

Etude 3D par cryo-TEM “résolue en temps” de la cristallisation de CaCO₃ sur un template organique auto-assemblé

E.Pouget^{1,2}, B.P. Pichon¹, P.H.H. Bomans^{2,3}, P. M. Frederik^{2,3}, and N.A.J.M Sommerdijk^{1,2}

¹ Laboratory for Macromolecular and Organic Chemistry, Eindhoven University of Technology, P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven, The Netherlands,

² SoftMatter CryoTEM Unit, Eindhoven University of Technology, P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven, The Netherlands, e.pouget@tue.nl

³ EM Unit, Department of Pathology, University of Maastricht, Universiteitssingel 50, 6229 ER Maastricht, The Netherlands.

Résumé - L'étude de la biominéralisation du carbonate de calcium sur des matrices organiques présente un grand intérêt pour la recherche de nouveaux matériaux biocompatibles. Les tout premiers stades de cette nucléation semblent jouer un rôle d'une grande importance. L'étude présentée ici a pour but d'étudier ces premières étapes de minéralisation en utilisant la cryo-microscopie électronique en transmission comme technique "résolue en temps". Une combinaison entre la cryo-tomographie et la diffraction électronique permet ensuite de caractériser les échantillons obtenus.

Dans la nature, nombre d'organismes animaux ou végétaux présentent des formes très complexes composées de matière inorganique, dont le carbonate de calcium est l'une des plus abondantes. Ces structures sont formées par la cristallisation du composé inorganique sur une matrice organique appelée "template". De précédentes études ont montré que la nature du template organique influence fortement la sélection du polymorphe, l'orientation cristallographique ainsi que la morphologie des cristaux inorganiques obtenus. Inspiré par ces systèmes biologiques, le contrôle de la cristallisation biomimétique du carbonate de calcium est actuellement étudié par un grand nombre de chercheurs dans le but de former de nouveaux biomatériaux. [1]

Dans l'étude présentée ici, des auto-assemblages organiques sont utilisés comme templates dans le but de comprendre en détail le rôle du template organique dans les toutes premières étapes de la minéralisation du carbonate de calcium. Les templates organiques utilisés sont des surfactants bis-uré qui, dans l'eau, interagissent par liaisons hydrogènes, formant ainsi des rubans. Ces molécules possèdent des terminaisons amine ou acide qui jouent le rôle de point de nucléation pour les ions CO₃²⁻ ou Ca²⁺ respectivement. Les études sur le mécanisme de nucléation reportées dans la littérature portent généralement sur la caractérisation des cristaux matures. Certains travaux portent sur les premières étapes de cristallisation, mais les cristaux sont étudiés après transfert sur les grilles de microscopie électronique en transmission qui peut engendrer des artefacts. Pourtant, il est généralement admis que d'importants changements et interactions ont lieu dans les tout premiers stades de la cristallisation et seuls quelques articles montrent des techniques in-situ sur l'étude de la formation biomimétique ou naturelle du minéral. [2,3] Ces études montrent la formation initiale de carbonate de calcium amorphe, qui semble jouer un rôle particulièrement important. [4]

Ici, la nucléation du carbonate de calcium sur les surfactants organiques est étudiée par une nouvelle méthode combinant la cryo-TEM, la tomographie et la diffraction électronique. La cryo-TEM permet l'obtention de résultats "résolus en temps". En effet, la réaction a lieu directement sur la grille de microscopie électronique couverte d'un film de carbone troué (holey carbone) et le temps de réaction est contrôlé par la vitrification de l'échantillon dans l'éthane liquide à des moments très précis. Toutes les expériences sont réalisées dans une chambre

permettant le contrôle environnemental (Vitrobot). Lors de la réaction, les rubans sont déposés sur la grille puis le surplus de liquide est éliminé, dans une atmosphère saturée en eau afin de ne pas déshydrater l'échantillon. Une goutte de CaCl_2 est ensuite déposée sur la grille puis une atmosphère saturée en NH_3 et CO_2 est générée, entraînant ainsi la formation des cristaux CaCO_3 par réaction entre les ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} . La vitrification des échantillons a alors lieu après un temps compris entre 30s et 10min, après élimination du surplus de liquide (Figure 1).

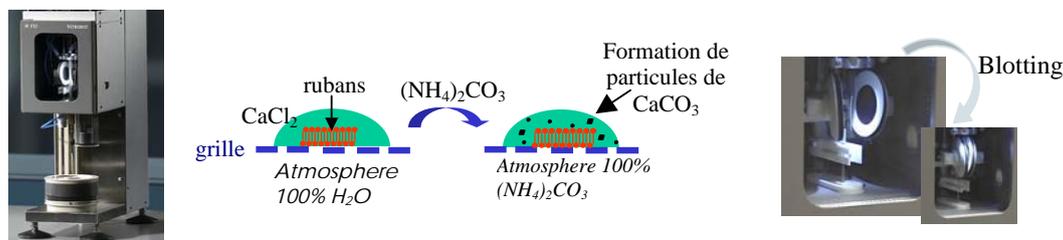


Figure 1 – Schéma de préparation des échantillons directement sur la grille, sous atmosphère contrôlée au sein du Vitrobot.

Cette technique “résolue en temps” permet d’étudier la conversion des particules de carbonate de calcium amorphe en cristaux de calcite orientés sur le template. De plus, la cryotomographie électronique permet une vue en 3 dimensions du développement des particules de CaCO_3 (Figure 2) et de leur interaction avec le template. Les premiers résultats indiquent qu’aux tout premiers stades, des particules amorphes sont formées dans la solution, avant la nucléation orientée de ceux-ci sur le template.

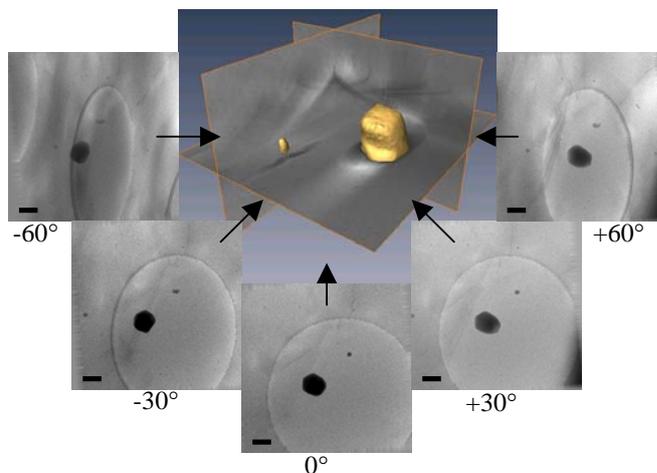


Figure 2 – Images de tomographie en cryo-microscopie électronique, et la reconstruction 3D faite à partir de cette série d'images.

Références :

- ¹ S. Mann, *Biomaterialization, Principles and concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford press, (2001).
- ² A. Berman, D. J. Ahn, A. Lio, M. Salmeron, A. Reichert, D. Charych, *Science*, **269**, 515. (1995)
- ³ E. DiMasi, M.J. Olszta, V.M. Patel, L.B. Gower, *Cryst. Eng. Comm*, **5**, 346 (2003)
- ⁴ Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, L. Addadi, *Science*, **306**, 1161 (2004)