

Chimie de la matière condensée

M. Jacques LIVAGE, professeur

Cours au Collège Biominéralisation et matériaux bio-inspirés (7 heures)

Depuis des millénaires, l'homme fabrique ses matériaux à partir de minerais qu'il traite à haute température pour les transformer en métaux, verres ou céramiques. Les processus mis en œuvre par la nature pour élaborer ses biomatériaux sont très différents. Ils utilisent des espèces dissoutes en solution qu'ils transforment en solide par des réactions de précipitation ou de polycondensation. Ces réactions, qui se produisent à température ambiante, sont rigoureusement contrôlées par la présence de protéines spécifiques dont le rôle exact reste souvent inconnu. Les matériaux obtenus sont généralement des nanocomposites bio-inorganiques dont les propriétés dépassent celles de nos matériaux les plus sophistiqués.

Ce cours avait pour objet d'analyser les processus mis en jeu dans l'élaboration des biomatériaux et de montrer comment ces processus pouvaient servir de source d'inspiration pour la réalisation de matériaux avancés. Le premier cours a été consacré à une description rapide de l'évolution des biomatériaux au cours de l'histoire, depuis l'apparition des premières traces de vie. Trois types de composés ont été plus particulièrement étudiés, les carbonates, la silice et les oxydes de fer. D'autres biomatériaux, tels que les phosphates ont été traités au cours des séminaires.

1. Les carbonates

Les carbonates offrent une bonne illustration des réactions de précipitation dans lesquelles le solide se forme par association d'anions et de cations. Une phase solide apparaît dès que le produit de solubilité du composé est atteint. Elle se forme par nucléation-croissance, à partir d'un germe critique. En milieu biologique, la nucléation est hétérogène et le solide qui se forme est en interaction

avec l'organisme qui le produit. On peut alors distinguer deux types de minéralisation : bio-induite et bio-contrôlée.

Minéralisation bio-induite

Dans ce cas, l'organisme n'intervient pas directement sur la précipitation. Les réactions métabolites dont il est le siège modifient les caractéristiques physico-chimiques du milieu et entraînent la précipitation par déplacement des équilibres chimiques. La formation de stromatolithes par les cyanobactéries obéit sans doute à un tel mécanisme que l'on retrouve dans de nombreuses algues photosynthétiques. La formation d'hydrates de carbone par photosynthèse à partir de gaz carbonique, entraîne une diminution de la concentration locale en CO₂. Or celui-ci intervient dans l'équilibre de précipitation des carbonates qui se trouve déplacé vers la droite :



Des réactions analogues sont à la base de la formation des récifs coralliens. Les coraux vivent en symbiose avec des algues unicellulaires, les zooxanthelles. Ces algues photosynthétiques, en consommant du CO₂, favorisent la précipitation du carbonate de calcium.

Il semble aussi que la formation des stalactites et des stalagmites dans les grottes soit associée à la présence de certaines bactéries. Ces bactéries, par leur métabolisme modifient les conditions physico-chimiques locales. Leur paroi sert de site de nucléation hétérogène, par association entre les fonctions carboxylate -COO⁻ et les ions Ca²⁺.

Cette observation a donné naissance à un procédé original de restauration des vieilles pierres, le procédé « biocalcite » qui a fait l'objet d'un séminaire particulier.

Minéralisation bio-contrôlée

Dans ces processus, la formation de carbonate de calcium est rigoureusement contrôlée par la matière vivante. L'exemple le plus connu est sans conteste celui des nacres dont l'aspect particulier est dû à la structure lamellaire du matériau.

Les nacres sont en fait des matériaux composites formés de couches successives de carbonate de calcium (calcite ou aragonite) entre lesquelles s'intercalent des couches de protéines. Cette association d'un matériau minéral dur et de matière molle (protéines) confère aux nacres des propriétés mécaniques remarquables qui ont été décrites dans le séminaire du Professeur Philippe Boch (ESPCI).

En fait, la formation du minéral (morphologie et structure cristallographique) est rigoureusement contrôlée par la sécrétion de protéines spécifiques par le mollusque. Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer ce contrôle. Le premier repose sur des relations d'épitaixie entre ces protéines et le carbonate.

C'est ainsi que l'on a pu mettre en évidence un accord entre la périodicité des groupements aspartiques des feuillets β et les distances Ca-Ca dans le plan (001) de l'aragonite et de nombreuses expériences montrent que la présence de molécules organiques ou de peptides joue un rôle considérable sur la morphologie des précipités de carbonates. Un autre modèle a été proposé récemment. Connue sous le nom de « perle plate », il consiste à intercaler une fine lame de verre entre le manteau et la coquille de façon à observer la formation progressive de la nacre. Ces expériences suggèrent que les couches minérales ne sont pas isolées les unes des autres. Des discontinuités existent dans la couche de protéines qui permettent à des ponts minéraux de se former. Ces ponts communiqueraient ainsi l'information structurale et expliqueraient les relations cristallographiques étroites existant entre deux couches d'aragonite successives.

Les coccolithes offrent un autre exemple de la complexité des formes obtenues par biominéralisation. Ces algues photosynthétiques unicellulaires s'entourent d'un exosquelette (coccosphère) de carbonate de calcium. Cette coccosphère est un modèle de « structure hiérarchisée ». Elle est formée de l'assemblage d'unités élémentaires, les coccolithes, entités monocristallines ayant la forme d'un marteau. Les coccolithes sont synthétisés dans la cellule, à l'intérieur de vésicules, puis transférés vers la membrane via l'appareil de Golgi et déposés sur la surface extérieure par exocytose pour former la coccosphère. L'observation de ces processus complexes a donné naissance à ce que les chimistes appellent « la tectonique moléculaire ».

La formation d'un solide fait appel à plusieurs étapes :

- i) Préorganisation supramoléculaire au cours de laquelle les entités élémentaires s'assemblent selon une géométrie bien définie.
- ii) Reconnaissance moléculaire interfaciale qui entraîne la nucléation-croissance de la phase solide sur certaines fonctions organiques.
- iii) Croissance vectorielle orientée en fonction du substrat organique.
- iv) Organisation hiérarchique des différents éléments.

Les oursins enfin offrent un exemple unique de croissance cristalline. Leurs piquants sont formés de monocristaux de calcite auxquels sont étroitement associées des glycoprotéines. De ce fait, ils ne présentent pas la morphologie régulière des monocristaux minéraux, définie par des plans de clivage. Des études de croissance cristalline effectuées in-vitro, en présence de protéines extraites de piquants d'oursins montrent que ces biomolécules s'adsorbent sur certaines faces de la calcite et restent occluses à l'intérieur du cristal au cours de sa croissance.

2. La silice

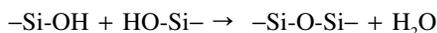
La formation de silice à partir de solutions aqueuses met en jeu des processus complètement différents. Elle doit se décrire par polymérisation de précurseurs moléculaires et non plus par précipitation d'espèces ioniques. Nous avons par

conséquent décrit les réactions d'hydrolyse et condensation qui conduisent du silicium en solution à la silice et montré les divers paramètres qui interviennent lors de ces transformations : catalyse acide ou basique, activation nucléophile. Comme dans le cas des carbonates, on observe des processus de minéralisation bio-induite. C'est le cas des silices d'origine végétale (riz, bambous, presle) et de la formation des phytolithes. Plus intéressante est la minéralisation bio-contrôlée qui se produit dans de nombreux organismes marins (diatomées radiolaires, éponges, ...).

Les diatomées représentent un ensemble extrêmement vaste et varié de protistes vivant en milieu aqueux. Elles constituent une grande partie du zooplancton et sont responsables de la formation des terres de diatomées ou Kieselguhr, minéraux poreux utilisés dans l'industrie comme filtres ou supports de catalyseurs.

Les diatomées sont des algues photosynthétiques qui s'entourent d'un exosquelette de silice (frustule) qui est à la fois transparent pour laisser passer la lumière et poreux pour permettre les échanges avec le milieu extérieur.

Ces diatomées utilisent la silice dissoute sous forme d'acide silicique Si(OH)_4 pour former la silice via des réactions de condensation :



Ces réactions se produisent à l'intérieur de vésicules (Silica Deposition Vesicle). La silice ainsi produite est déposée à l'extérieur par exocytose pour former le frustule. Cette réaction se produit au moment de la mitose, lors de la séparation des cellules sœurs. Elle est remarquablement rapide, de l'ordre de l'heure, ce qui pose un véritable défi aux chimistes qui dans de telles conditions ne sauraient pas synthétiser de la silice en moins de plusieurs semaines !

C'est pourquoi de nombreuses études sont effectuées actuellement afin de déterminer la nature des biomolécules impliquées dans les processus de silicification. Des protéines, appelées silaffines, ont été isolées et analysées. Ce sont des polypeptides cationiques qui semblent catalyser la formation de silice. Des processus de séparation de phases apparaissent lorsque l'on utilise des polyamines à longue chaîne. Ils pourraient être responsables des morphologies tout à fait uniques que l'on observe sur les diatomées.

La morphologie tout à fait remarquable des diatomées a inspiré les chimistes et la synthèse de silices mésoporeuses fait maintenant l'objet de très nombreuses études. Ces silices se forment par condensation de la silice au sein de mésophases micellaires.

Les cours sur la silice biogénique ont été complétés par la description de la formation des spicules d'éponges et celle des radiolaires.

3. Les oxydes de fer

Le fer joue un rôle biologique important, en particulier pour le transport de l'oxygène par l'hémoglobine. Il intervient aussi en tant que « matériau de structure » pour assurer la dureté des radulas et surtout comme « matériau magnétique » dans certaines bactéries.

La chimie aqueuse du fer est relativement complexe. Elle donne naissance à de nombreuses formes différentes, hydratées (goethite, ferrihydrite, lépidocrocite) ou anhydres (hématite, magnétite). La nature des espèces formées en solution dépend bien sûr du pH mais aussi du degré d'oxydation du fer. Le fer ferreux Fe^{2+} est beaucoup plus soluble que le fer ferrique Fe^{3+} , mais rapidement oxydé en présence d'oxygène. Ceci pose de réels problèmes pour le transport et le stockage du fer.

De la bactérie à l'homme et même dans certaines plantes, le stockage du fer est assuré par la « ferritine ». Cette macromolécule se présente sous la forme d'une sphère formée de 24 chaînes peptidiques au sein de laquelle on peut stocker jusqu'à 4 500 atomes de fer. L'intérieur de la sphère communique avec l'extérieur par des canaux dont certains sont hydrophiles et les autres hydrophobes. Le fer, transporté sous forme soluble ferreuse est oxydé à l'intérieur de la sphère et stocké sous forme de ferrihydrite $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

Les bactéries magnétotactiques découvertes il y a une trentaine d'années présentent la propriété de s'orienter dans le champ magnétique terrestre. Elles synthétisent, à l'intérieur de leur cytoplasme, des chaînes de micro-cristaux de magnétite Fe_3O_4 . Ces cristaux ferrimagnétiques sont allongés le long de leur axe de facile aimantation et alignés le long de la paroi bactérienne. Ils présentent des morphologies tout à fait particulières que certains pensent avoir retrouvé dans des météorites martiennes (ALH84001), d'où des controverses sur l'existence de la vie sur Mars !

Cours à l'Université de Montpellier **Élaboration de matériaux avancés par chimie douce** (4,5 heures)

En février nous avons donné trois séries de cours portant sur différents aspects de la chimie douce :

- Précipitation du carbonate de calcium — processus de nucléation-croissance, précipitation bio-induite et précipitation bio-contrôlée.
- Polymérisation de la silice : silice biogénique, précurseurs alcoxydes, précurseurs aqueux, les procédés sol-gel.
- Formation de polyvanadates : synthèse hydrothermale de clusters, synthèse et propriétés des gels $\text{V}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, synthèse de nanotubes et de mousses d'oxyde de vanadium.

Les séminaires « biominéralisation »

Nous avons organisé deux séries de séminaires.

La première (7 heures), présentée à la suite du cours, avait pour objet d'illustrer et de compléter celui-ci. Les thèmes traités ont été :

- Géomicrobiologie
par François Guyot, Université Paris VI
- Des bactéries pour la restauration des pierres
par Jean-François Loubières, Société Biocalcite
- Les matériaux du vivant
par Marie-Madeleine Giraud-Guille, EPHE
- Propriétés mécaniques des biomatériaux
par Philippe Boch, Université Paris VI
- La diagénèse de la silice
par François Frohlich, Muséum d'Histoire Naturelle
- Les phosphates et les os
par Christian Rey, Université de Toulouse
- Nanocristaux, contrôle de la forme et de la taille
par Marie-Paule Pileni, Université Paris VI

Une deuxième série de séminaires a été organisée avec Armand de Ricqlès sous forme d'un colloque de deux jours (15 et 16 mai 2003). Il avait pour but de rassembler les deux communautés, chimistes et biologistes, autour du thème de la biominéralisation afin de permettre une discussion et des échanges plus poussés. Le programme était :

1. La diversité des modèles biologiques

- La chimie des oxydes de fer, du cluster à l'oxyde en milieu naturel : ferrihydrite, rouilles vertes et magnétobactéries
Jean-Pierre Jolivet (Professeur, Université Paris VI)
- Protéines contrôlant la biominéralisation chez les bivalves
Frédéric Marin (UMR 5561, Université de Bourgogne)
- Le modèle de la coquille d'œuf d'oiseau
Yves Nys (Directeur de recherches à l'INRA, Tours)
- Biominéralisations chez les crustacés : stratégies de stockage
Gilles Luquet (UMR 5548, Université de Bourgogne)
- Interactions réseau organique et réseau minéral à l'échelle supramoléculaire : le crabe et l'os
Marie-Madeleine Giraud-Guille (EPHE, Paris VI)
- L'endolympe, milieu précurseur de la biominéralisation de l'otholite
Patrick Payan (Professeur, Université de Nice-Sophia-Antipolis)

