardin P., Schmitt A., *Langmuir*, **1987**, *3*, p. 1131.
- [47] Mann E.K., van der Zeeuw E.A., Koper G.J.M., Schaaf P., Bedeaux D., *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, p. 790.
- [48] Huetz P., Schaaf P., Voegel J.-C., Mann E.K., Miras B., Ball V., Freund M., Cazenave J.-P., *ACS Symp. Ser.*, **1995**, *602*, p. 334.
- [49] Ladam G., Schaad P., Voegel J.-C., Schaaf P., Decher G., Cuisinier F.J.G., *Langmuir*, **2000**, *16*, p. 1249.
- [50] Ladam G., Schaaf P., Cuisinier F.J.G., Decher G., Voegel J.-C., *Langmuir*, **2001**, *17*, p. 878.
- [51] Ngankam P.A., Lavalley P., Voegel J.-C., Szyk L., Decher G., Schaaf P., Cuisinier F.J.G., *J. Amer. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, p. 8998.
- [52] Ngankam P.A., Schaaf P., Voegel J.-C., Cuisinier F.J.G., *J. Cryst. Growth*, **1999**, *197*, p. 927.
- [53] Healy T.W., White L.R., *Adv. Colloid Interf. Sci.*, **1978**, *9*, p. 303.
- [54] Tiefenthaler K., Lukosz W., *J. Opt. Soc. Am. B*, **1989**, *6*, p. 209.
- [55] Ball V., Lustig A., Ramsden J.J., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **1999**, *1*, p. 3667.
- [56] Riès-Kautt M.M., Ducruix A.F., *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, p. 745.
- [57] Hunter G.K., Goldberg H.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, p. 8562.
- [58] Hunter G.K., Kyle C.L., Goldberg H.A., *Biochem. J.*, **1994**, *300*, p. 723.
- [59] Hunter G.K., Hauscka P.V., Poole A.R., Rosenberg L.C., Goldberg H.A., *Biochem. J.*, **1996**, *300*, p. 59.
- [60] Gafni G., Septier D., Goldberg M., *J. Cryst. Growth*, **1999**, *205*, p. 618.
- [61] Busch S., Dolhaine H., DuChesnes A., Heinz S., Hochrein O., Laeri F., Podebrad O., Vietze U., Weiland T., Kniep R., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1999**, p. 1643.
- [62] Bodier-Houllé P., Steuer P., Voegel J.-C., Cuisinier F.J.G., *Acta Cryst.*, **1998**, *D54*, p. 1377.
- [63] Mann S., Skarnulis J., Williams R.J.P., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1979**, p. 1067.
- [64] Mann S., Heywood B.R., Rajam S., Birchall J.D., *Nature*, **1988**, *334*, p. 692.
- [65] Bohic S., thèse de doctorat d'Université, Université de Nantes, **1998**.
- [66] Paschalis E.P., DiCarlo E., Betts F., Sherman P., Mendelsohn R., Boskey A.L., *Calcif. Tissue Int.*, **1996**, *59*, p. 480.
- [67] Clark R.H., Campbell A.A., Klumb L.A., Long C.J., Stayton P.S., *Calcif. Tissue Int.*, **1999**, *64*, p. 516.
- [68] Raj P.A., Johnsson M., Levine M.J., Nancollas G.H., *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, p. 5968.
- [69] Küther J., Seshadri R., Tremel W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, p. 3044.
- [70] Bigi A., Boanini E., Panzavolta S., Roveri N., *Biomacromolecules*, **2000**, *1*, p. 752.
- [71] Meunier A., *L'Act. Chim.*, juillet **2003**, p. 27.
- [72] Mann S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, p. 3392.
- [73] Walsh D., Mann S., *Nature*, **1995**, *377*, p. 320.