- Biominéralisation des otholites chez le poisson zèbre
Philippe Herbomel (Biologie du développement, Institut Pasteur)
- Des ions au récif de corail : comment les coraux construisent-ils leur squelette ?
Denis Allemand (Professeur à l'Université de Nice-Sophia-Antipolis, Directeur du Centre Scientifique de Monaco)

2. Les biominéralisations apatitiques des vertébrés

- Les apatites des tissus durs : caractéristiques physico-chimiques et conséquences biologiques
Christian Rey (Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse)
- Protéines non collagéniques des matrices de la dentine et de l'émail. Implications dans la minéralisation ou molécules de signalisation ?
Michel Goldberg (Professeur à l'Université Paris V, Faculté de Chirurgie Dentaire, EA 2496)
- Données récentes sur les matrices contrôlant la biominéralisation apatitique : modèle de l'os
Louise Zylberberg (Directeur de recherches, UMR CNRS 8570, MNHN, Paris VI)

3. De la biogenèse à la fossilisation

- Silice biogénique et silice chimique
Thibaud Coradin (UMR CNRS 7574, Paris VI)
- La silicification des bactéries de l'Archéen inférieur (3,5 milliards d'années) jusqu'au Cénozoïque (10 millions d'années)
France Westall (Directeur de recherches, Centre de biophysique moléculaire, CNRS, Orléans)
- Détermination spectroscopique de l'origine biologique de la matière organique dans les roches archéennes
Didier Gourier (Professeur à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris)
- Historique des idées sur les processus de biominéralisation
Yves Bouligand (Directeur de recherche à l'EPHE, Angers)
- Discussion générale et conclusions

Activité scientifique

Notre activité de recherche s'inspire de l'exemple des processus de biominéralisation mis en œuvre par des micro-organismes tels que les diatomées. Pour cela, nous développons des méthodes de synthèse par chimie douce qui permettent d'associer matériaux et biologie. Comme l'année dernière, notre activité s'articule autour des trois thèmes suivants :

- Biominéralisation. Étude des processus de biominéralisation de la silice et synthèse de silice biomimétique.
- Morphogénèse chimique et oxydes de vanadium.
- Encapsulation de bactéries.

1. Silice biogénique et silice biomimétique

Cette étude comporte deux parties complémentaires portant sur la silice biogénique et la synthèse de silices biomimétiques. Une première étude, effectuée en collaboration avec l'équipe de François Frölich (Muséum National d'Histoire Naturelle), a permis de mettre en évidence la présence d'acide silicique dans des cultures de diatomées tandis que les frustules de diatomées fossiles sont beaucoup plus condensés.

Ce travail se poursuit actuellement en collaboration avec Pascal Lopez (ENS, Paris) sur des cultures de différentes espèces de diatomées afin d'extraire les caractéristiques physico-chimiques communes (degré de condensation, porosité, interactions silice-protéines). L'étude par RMN du ^{29}Si a montré que, contrairement aux indications de la littérature, la construction du squelette de silice dépendait fortement de l'espèce étudiée ainsi que des conditions de culture. Un contrôle de ces conditions, qui permet de bloquer les diatomées à des moments précis de leur cycle cellulaire, devrait permettre de préciser les mécanismes de formation des frustules de silice.

La deuxième partie de l'étude a pour objet d'analyser les processus de biominéralisation de la silice. On sait que celle-ci est contrôlée par la présence de certaines protéines qui favorisent la condensation de la silice. Afin de mieux identifier le rôle des acides aminés présents dans les chaînes peptidiques, nous avons choisi un système modèle utilisant l'acide silicique aqueux comme précurseur. Nous avons pu montrer que deux peptides, la poly-lysine et la poly-arginine, favorisaient particulièrement la condensation de la silice. Ces études, menées en fonction du pH et de la longueur de la chaîne polymère, nous ont amené à proposer un modèle d'activation mettant en jeu l'adsorption des silicates sur les peptides, ces silicates servant de sites de nucléation pour la formation du gel de silice. Cette étude a été étendue à des nano-particules de silice qui peuvent être, en présence des mêmes peptides, assemblées en chapelets sur les chaînes de polymère avant de former un solide. Ces résultats renforcent la validité de notre modèle puisque les acides aminés identifiés, lysine et arginine, sont présents en quantité importante dans les protéines extraites des diatomées.

Cette étude est actuellement étendue à des protéines plus complexes, le lysozyme et l'albumine de sérum bovin (ASB), riches en lysine et arginine. Nous avons pu montrer que le lysozyme avait un effet comparable aux poly-acides aminés mais que, du fait de la répartition des groupes amines sur la chaîne peptidique, son activité de précipitation était moins efficace. Pour sa part, l'ASB

en milieu acide interagit avec les silicates pour former un gel organo-minéral. Il semble que la formation de ce gel, essentiellement organique, soit due à la présence des espèces minérales qui modifient les interactions protéine-protéine. En retour, la condensation de ces espèces silicatées contrôlée par la formation de ce gel, conduit à un contrôle partiel de la taille des particules de silice formées. Cette étude se poursuit actuellement avec la gélatine, les premiers résultats indiquant qu'à l'inverse de l'ASB, la présence des silicates semble limiter, voire inhiber, la formation du gel protéique.

2. Morphogenèse chimique des oxydes de vanadium

Pendant longtemps, la chimie du solide a été centrée sur l'étude des relations structure-propriétés. L'établissement de telles corrélations nécessitait de travailler sur des systèmes modèles, donc des monocristaux. La forme des objets synthétisés par les chimistes du solide était alors limitée par la symétrie cristalline. L'observation de la nature montre que les solides biologiques présentent souvent des morphologies complexes et des structures hiérarchisées sur plusieurs échelles.

Notre connaissance de la chimie sol-gel nous ouvre de nouvelles voies de synthèse par chimie douce et nous permet de contrôler chimiquement l'évolution des espèces tout au long de la chaîne qui va du précurseur moléculaire au solide.

Notre étude porte sur les gels d'oxyde de vanadium $V_2O_5 \cdot nH_2O$, matériau que nous connaissons bien et qui, en tant que « matière molle », peut s'adapter à la réalisation de morphologies originales. Il n'intervient pas dans les processus de biominéralisation mais ses propriétés particulières (électroniques, ioniques, optiques, ...) pourraient conduire à des matériaux nano-structurés intéressants.

Nanotubes d'oxyde de vanadium

Nous continuons nos études sur les nanotubes d'oxyde de vanadium synthétisés à partir de gels de $V_2O_5 \cdot nH_2O$. Ces nanotubes creux sont formés par l'enroulement des feuillets d'oxyde de vanadium entre lesquels sont intercalées les molécules d'amines. La longueur des tubes est comprise entre 1 et 3 μm et leur diamètre entre 50 et 100 nm. Nous essayons de comprendre les mécanismes de formation de ces nanotubes. Nous avons tout d'abord vérifié que le traitement hydrothermal des gels conduisait bien à des nanotubes analogues à ceux décrits dans la littérature, puis nous avons cherché à optimiser les paramètres de synthèse (température, durée du traitement hydrothermal, quantité des réactifs). Les échantillons ont été caractérisés par différentes techniques notamment par diffraction des rayons X et par microscopie électronique à transmission et à balayage. Cette étude est actuellement en cours et s'étend à d'autres précurseurs de vanadium notamment au degré d'oxydation (IV).

Mousses d'oxyde de vanadium

Les gels utilisés pour la synthèse des nanotubes sont formés par action de l'eau oxygénée sur V_2O_5 . La réaction, assez violente, conduit à la solubilisation de complexes peroxy qui se transforment ensuite progressivement en un gel rouge foncé. Le traitement hydrothermal de ce gel en présence d'alkylamines conduit à la formation des nanotubes.

Nous avons observé que la morphologie du produit obtenu dépendait en fait de l'ordre dans lequel les réactifs sont mélangés. En particulier, si on fait réagir l'oxyde de vanadium cristallisé avec l'alkylamine, on obtient tout d'abord un produit pâteux brun-rouge. L'addition rapide d'eau oxygénée conduit à un phénomène de moussage impressionnant qui, en quelques minutes, transforme 1 gramme d'oxyde en près de 3 litres de mousse. Cette mousse macroporeuse présente une texture alvéolaire en nid d'abeilles dans laquelle des pores de quelques microns de diamètre sont séparés par des murs d'environ un micron d'épaisseur. Ces mousses ultra-légères peuvent être facilement broyées en poudre. L'analyse par diffraction des rayons X de cette poudre présente une série de cinq raies $00l$ très fines qui montrent que l'oxyde macroporeux présente une structure lamellaire parfaitement définie, formée de feuillets d'oxydes entre lesquels s'intercalent les amines à longue chaîne. La distance inter-feuillets de 33,4 Å correspond à celle qui avait été observée lors de l'intercalation d'hexadécyl amine dans les gels d'oxyde de vanadium. La coloration jaune vif de ces mousses suggère que le vanadium n'a pas été réduit, contrairement à ce que l'on observe en l'absence d'alkyl amines. Effectivement, les expériences de RPE ne mettent en évidence qu'un signal très faible de V^{4+} . Par contre la RMN-MAS du ^{51}V montre que les ions V^{5+} sont dans un environnement pyramidal à base carrée [VO_5]. Les mousses obtenues sont fortement hydrophobes en raison des chaînes alkyles. Les composantes organiques sont éliminées progressivement par traitement thermique au-dessus de 200 °C. Le traitement hydrothermal de ces mousses conduit à des nanotubes analogues à ceux décrits précédemment.

Minéralisation à l'interface oxyde de vanadium-peptides

Les études effectuées sur les systèmes à base d'oxyde de vanadium ont montré l'importance des espèces étrangères sur la morphologie des solides obtenus (clusters, feuillets, nanotubes, mousses). C'est pourquoi, dans le cadre de la biominéralisation nous nous sommes intéressés à la nature chimique de l'interface entre un oxyde de vanadium et des molécules organiques ou biologiques. Pour cela nous avons synthétisé des complexes de vanadium capables de modéliser les interactions vanadium-molécules biologiques. Nous avons travaillé avec une série de cinq dipeptides : Valine-Glutamine (Val-Gln), Alanine-Glutamine (Ala-Gln), Glycine-Glutamine (Gly-Gln), Glycine-Acide Glutamique (Gly-Glu) et Alanine-Glycine (Ala-Gly). Ces dipeptides ont été choisis pour estimer le rôle de la séquence en acides aminés sur la nature et la force des interactions avec le

vanadium. Les complexes ont été caractérisés par spectroscopie en solution : UV-visible, RMN (^{51}V , ^1H , ^{13}C , ^{14}N). Nous avons pu montrer que la vanadium est complexé par les fonctions amine et carboxylate terminales ainsi que par l'azote du groupe peptidique. Le calcul des constantes de formation nous a d'autre part montré que la nature de la chaîne latérale notamment son encombrement stérique modifie fortement la stabilité des complexes vanadium-dipeptides.

Ce travail se poursuit dans le cadre de la thèse d'Olivier Durupthy. Il a pour objet de synthétiser des oxydes de vanadium (V) et (IV) en présence de polymères biologiques (essentiellement polypeptides, protéines). Nous étudions l'addition de différentes molécules biologiques au sein de l'oxyde de vanadium en cours de polymérisation et cherchons à déterminer l'influence de ces molécules sur la forme, la taille et l'organisation des particules au sein du gel. Ce travail nécessite au préalable une parfaite caractérisation des gels ainsi que l'étude de l'influence du pH et de la force ionique dans la formation des gels. Nous envisagerons également de déstabiliser une solution colloïdale de particules d'oxyde de vanadium par addition de molécules biologiques. Enfin dans un avenir plus lointain, la comparaison avec des oxydes de vanadium synthétisés en voie organique à partir d'alcoxydes de vanadium (V) serait également intéressante.

3. Viabilité des bactéries au sein de gels de silice

Les études précédentes nous avaient montré que des bactéries (*Escherichia coli*), préalablement induite à une enzyme intracellulaire (β -galactosidase), présentaient après encapsulation une activité β -galactosidase qui suivait une loi de Michaelis. La valeur limite de vitesse (V_{max}) atteignait une valeur comparable à celle obtenue pour une suspension bactérienne et aucune décroissance n'était observée en présence d'un excès de substrat. La constante de Michaelis des bactéries encapsulées était légèrement inférieure à celle des bactéries libres indiquant une bonne affinité enzyme-substrat. Par contre, nous avons constaté que les parois des bactéries avaient tendance à se lyser. Nous avons donc cherché à améliorer les techniques d'encapsulation afin de préserver la viabilité des bactéries.

En nous inspirant de l'exemple des diatomées, nous avons mis au point une nouvelle synthèse de silice en milieu purement aqueux en utilisant un mélange de silicate de sodium et de nanoparticules de silice. Pour mieux déterminer la viabilité des bactéries, nous avons adapté les techniques de microbiologie (numération et incorporation de glucose enrichi), développées par Odile Bouvet, aux bactéries encapsulées dans les matrices les plus prometteuses, c'est-à-dire celles obtenues par voie aqueuse. Ces techniques mettent en évidence non seulement l'intégrité membranaire mais également l'intégrité métabolique. La numération sur boîte de Pétri donne le pourcentage de bactéries viables et cultivables après qu'elles aient été redéposées dans un milieu nutritif riche, tandis que l'incorporation de D-glucose donne la quantité de bactéries viables (cultivables ou non). La

différence entre numération et incorporation de glucose donne le nombre de bactéries viables non cultivables qui dépend de l'état de stress des bactéries encapsulées. L'incorporation de glucose a été suivie par mesure de radioactivité en utilisant du glucose enrichi en ^{14}C et par RMN liquide avec du D-glucose enrichi en ^{13}C . Cette dernière méthode permet de déterminer la nature des produits formés au cours du métabolisme. Après encapsulation dans une matrice de silice, 60 % des bactéries sont encore viables et cultivables. Elles sont capables de métaboliser entièrement le glucose enrichi ^{13}C et produisent les métabolites usuels de fermentation tels que l'éthanol, le lactate, l'acétate et le succinate. Après un mois de vieillissement sans nutriment, il ne reste plus que 10 % de ces bactéries viables et cultivables. Le glucose n'est quasiment plus métabolisé et les produits de fermentation ne sont pratiquement plus décelables. Ces résultats montrent que l'encapsulation génère un stress provoquant la mort rapide de quasiment la moitié des bactéries et que la matrice ne permet pas de protéger les bactéries viables contre un vieillissement naturel sans nutriments.

Pour améliorer la survie des bactéries, nous avons choisi d'ajouter, avant encapsulation, un additif soluble dans l'eau, biocompatible et n'étant pas une source nutritive. Selon ces critères, nous avons sélectionné trois additifs : la gélatine (pouvant limiter les interactions non spécifiques silice-bactérie), l'alcool polyvinylique (stabilisateur d'enzymes) et le glycérol (agent osmoprotecteur). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le glycérol à 10 %. 80 % des bactéries sont alors viables et cultivables après l'encapsulation. D'autre part, l'addition de glycérol permet de préserver, après vieillissement d'un mois, la viabilité de 55 % de ces bactéries dont la majorité sont encore cultivables (40 %). Le glucose enrichi ^{13}C n'est pas entièrement métabolisé cependant les produits usuels de fermentation sont décelés. Il faut noter que le glycérol ajouté à des suspensions bactériennes ne joue qu'un rôle protecteur minime puisque au bout d'un mois parmi les 60 % des bactéries encore viables seulement 10 % sont cultivables.

Après avoir montré que des bactéries encapsulées pouvaient rester viables pendant un mois en l'absence de nutriments, nous avons cherché à savoir si elles étaient encore capables de synthétiser des protéines à partir d'acides aminés. Cette étude portait sur les *E. Coli* encapsulées dans une matrice aqueuse en présence de glycérol. Après un vieillissement de 1 à 30 jours sans nutriment, nous avons ajouté dans les gels un milieu nutritif constitué d'acides aminés marqués [^{35}S]méthionine, de casaminoacides et d'extraits de levure. Les protéines formées ont été précipitées par de l'albumine de sérum bovin puis dosées par mesure de radioactivité. Nous observons qu'après un mois sans nutriment, 25 % des bactéries encapsulées sont encore capables de synthétiser des protéines.

PUBLICATIONS 2002-2003

- Cubane shaped cluster, precursors for aluminophosphate frameworks : a solid state multinuclear NMR study, in time and frequency domains
T. Azais, C. Bonhomme, L. Bonhomme-Coury, J. Waissermann, Y. Millot, P.P. Man, P. Bertani, J. Hirschinger, J. Livage
J. of the Chemical Society, Dalton Transactions, 2002, pp. 609-618
- Interactions of amino-containing peptides with sodium silicate and colloidal silica : a biomimetic approach of silicification
T. Coradin, O. Durupthy, J. Livage
Langmuir, Vol. 18, 2002, pp. 2331-2336
- Biomimetic self-activated formation of multi-scale porous silica in the presence of arginine-based surfactants
T. Coradin, C. Roux, J. Livage
J. Mater. Chem., Vol. 12, 2002, pp. 1242-1244
- Macroporous crystalline vanadium oxide foam
G.T. Chandrappa, N. Steunon, J. Livage
Nature, Vol. 416, 2002, pp. 702-
- Living bacteria in silica gels
N. Nassif, O. Bouvet, M.N. Rager, C. Roux, T. Coradin, J. Livage
Nature Materials, Vol. 1, 2002, pp. 42-44
- Hydrothermal synthesis and characterization of $(\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3)(\text{V}_6\text{O}_{14})$
F. Sediri, N. Etteyeb, N. Steunou, C. Guyard-Duhayon, J. Maquet, N. Gharbi, J. Livage
J. of Solid State Chemistry, Vol. 167, 2002, pp. 407-411
- Hydrothermal synthesis of vanadium oxide nanotubes from V_2O_5 gels
G.T. Chandrappa, N. Steunou, S. Cassaignon, C. Bauvais, J. Livage
Catalysis Today, Vol. 2815, 2002, pp. 1-5
- Synthesis and characterization of alginate/silicate biocomposites.
T. Coradin, J. Livage
J. of Sol-Gel Science and Technology, 2003, pp. 1165-1168
- Intercalation of biomolecules in the MnPS_3 layered phase
T. Coradin, A. Coupé, J. Livage
J. Mater. Chem., Vol. 13, 2003, pp. 705-707
- Viability of bacteria in hybrid aqueous silica gels
N. Nassif, A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, J. Livage
J. of Sol-Gel Science and Technology, Vol. 26, 2003, pp. 1141-1144
- Vanadium oxide, from gels to nanotubes
G.T. Chandrappa, N. Steunou, S. Cassaignon, C. Bauvais, P.K. Biswas, J. Livage
J. Sol-Gel Sci. Techn. 26, 2003, pp. 593-596

- Spectroscopic characterization of biogenic silica
A. Gendron-Badou, T. Coradin, J. Maquet, F. Fröhlich, J. Livage
J. Non-Cryst. Solids, 316, 2003, pp. 331-337
- Interaction of bovin serum albumin and lysozyme with sodium silicate solutions.
T. Coradin, A. Coupé, J. Livage
Colloids and Surface B : Biointerfaces, 29, 2003, pp. 189-196
- Toward smart artificial muscles
J. Livage
Nature Materials, 2, 2003, pp. 297-299
- Mesoporous alginate/silica biocomposites for enzyme immobilization
T. Coradin, J. Livage
C.R. Acad. Sci. Chimie, 6, 2003, pp. 147-52
- Hydrothermal synthesis of $[\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3][\text{V}_4\text{O}_{10}]$
F. Sediri, N. Etteyeb, N. Gharbi, J. Livage
Ann. Chim. Sci. Mat. 28, 2003, pp. 129-34
- Optical and electrochromic properties of sol-gel WO_3 films on conducting glass
P.K. Biswas, N.C. Pramanik, M.K. Mahapatra, D. Ganguli, J. Livage
Materials Letters, 4536, 2003, pp. 1-4

ACTES DE CONGRÈS

- Vanadium oxide from gels to nanotubes
G.T. Chandrappa, N. Steunou, S. Cassaignon, C. Bauvais, P.K. Biwswas, J. Livage
International Conference on Advances in Materials and Materials Processing, 2002, pp. 381-385
- Monitoring the Viability of Encapsulated Bacteria in Sol-Gel Materials
N. Nassif, T. Coradin, C. Roux, O. Bouvet, J. Livage
Xth International BRG Workshop on Bioencapsulation : Cell Physiology and Interactions of Biomaterials and Matrices, 2002
- Influence of DNA, alginate, lysozyme and bovine serum albumin on sodium silicate condensation
T. Coradin, A. Coupé, J. Livage
Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 2002, pp. N.7.20.1
- A novel route to collagen-silica biohybrids
T. Coradin, M.M. Giraud-Guille, C. Helary, J. Livage, C. Sanchez
Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 2002, pp. Q5.2.1

CONFÉRENCES INVITÉES

- Unusual forms of titanium dioxide
Scientific Conference of Millennium Chemicals
Mulhouse, 7-8 février 2002
- Living cells in silica
Int. Workshop on Bioinspired Approaches for Advanced Materials
Schloss Ringberg, 11-15 mars 2002
- Les chimistes à l'école des diatomées
40^e conférence du GPLF, les protistes marins
La Rochelle, mai 2002
- Bioencapsulation of bacteria in silica gels
CIMTECH 2002, Florence, Italie, juillet 2002
- Biological applications of silica gels
European Colloid and Interface Society meeting, Paris, 22-27 septembre 2002
- Sol-gel glasses
Université de Delhi, Inde, 4 mars 2003
- From egyptian glasses to biogenic silice
Alliance française, Bangalore, Inde, 5 mars 2003
- Unusual forms of vanadium oxides
Université de Bangalore, Inde, 6 mars 2003
- De l'art du feu à la chimie douce
SFC, Marseille, 3 avril 2003
- Bioencapsulation in silica colloids
Int. Symposium on Materials Processing for Nanostructured Devices
Nouan le Fuselier, France, 4-7 mai 2003
- La chimie douce
SFC, Brest, 12 mai 2003
- Bioencapsulation within silica gels
7th FIGIPS (conférence plénière)
Lisbonne, Portugal, 11-14 juin 2003
- Biological applications of silica gels
11th ICSCS (conférence plénière)
Iguazu, Brésil, 15-19 septembre 2003
- Cells in nanopores
MRS meeting, Boston, USA, 1-5 décembre 2003