- [74] Silve C., Lopez E., Vidal B., Smith D.C., Camprasse S., Camprasse G., Couly G., *Calcif. Tissue Int.*, **1992**, *51*, p. 363.
- [75] Boskey A.L., *Calcif. Tissue Int.*, **1998**, *63*, p. 179.
- [76] Addadi L., Weiner S., Stereochemical and structural relations between macromolecules and crystals in biomineralization, *Biomaterialization. Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams (eds), VCH, Weinheim, **1989**, p. 133.
- [77] Veis A., Perry A., *Biochemistry*, **1967**, *6*, p. 2409.
- [78] Weiner S., Addadi L., *Trends Biochem. Sci.*, **1991**, *16*, p. 252.
- [79] Falini G., Albeck S., Weiner S., Addadi L., *Science*, **1996**, *271*, p. 67.
- [80] Addadi L., Moradian J., Shay E., Maroudas N.G., Weiner S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, p. 2732.
- [81] Zhang S., Gonsalves K.E., *Langmuir*, **1998**, *14*, p. 6761.
- [82] Dalas E., Kallitsis J.K., Koutsoukos P.G., *Langmuir*, **1991**, *7*, p. 1822.
- [83] Hay D.I., Moreno E.C., Schlesinger D.H., *Inorg. Pers. Biol. Med.*, **1979**, *2*, p. 271.
- [84] Moreno E.C., Varughese K., Hay D.I., *Calcif. Tissue Int.*, **1979**, *28*, p. 7.
- [85] Moreno E.C., Kresak M., Hay D.I., *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, p. 2981.
- [86] Koutsopoulos S., Dalas E., *Langmuir*, **2000**, *16*, p. 6739.
- [87] Spanos N., Klepetsanis P.G., Koutsoukos P.G., *J. Colloid Interf. Sci.*, **2001**, *236*, p. 260.
- [88] Benaziz L., Barroug A., Legrouri A., Rey C., Lebugle A., *J. Colloid Interf. Sci.*, **2001**, *238*, p. 48.
- [89] a) Cölfen H., *Macromol. Rapid Comm.*, **2001**, *22*, p. 219 ; b) Wegner G., Baum P., Müller M., Norwig J., Landfester K., *Macromol. Symp.*, **2001**, *175*, p. 349 ; c) Qi L., Li J., Ma J., *Adv. Mater.*, **2002**, *14*, p. 300.
- [90] Perry C.C., *Biomaterials. Chemistry of Advanced Materials. An Overview*, L.V. Interrante, M.J. Hampden-Smith (eds), Wiley-VCH, **1998**, p. 499.
- [91] Veis A., Biochemical studies of vertebrate tooth mineralization, *Biomaterialization. Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams (eds), Wiley-VCH, Weinheim, **1989**, p. 189.
- [92] Moradian-Oldak J., Paine M.L., Lei Y.P., Fincham A.G., Snead M.L., *J. Struct. Biol.*, **2000**, *131*, p. 27.
- [93] Bartlett J.D., Simmer J.P., *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **1999**, *10*, p. 425.
- [94] Decher G., *Science*, **1997**, *277*, p. 1232.
- [95] Petite H., *Biofutur*, **2001**, *211*, p. 1.
- [96] Liu L.-S., Thompson A.Y., Heidarani M.A., Poser J.W., Spiro R.C., *Biomaterials*, **1999**, *20*, p. 1097.
- [97] Bakos D., Soldan M., Hernandez-Fuentes I., *Biomaterials*, **1999**, *20*, p. 191.



V. Ball

Vincent Ball

est maître de conférences à l'Institut Charles Sadron de Strasbourg*.

Jean-Claude Voegel

est directeur de recherche à l'INSERM**.



J.-C. Voegel

* Institut Charles Sadron, CNRS UPR 22, 6 rue Boussingault, 67083 Strasbourg Cedex.

E-mail : ball@ics.u-strasbg.fr

** Unité 595 INSERM, Fédération de Recherche Odontologie, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex.