



HAL
open science

Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux

Yan Wang

► **To cite this version:**

Yan Wang. Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66484 . tel-00839469

HAL Id: tel-00839469

<https://theses.hal.science/tel-00839469v1>

Submitted on 28 Jun 2013

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physique et Chimie des Matériaux (ED 397)

Présentée par

Yan WANG

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse

**Elaboration de modèles collagène/apatite
pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux**

devant le jury composé de :

M. Christian REY	Professeur – CIRIMAT, Toulouse	Rapporteur
M. Marc BOHNER	Professeur – RMS, Suisse	Rapporteur
M. Jean-Marie NEDELEC	Professeur – ICCF, Clermont-Ferrand	Examinateur
M. Franck FAYON	Chargé de Recherche – CEMHTI, Orléans	Examinateur
M. Thierry AZAIS	Maître de Conférence – LCMCP, Paris	Examinateur
Mme. Marie-Madeleine GIRAUD-GUILLE	Professeur – LCMCP, Paris	Examinatrice
Mme. Florence BABONNEAU	Directrice de Recherche – LCMCP, Paris	Directrice
Mme. Nadine NASSIF	Chargée de Recherche – LCMCP, Paris	Co-directrice

Introduction Générale

La biomiméralisation est un processus dynamique selon lequel les organismes vivants élaborent des structures minéralisées (mollusques, vertébrés, etc). Dans ce vaste domaine de science, nous nous sommes intéressés à la minéralisation du tissu osseux dont le mécanisme de formation reste un sujet de débat dans la littérature. La longue durée de ce débat est principalement due à la difficulté d'observer directement les tissus *in vivo*.

Un modèle mimétique du tissu osseux pourrait nous apporter plus d'informations sur le mécanisme de formation de ce tissu (morphogénèse), et ainsi mieux comprendre la biominéralisation. L'objectif de cette thèse a été de mettre en place une synthèse de matrice mimétique du tissu osseux afin d'éclaircir le rôle des principaux composants de ce tissu.

La conception d'un matériau « biomimétique » du tissu osseux ne repose pas toutefois que sur le mélange de ses principaux composants. Il s'agit, en effet, de mettre en place un modèle complet, c'est-à-dire intégrant l'architecture des phases organique (collagène) et inorganique (apatite) et ainsi reproduire l'interface entre ces deux phases.

Ce travail de thèse a porté de ce fait sur quatre domaines principaux, très différents, à savoir : (i) les propriétés d'auto-assemblage de type cristal-liquide du collagène ; (ii) la synthèse par voie aqueuse de nanoparticules d'apatite ; (iii) la synthèse de matériaux composites collagène/apatite et (iv) l'étude des interfaces. Il va de la maîtrise de l'auto-assemblage des polymères biologiques, aux synthèses de nanoparticules minérales ; de la connaissance et compréhension bibliographique concernant la biominéralisation du tissu osseux, à l'étude de l'interface organo-minérale par RMN à l'état solide. Chaque domaine ayant leurs propres enjeux et problématiques, nous avons choisi de répartir les études bibliographiques ainsi que le contexte et l'objectif de chaque partie de notre étude dans leur chapitre respectif.

La littérature propose de nombreux modèles de biominéralisation allant du tendon isolé à des matrices de collagène à très faibles concentrations. Néanmoins aucun d'entre eux ne permet de recréer l'organisation tridimensionnelle et la densité du collagène dans le tissu osseux. La mise en place d'un procédé d'élaboration de matrices denses fibrillaires de collagène a été nécessaire, dans un premier temps, pour obtenir une matrice mimétique du tissu osseux.

Au commencement de cette thèse, la préparation de cristaux liquides de collagène (de type cholestérique) et la fibrillogénèse associée pour former des matrices denses étaient

maîtrisées depuis longtemps au laboratoire. De plus, des matrices de collagène dont la densité et l'organisation tridimensionnelle sont proches de celles du tissu osseux ont déjà été minéralisées. Néanmoins, la minéralisation de ces matrices de collagène est réalisée en présence d'un polymère synthétique acide (polyaspartate) pour réaliser la co-alignment entre les plaquettes minérales et les fibrilles de collagène tel que cela est décrit dans l'os. De plus, le degré de minéralisation de la matrice organique est faible. Enfin, l'obtention lors des synthèses effectuées au laboratoire d'une matrice dense de collagène dont, d'une part, les fibrilles ont une taille homogène et, d'autre part, l'organisation tridimensionnelle est reproductible reste toujours difficile. Le collagène n'est pas un biopolymère très aisément manipulable à cause de sa viscosité croissante avec la concentration. Il était donc important d'élaborer un nouveau procédé de préparation de matrice de collagène afin de réaliser une matrice dense de collagène qui remplissent les critères énoncés ci-dessus.

La phase minérale du tissu osseux ayant une structure cristalline proche de l'hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, nous nous sommes intéressés à différents modes de synthèse d'apatite au laboratoire. Sachant que la substitution principale dans la phase minérale du tissu osseux est effectuée par les ions carbonates, nous avons d'abord étudié l'influence du taux de carbonate sur la nature de nanoparticules d'apatite carbonatée. Nous avons ensuite comparé différentes apatites carbonatées de synthèse avec l'apatite biologique afin de mettre en évidence les spécificités des apatites biologiques et d'affiner la caractérisation des apatites « biomimétiques » obtenues précédemment au laboratoire.

Ensuite, en vue de l'élaboration d'un modèle « biomimétique » de la matrice osseuse, à savoir une matrice hybride collagène/apatite, il nous est apparu indispensable de concentrer le collagène et d'induire la fibrillogénèse en présence des précurseurs ioniques de la phase minérale afin de mimer le fluide physiologique extracellulaire présent pendant la formation du tissu osseux *in vivo*. Le choix des concentrations en précurseurs ioniques a été basé, soit sur la concentration du fluide physiologique extracellulaire en utilisant une solution communément appelée « SBF » pour Simulated Body Fluid dont la composition ionique vise à mimer celle du plasma sanguin humain, soit sur une synthèse dite bioinspirée d'apatites dont la structure finale est décrite comme biomimétique.

Dans un premier temps, la synthèse des matrices hybrides collagène/apatite a été effectuée par voie physico-chimique, c'est-à-dire en présence des composants principaux du tissu osseux (collagène, apatite et eau) mais en absence de cellules. Dans un second temps,

nous avons décidé d'ajouter à notre modèle d'autres molécules organiques afin de mimer plus finement la composition de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Ces autres composants organiques, telles que les protéines non collagéniques (NCPs) dites « minéralisantes », sont décrites comme indispensables pour réaliser, entre autre, le co-alignement des fibrilles de collagène avec la phase d'apatite dans les études de minéralisation *in vitro*. Ainsi, ces différentes synthèses ont eu pour objectif d'éclaircir aussi bien l'influence de la densité et de l'organisation hiérarchique de la matrice de collagène sur la phase minérale dans le tissu osseux que d'étudier la formation de la phase minérale au sein des fibrilles de collagène, afin d'évaluer l'implication des molécules organiques pendant la minéralisation.

Nos échantillons ont été caractérisés par de nombreuses techniques, telles que les spectroscopies (Résonance Magnétique Nucléaire, Infrarouge), les microscopies (à Balayage et à Transmission classique/Cryo-méthodes), et par diffraction des Rayons X aux grands angles. Parmi toutes ces techniques, la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire à l'état solide nous est apparue comme la mieux adaptée pour l'étude de l'interface organo-minérale. Pour cela, nous avons confronté la caractérisation de matrices osseuses « fraîchement » prélevées à nos modèles plus simples (mais déjà complexes) afin de tenter élucider les interactions mises en jeu.

Le manuscrit est articulé suivant le plan suivant :

- Le premier chapitre va donc porter sur « Composante organique principale du tissu osseux : le collagène »
- Le deuxième chapitre traitera de la « Composante minérale du tissu osseux : l'hydroxyapatite »
- Ensuite, la « Minéralisation des matrices denses de collagène » sera présentée dans le troisième chapitre.
- Dans le quatrième chapitre, nous nous focaliserons sur « Etude de l'interface collagène / apatite »

Enfin, l'ensemble des procédures et techniques expérimentales utilisées pendant cette thèse sont regroupées à la fin de ce manuscrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

Chapitre I. La composante organique principale du tissu osseux : le collagène

I.	Molécules, cristaux liquides et matrices denses.....	5
1.	Composition, structure et organisation du collagène	6
1.1	La molécule de collagène.....	6
1.2	Formation de fibrilles de collagène <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	7
1.3	L'organisation tridimensionnelle du collagène en solution	9
1.4	Stabilisation de l'organisation de la solution de collagène	10
2.	Procédés de préparation de matrices denses de collagène	12
II.	Matrices denses de collagène mimétiques de la matrice organique du tissu osseux.....	15
1.	Nouveau procédé de préparation des matrices de collagène.....	15
2.	Caractérisation des matrices de collagène.....	16
2.1	Organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène	17
2.2	Rôle de l'eau sur l'organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène	24
2.3	Matériaux mimétiques des tissus biologiques.....	26
III.	Conclusions	28
	Références bibliographiques	30

La composante organique principale du tissu osseux : le collagène

I. Molécules, cristaux liquides et matrices denses

Les tissus biologiques d'une façon générale sont composés de cellules, d'une trame organique et d'une phase minérale, ces deux dernières formant la matrice extracellulaire (MEC). La MEC désigne tous les composants matriciels dans l'espace extracellulaire de tous les types de tissus (conjonctif, musculaire, nerveux et épithéliums) (Place, 2009). Les principales macromolécules de la MEC sont des polysaccharides (glycosaminoglycanes (GAGs) et protéoglycanes) et des protéines fibreuses, de structure (collagènes et élastine) ou d'adhérence (fibronectine et laminine). La MEC donne une structure à l'organe et joue un rôle important comme « support » pour l'attachement et la migration des cellules. Ces macromolécules des matrices extracellulaires participent ainsi aux propriétés mécaniques des tissus, assurant une résistance aux forces de traction. Ces propriétés mécaniques sont fortement liées à la présence et à l'organisation du collagène lorsqu'il est l'un des composants.

En effet, le collagène est la protéine la plus abondante chez les animaux, elle représente 25 à 30% de toutes les protéines de l'organisme humain. Il existe une vingtaine de types de collagène, chacun possédant une structure propre et se retrouvant dans des organes particuliers (Engel, 1997 & Silver, 2002). Le collagène de type I intervient majoritairement dans la structure de la peau, des tendons, des os et de la cornée où l'arrangement spatial des fibrilles de collagène y est spécifique (Bailey, 1998 & Hanson, 1996); le type II est présent essentiellement dans les cartilages ; tandis que le type III se retrouve principalement au niveau du système cardiovasculaire. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au collagène de type I qui joue un rôle structural important dans un tissu conjonctif spécialisé tel que l'os. Le collagène de type I représente environ 20% en masse et 30% en volume de l'os (Pasteris, 2008). Il est le collagène le plus abondant (90%) dans ce tissu (Veis, 1984).

1. Composition, structure et organisation du collagène

1.1 La molécule de collagène

La molécule de collagène est une triple hélice de chaînes polypeptidiques. Contrairement aux chaînes peptidiques, elle est en hélice droite. Chaque chaîne peptidique est composée d'un millier d'acides aminés (Woodhead-Galloway, 1982). Une chaîne polypeptidique est une hélice gauche (Fig. 1A) où les séquences d'acides aminés Glycine-Proline-X et Glycine-X-Hydroxyproline y sont répétées, X pouvant être divers autres acides aminés (Prockop, 1984). La distance entre deux résidus d'une chaîne peptidique, appelée **distance longitudinale**, est 0,31 nm (Glimcher, 1960) et de 0,287 nm au sein de la triple hélice (Woodhead-Galloway, 1982). Les chaînes polypeptidiques sont séparées de 0,45 nm. Le pas d'une triple hélice (rotation de 360°) est d'environ 30 acides aminés, soit 8,5 nm (Fig. 1B). La longueur d'une molécule de collagène est de 300 nm et le diamètre de 1,2 nm (Fig. 1C), sa masse moléculaire est comprise entre 285 000 et 300 000 daltons (Woodhead-Galloway, 1982).

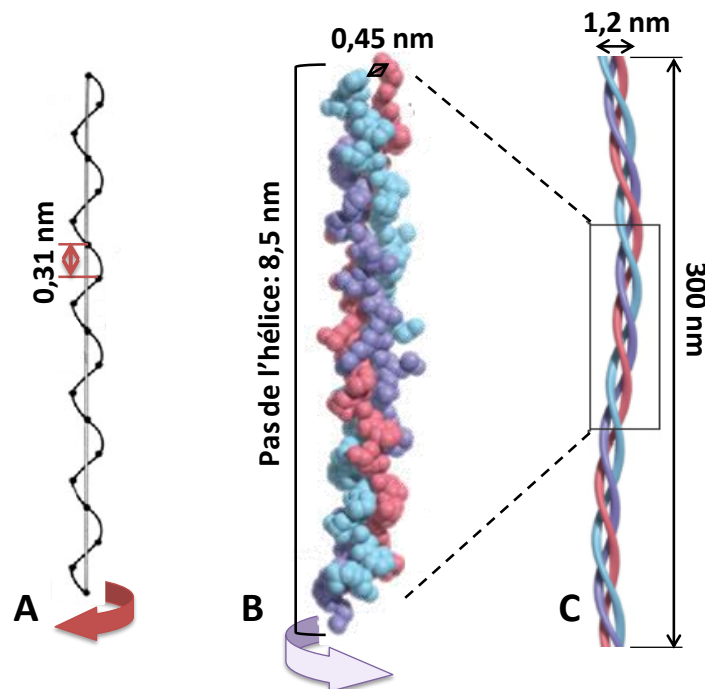


Figure 1: Schéma d'une chaîne peptidique (A) et de molécules de collagène (B)(C) : (A) les chaînes polypeptidiques sont des hélices gauches ; La distance entre deux résidus adjacents (distance entre deux points noirs) est 0,31 nm. (B) Les chaînes polypeptidiques sont séparées de 0,45 nm, le pas de l'hélice étant de 8,5 nm (C) la longueur et le diamètre d'une molécule de collagène sont respectivement 300 et 1,2 nm.

Les principaux résidus sur l'ensemble de la protéine, sont de type glycine (33%), proline (13%), alanine (12%), suivi de l'hydroxyproline (10%) (Torchia, 1976) (Fig. 2).

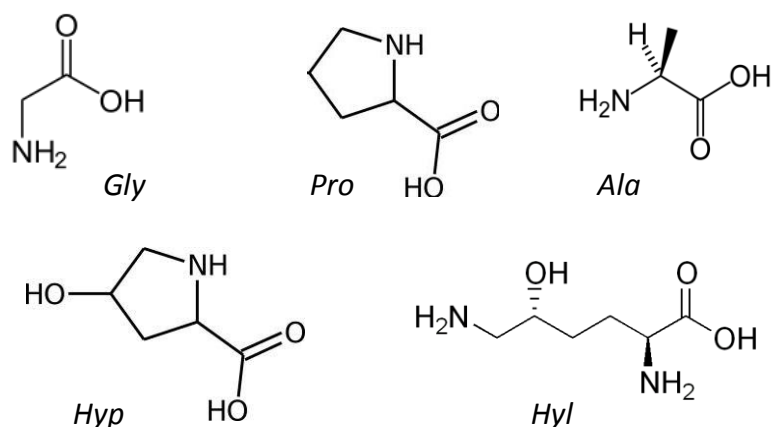


Figure 2 : Formules chimiques des acides aminés les plus abondants dans la molécule de collagène de type I: la glycine (Gly), la proline (Pro), l'alanine (Ala), l'hydroxyproline (Hyp) et l'hydroxylysine(Hyl).

Dans la structure en triple hélice du collagène, un acide-aminé se trouve régulièrement au centre de l'hélice, la glycine. Seul le résidu glycine, qui ne possède pas de fonction latérale, peut occuper cette position (Pollard, 2004). En effet, elle facilite la formation de la triple hélice en évitant la formation de ponts H stabilisants entre les résidus d'une même hélice de collagène (liaisons intramoléculaires). Les chaînes latérales des autres protéines sont orientées vers l'extérieur de la triple hélice, les fonctions -OH, -COOH, -NH₂ participant à la formation de très nombreuses liaisons chimiques (hydrogène, covalente et électrostatique) qui permettent de stabiliser l'ensemble de la structure en triple hélice de la molécule de collagène. Cette organisation des chaînes peptiques entraîne une faible distorsion qui induit une diminution de la distance longitudinale à 0,287 nm.

Les liaisons dans une molécule peuvent être aussi réalisées par réticulation par voie enzymatique *in vivo* ou bien par voie chimique *in vitro* en utilisant des molécules telles que des aldéhydes. Ceci résulte en la formation de « ponts » entre les chaînes polypeptidiques via les acides-aminés telles que la lysine et hydroxylysine (Danielsen, 1986).

1.2 Formation de fibrilles de collagène *in vivo* et *in vitro*

In vivo, les cellules forment d'abord un précurseur de collagène, le procollagène, dont les structures polypeptidiques supplémentaires lui procurent une plus grande solubilité que le collagène. Ensuite, par l'action d'une enzyme, la procollagène peptidase, les extrémités N- et C- terminales (propeptides) sont clivées pour former la molécule de collagène. L'auto-assemblage des molécules de collagène mène à la formation de fibrilles qui sont stabilisés

par la formation de liaisons covalentes induites par une autre enzyme spécifique, la lysyl oxydase, dans le milieu *in vivo* (Kadler, 1996). *In vitro*, la solubilité du collagène est contrôlée par le pH du milieu. L'assemblage des molécules entre elles est induit par l'augmentation du pH. Les interactions entre molécules sont alors assurées par liaisons hydrogène et interactions électrostatiques. Cette étape de formation des fibrilles à partir des molécules de collagène s'appelle la « fibrillogénèse ».

Le diamètre des fibrilles de collagène varie de 50 à 300 nm. Cette variation de taille est liée aux conditions de formation, qui sont variables en fonction des tissus (Banfield, 1954). Elle est aussi observée expérimentalement en fonction du pH, de la force ionique et de la température au moment de la formation des fibrilles. **La distance latérale** entre deux triples hélices dans une fibrille est aussi dépendante de l'environnement des fibrilles (Fig. 3). Par exemple, cette distance diminue de 1,6 nm à 1,1 nm après séchage de l'échantillon. La minéralisation peut aussi induire la diminution de la distance latérale à 1,25 nm en raison de l'intercalation des plaquettes d'hydroxyapatite (Lees, 1986 & Fratzl, 1993).

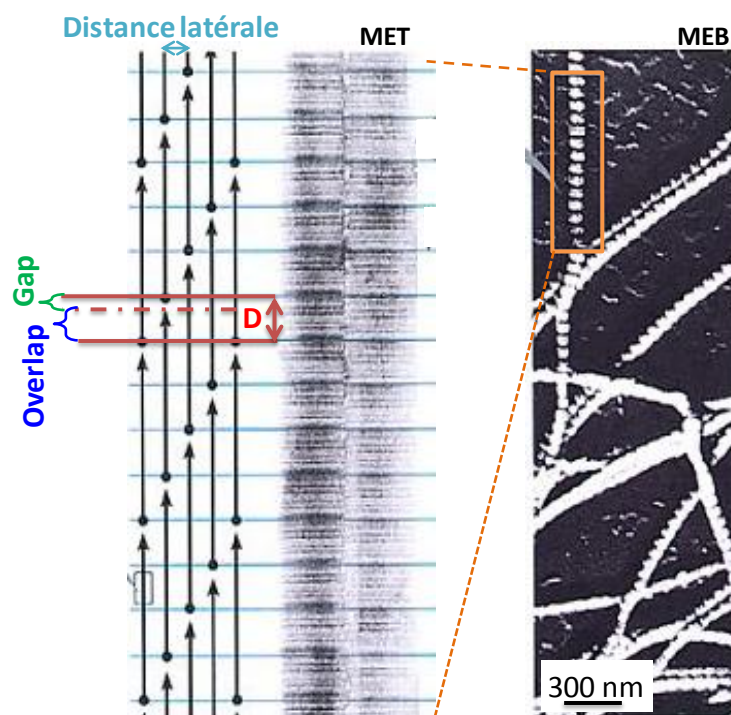


Figure 3: Schéma et clichés en MET et MEB des fibrilles de collagène.

Une striation périodique transversale, appelée « distance D », est observée dans toutes les fibrilles de collagène *in vivo* et *in vitro* (lorsque la fibrillogénèse est bien induite)

par microscopie électronique à transmission et à balayage (Fig. 3) (Hodge, 1963). La longueur d'une molécule de collagène est de 4,4 fois la distance D. En effet, la distance D est composée d'une zone de gap d'environ 0,54 D qui se trouve entre les extrémités des molécules de collagène et une zone d'« overlap » où intervient un chevauchement de toutes les molécules de collagène. La zone de gap (35-40 nm), contrairement à ce que son nom indique, est occupée par les chaînes peptidiques non hélicoïdales des extrémités N- et C- terminales (télopeptides) des molécules de collagène. La périodicité D, dépendante des conditions de formation (Glimcher, 2006), est observée dans toutes les fibrilles de collagène.

1.3 L'organisation tridimensionnelle du collagène en solution

Les molécules de collagène sont solubles en milieu acide *in vitro* (Gross, 1958). Quand la concentration en collagène est supérieure à 80-100 mg/ml (Giraud-Guille, 1992 & Gobeaux, 2008), les molécules s'auto-assemblent spontanément de part leur propriété lyotropique.

Dans certaines MECs, la distribution spatiale des fibrilles de collagène est similaire à la structure tridimensionnelle des molécules de certains cristaux liquides (Bouligand, 1972 & Neville, 1993). Y. Bouligand a proposé que les triples hélices de collagène aient un comportement avant fibrillogénèse similaire à celui de molécules en phase cristal liquide. Il a étendu ces propriétés à d'autres macromolécules biologiques telles que la chitine, la cellulose ou l'ADN. En effet, des travaux ultérieurs ont démontré de tels auto-assemblages et plus particulièrement des phases cristallines liquides de type nématiques et nématiques chirales (cholestériques) (Fig. 4) (Giraud-Guille, 1996).

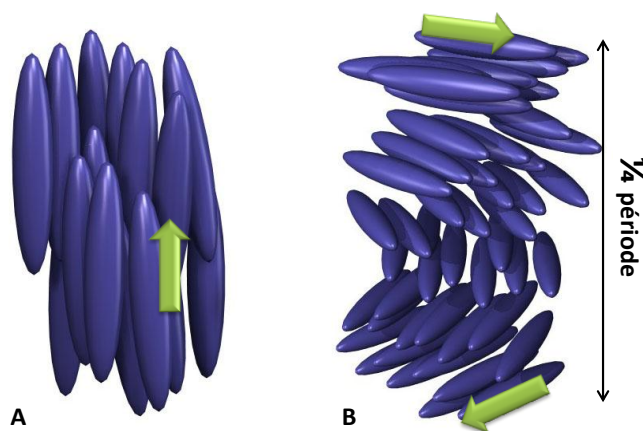


Figure 4: Exemples de deux phases cristallines liquides : A), la phase nématique où les molécules possèdent uniquement un ordre d'orientation; B), La phase cholestérique constituée d'une série de plans parallèles, au sein desquels toutes les molécules sont uniaxiales et où le plan suivant présente une déviation d'orientation. Une période ou un pas correspond à une rotation de 360° de l'orientation moléculaire.

Giraud-Guille *et al.* ont démontré l'auto-assemblage spontané *in vitro* du collagène et du procollagène en phase cholestérique (Giraud-Guille, 1992 & Martin, 2000). L'observation d'une solution de collagène concentrée (> 100 mg/mL) par microscopie optique à lumière polarisée montre des motifs de type « empreinte digitale » (Fig. 5). Ce type d'image est caractéristique d'une phase cholestérique, la distance entre deux bandes sombres correspond à une rotation de 180° de l'orientation moléculaire, soit un demi-pas, P . Une rotation de $P/4$ est décrite schématiquement sur la figure 4B. Les auteurs ont observé aussi que la valeur du pas P augmente avec la concentration du collagène, de $0,1$ à 4 μm (Giraud-Guille, 2005).

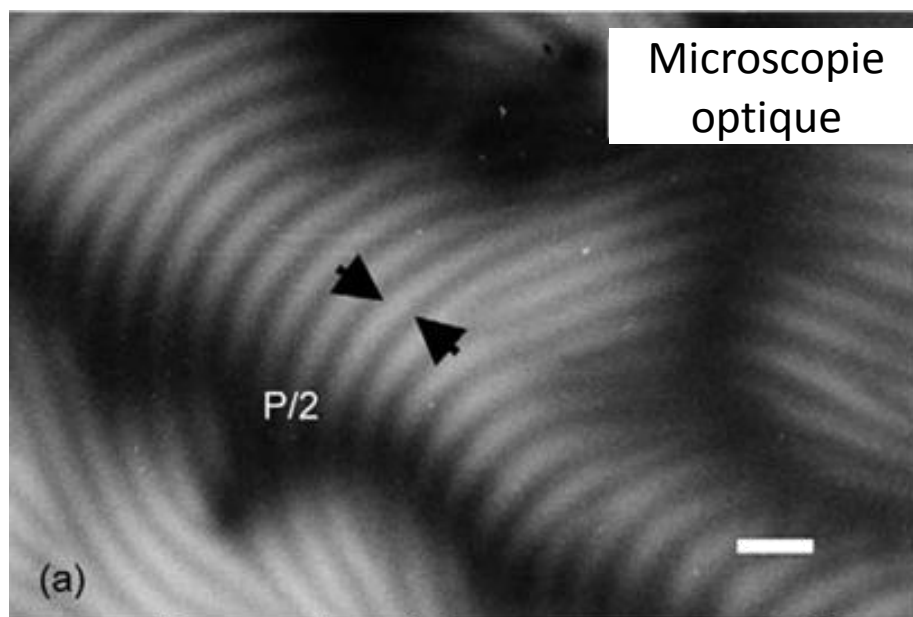


Figure 5: Cliché d'une solution de collagène concentrée (> 100 mg/mL) observée par microscopie optique à lumière polarisée, bar = 5 μm (D'après Giraud-Guille, 2005)

1.4 Stabilisation de l'organisation de la solution de collagène

Dans les tissus vivants, plusieurs types d'organisation de macromolécules biologiques sont rencontrés en fonction des propriétés mécaniques requises (Hulmes, 1979). Par exemple, l'organisation des fibrilles de collagène est unidirectionnelle au niveau des tendons. La structure en phase cholestérique est observée dans l'os compact et les travées osseuses de l'os spongieux et cette organisation tridimensionnelle de collagène contribue aux propriétés mécaniques de l'os. Elle peut être recréée et stabilisée dans le milieu *in vitro*.

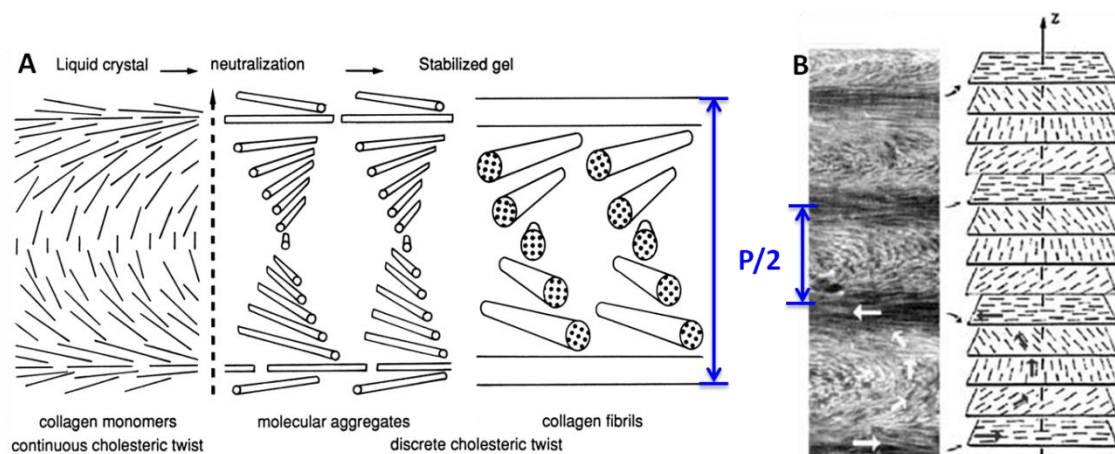


Figure 6: Transition sol-gel de la phase cristalline liquide du collagène obtenue par neutralisation : A) Les molécules de collagène forment les fibrilles de collagène en gardant leur organisation dans l'espace sans changer la valeur de $P/2$ (D'après Besseau, 1995). B) L'image en MET d'une coupe oblique d'un gel de collagène montre que les fibrilles de collagène forment des arceaux, caractéristiques d'un passage par une phase cholestérique (D'après Mosser, 2006)

En effet, en augmentant la concentration d'une solution acide de collagène, les molécules de collagène forment d'abord une phase cholestérique en milieu acide. Puis pendant la fibrillogénèse, les molécules de collagène s'assemblent en fibrilles. Elles précipitent en gardant l'orientation initiale des molécules. (Fig. 6 A) (Besseau, 1995). Le pas de rotation reste identique après la fibrillogénèse. Sur une coupe d'une matrice de collagène (Fig. 6B), une structure en arceaux est observée par microscopie électronique à transmission (MET), cette périodicité correspond à la rotation de 180° des orientations fibrillaires. Les arceaux, visibles en vue oblique, résultent de la géométrie en rotation hélicoïdale (Bouligand, 1985).

Stabiliser des cristaux liquides de collagène dans les conditions *in vitro*, a permis de reproduire par des principes de physique des solides, les architectures supramoléculaires complexes rencontrées dans les tissus osseux. Nous avons vu qu'avec l'augmentation de la concentration de collagène, les molécules de collagène s'organisent en phase « cholestérique ». Il existe bien d'autres architectures en lien étroit avec cette structure cholestérique (Fig. 7) : Le « cylindrical twist » est obtenu par déformation d'une structure cholestérique en formant un cylindre. Le « toroidal twist » est formé en liant deux extrémités de la structure « cylindrical twist ». Toutes ces structures ont été observées dans les agrégats des fibrilles de collagène par auto-assemblage *in vitro* (Bouligand, 1985 & Giraud-Guille, 1998). Ces structures de twist sont comparables aux structures dans les matrices de collagène trouvées *in vivo* dans les tissus conjonctifs.

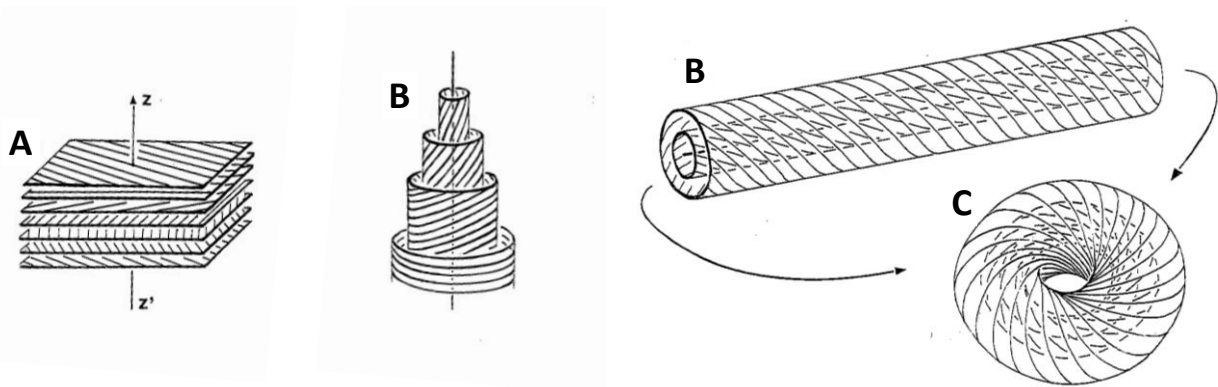


Figure 7 : (A). Organisation en phase « cholestérique » ; (B). Phase cristalline « cylindrical twist » ; (C). Formation de la phase « toroidal twist » à partir de « cylindrical twist » (Reproduit d'après Bouligand, 1985)

La reproduction de la structure tridimensionnelle des fibrilles de collagène peut être réalisée *in vitro*. Par contre, *in vivo* la présence d'un état cristallin liquide, dans la cellule ou dans son voisinage, n'a jamais été démontré. Un état cristal liquide du procollagène obtenu *in vitro* (Martin, 2000) est quasi impossible à détecter localement dans une vésicule de sécrétion dont la taille est de 300 nm environ.

2. Procédés de préparation de matrices denses de collagène

Dans le but de former une matrice dense de collagène avec une organisation cholestérique, différentes stratégies ont été proposées dans la littérature pour concentrer une solution acide de collagène (Fig. 8).

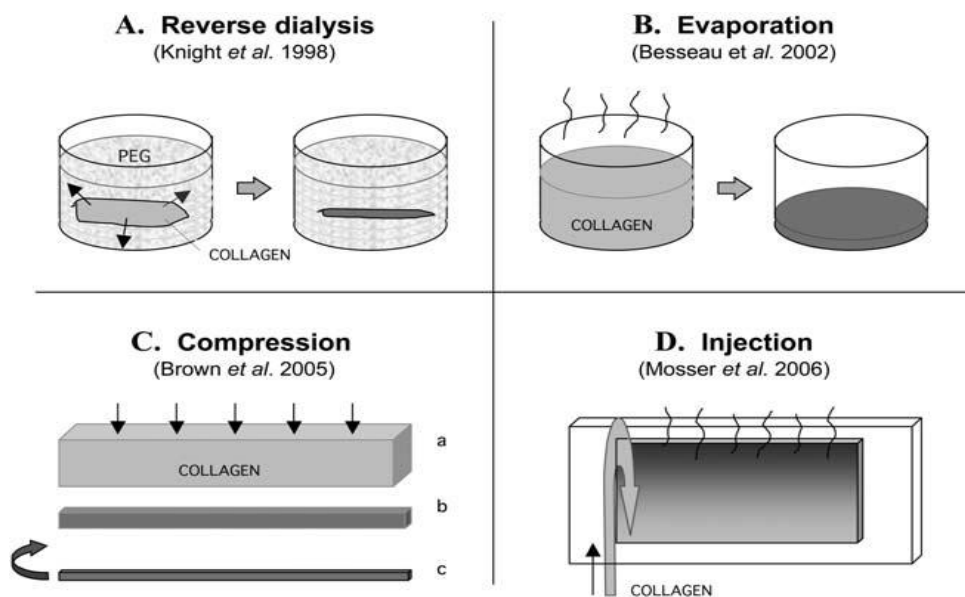


Figure 8 : Différentes méthodes proposées pour concentrer le collagène (D'après Wang, 2011)

Dans la méthode de dialyse inverse (Fig. 8A) (Knight, 1998), une solution de polyéthylène glycol (PEG) est utilisée pour contrôler la concentration finale en collagène dans la matrice. Suite à la diminution importante du volume de la matrice (10% de son volume initial pour une concentration en collagène 10 fois plus grande), les molécules de collagène se répartissent d'une façon hétérogène sur l'ensemble de la membrane de dialyse en formant des domaines de taille variée. Ensuite la récupération de la matrice est réalisée manuellement mais l'organisation induite après la récupération n'est pas reproductible (Fig. 9A). Le cliché de MEB obtenue sur l'échantillon (Fig. 9B) montre aussi que la taille des fibrilles de collagène n'est pas homogène et varie de 100 nm à 1 μ m.

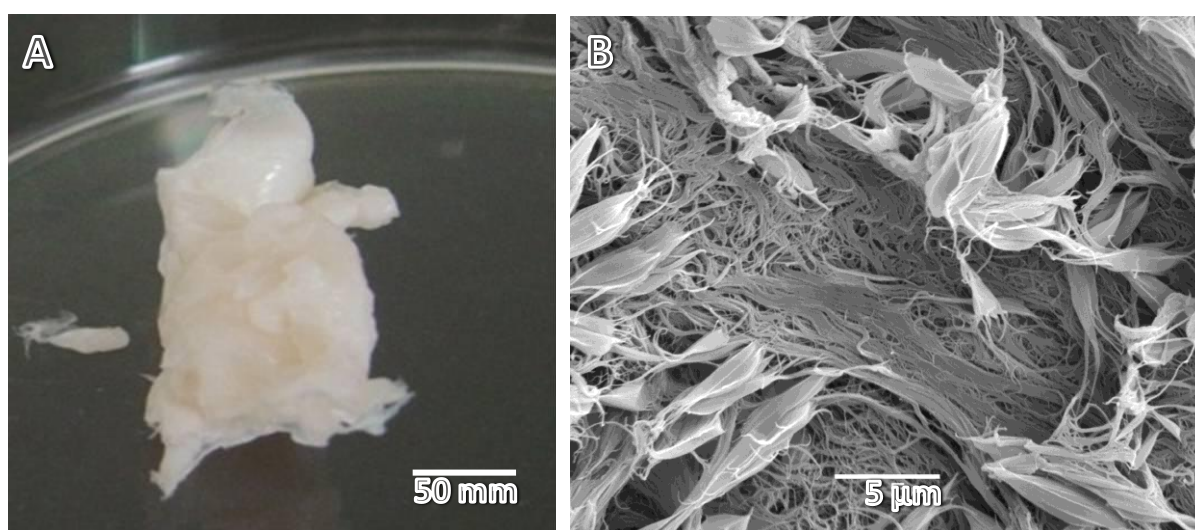


Figure 9: A. Photo d'une matrice de collagène (300 mg/mL) obtenue par la méthode de dialyse inverse (d'après Nassif, 2010, supporting informations) ; B. la même matrice de collagène observée par MEB montre des fibrilles de collagène de tailles variées (d'après Wang, 2012, supporting informations).

La méthode d'évaporation (Fig. 8B) est généralement appliquée pour la préparation de matrices utilisées comme modèle de culture. Les matrices obtenues offrent un modèle en 3D pour l'étude par exemple de fibroblastes (Besseau, 2002 & Helary, 2005) et d'ostéoblastes (Giraud-Guille, 2010). L'évaporation du solvant a lieu à la surface de la solution de collagène, un gradient de concentration se forme donc dans la matrice si l'ensemble n'est pas agité (Fig. 10). En plus, la solution proche de la surface devient de plus en plus visqueuse avec l'augmentation de la concentration et ceci ralentit l'évaporation. Avec un tel procédé, la concentration de collagène arrive rarement au-delà de 40 mg/mL.

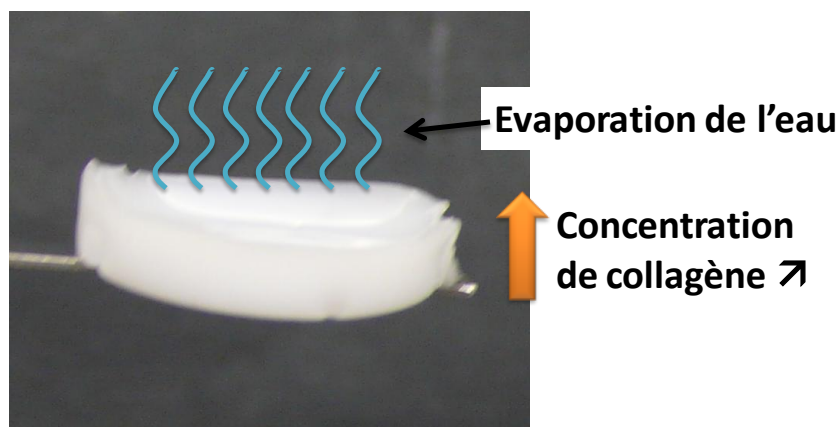


Figure 10 : Matrice obtenue par la méthode d'évaporation impliquant une variation de la concentration en collagène (d'une concentration initiale en général <5 mg/mL jusqu'à une concentration finale de 40 mg/mL)

Une autre méthode proposée par Brown *et al.* (Brown, 2005) (Fig. 8C) consiste à comprimer les solutions de collagène et à éliminer le solvant afin d'obtenir une solution concentrée de collagène qui peut atteindre jusqu'à 150 mg/mL. Ce procédé est très rapide. La perte importante d'eau pendant le processus de concentration rend la matrice cassante mais les matrices obtenues utilisées comme supports de culture permettent, néanmoins, une viabilité cellulaire.

Enfin la dernière méthode consiste à injecter de manière continue une solution de collagène de faible concentration entre lame et lamelle, le solvant s'évaporant à l'interface air-liquide (Fig. 8D) (Mosser, 2006). La concentration de la matrice à cette interface peut atteindre une valeur très importante (1000 mg/ml). Cette méthode est donc très intéressante pour l'étude microscopique de l'organisation des fibrilles de collagène. Mais la présence d'un fort gradient de concentration allant de 5 à 1000 mg/mL (sans contrôle de la concentration maximale) ainsi que la petite taille de l'échantillon (lame de 2 cm*2 cm, et d'épaisseur ~3 mm) limitent les applications de cette technique.

Dans l'objectif d'obtenir des matrices de collagène homogènes en concentration et à concentration élevée (> 80 mg/mL), nous avons mis en place, au laboratoire, un procédé de dialyse inverse couplée à une injection continue (Wang, 2011). Pour cela, nous avons combiné les méthodes de dialyse inverse (Fig. 8A) et d'injection continue (Fig. 8D). Ce procédé réunit les avantages de ces deux techniques : la concentration de la matrice est contrôlée et reproductible. De plus, la forme de la matrice qui dépend des moules utilisés, est ajustable en fonction de l'application visée. Les étapes de concentration et de fibrillogénèse ont lieu dans un milieu fermé stérile qui assure la stérilité de la matrice finale.

II. Matrices denses de collagène mimétiques de la matrice organique du tissu osseux

Une étude sur la matrice de collagène d'une concentration d'environ 300 mg/mL a déjà eu lieu au laboratoire pendant la thèse de Frédéric Gobeaux par la méthode de dialyse inverse. Nous avons décidé de synthétiser des matrices de collagène dans cette même gamme de concentration en utilisant ce nouveau procédé. Comme l'équilibre est relativement long à atteindre, nous avons utilisé une solution de PEG à 300 mg/mL afin d'obtenir une matrice de collagène à 250 mg/mL. En effet, nous pouvons estimer de façon empirique que la concentration finale en collagène est environ 1,2 fois inférieure à la concentration de la solution de PEG utilisée pendant le procédé de concentration du collagène. Une fois les matrices préparées, nous les avons caractérisées par différentes méthodes structurales et chimiques. La propriété de biocompatibilité de ce matériau a été vérifiée par des tests d'adhésion cellulaire et des implantations chez le petit animal.

1. Nouveau procédé de préparation des matrices de collagène

Le procédé par dialyse inverse couplée à une injection continue consiste à injecter continuellement une solution acide de collagène diluée (≤ 5 mg/mL) dans un bouchon de dialyse qui est en échange permanent avec la solution de PEG (Wang, 2011). Le solvant s'échange ainsi au travers de la membrane de dialyse, et un gradient de concentration se forme dans le moule (Fig. 11A). Après injection totale de la solution de collagène diluée, la solution présente dans le bouchon est stabilisée pendant plusieurs jours afin d'éliminer le gradient de concentration (Fig. 11B). Ensuite la fibrillogénèse est réalisée par diffusion de vapeur d'ammoniac. Finalement, les matrices de collagène sont rincées à l'eau doublement distillée stérile jusqu'à pH neutre (Fig. 11C). La concentration du collagène est déterminée par dosage de l'hydroxyproline (Bergman, 1963). Les détails du protocole sont décrits dans le chapitre « Matériels et Méthodes ».

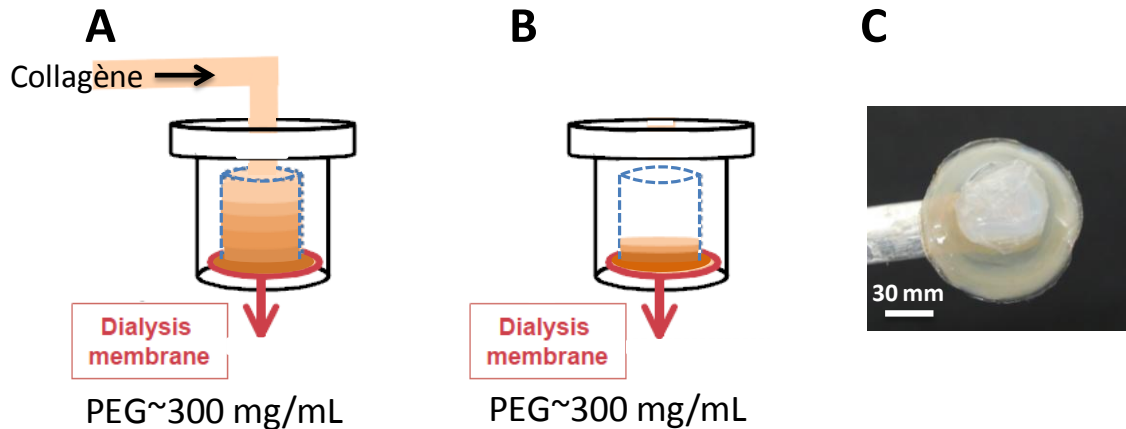


Figure 11: Principe du nouveau procédé d'élaboration des matrices denses de collagène : A, Injection continue d'une solution de collagène dans une chambre de dialyse qui est plongée dans un bain de PEG à 300 mg/mL ; B, Disparition du gradient de concentration au sein de la solution concentrée de collagène; C, Photo d'une matrice de collagène après démoulage.

Deux solutions de collagène diluées de concentrations initiales différentes (1 et 3 mg/mL) ont été utilisées pour la préparation de matrices afin de vérifier l'effet de la concentration initiale de collagène sur l'organisation finale des fibrilles de collagène.

2. Caractérisation des matrices de collagène

Afin d'étudier ces échantillons tridimensionnels structurés à différentes échelles (du nanomètre au micromètre), diverses méthodes de caractérisation ont été utilisées : la diffusion/diffraction des rayons X aux grands angles (Wide Angle X-Ray Scattering, WAXS) en transmission, l'analyse thermogravimétrique (ATG), la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide (RMN), la microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB) et la microscopie optique à lumière polarisée.

Distances interatomiques 0,29 nm	Diamètre d'une triple hélice de collagène 1,2 nm	Distance D 67 nm	Longueur d'une molécule de collagène 300nm	Assemblage 3D de fibres de collagène et textures cristallines	
1 Å	1 nm	10 nm	100 nm	1 µm	10 µm
Diffusion des rayons X					
RMN		Microscopie électronique			
				Microscopie optique	

Tableau 1 : Structure hiérarchique dans une matrice de collagène et les méthodes de caractérisation correspondantes (Inspiré de Woodhead-Galloway, 1982)

Dans le tableau 1, nous avons associé les distances caractéristiques relatives à l'organisation hiérarchique des matrices de collagène avec les méthodes de caractérisation

correspondantes. La DRX et la RMN sont adaptées pour l'étude atomique/moléculaire, ces méthodes permettent une étude directe des échantillons sans aucun traitement chimique. La MET et la MEB nous donnent des informations structurales de l'échantillon à l'échelle allant de la dizaine de nanomètres au micromètre. La microscopie optique est, elle, adaptée pour une étude à l'échelle micrométrique.

2.1 Organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène

À l'aide de quatre techniques complémentaires : la microscopie optique à lumière polarisée, la microscopie électronique à transmission et à balayage et la diffusion/diffraction des rayons X aux grands angles, nous avons d'abord fait une étude structurale de l'organisation de la matrice.

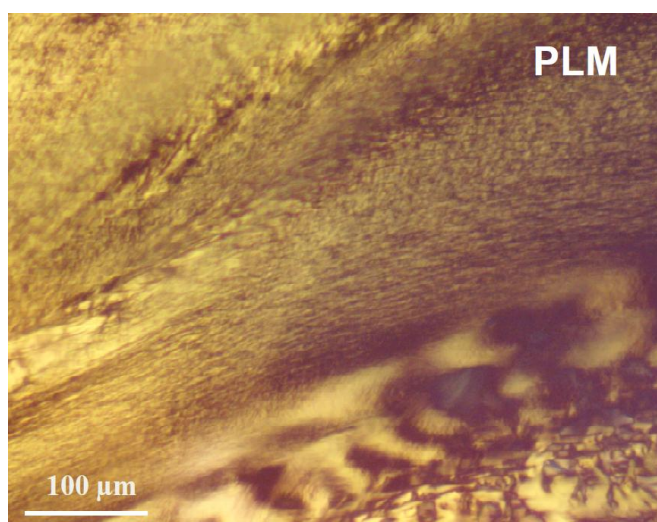


Figure 12 : Matrice dense de collagène (~250 mg/mL) synthétisée à partir d'une solution concentrée en collagène de ~ 3 mg/mL observée par microscopie optique à lumière polarisée

La microscopie optique entre polariseurs croisés nous permet de mettre en évidence l'anisotropie de l'organisation tridimensionnelle de la matrice. Dans le cas d'une solution isotrope, la polarisation de la lumière n'est pas modifiée, l'échantillon apparaît donc sombre entre deux polariseurs croisés. Notre matrice, quant à elle apparaît partiellement lumineuse (Fig. 12), ce qui signifie que le faisceau lumineux polarisé traverse une plage d'échantillon anisotrope. L'alternance de bandes claires et de bandes sombres est caractéristique d'un ordre à grande distance. Des phases ordonnées ont été observées dans les deux matrices de collagène préparées à partir des solutions initiales de collagène à 1 et 3 mg/mL.

L'analyse par MEB fournit des informations sur la distribution de la taille des fibrilles de collagène et aussi sur la structure tridimensionnelle des fibrilles dans une matrice.

Elles ont été préparées pour l'observation par séchage au CO₂ supercritique afin de conserver la structure tridimensionnelle de la matrice.

L'observation par MEB (Fig. 13) d'une matrice de collagène obtenue par concentration d'une solution de collagène à 3 mg/mL, montre que la taille des fibrilles de collagène apparaît homogène (~100 nm). Nous n'avons pas observé d'organisation tridimensionnelle hélicoïdale des fibrilles de collagène à grande échelle qui pourrait refléter le passage par une phase cholestérique.

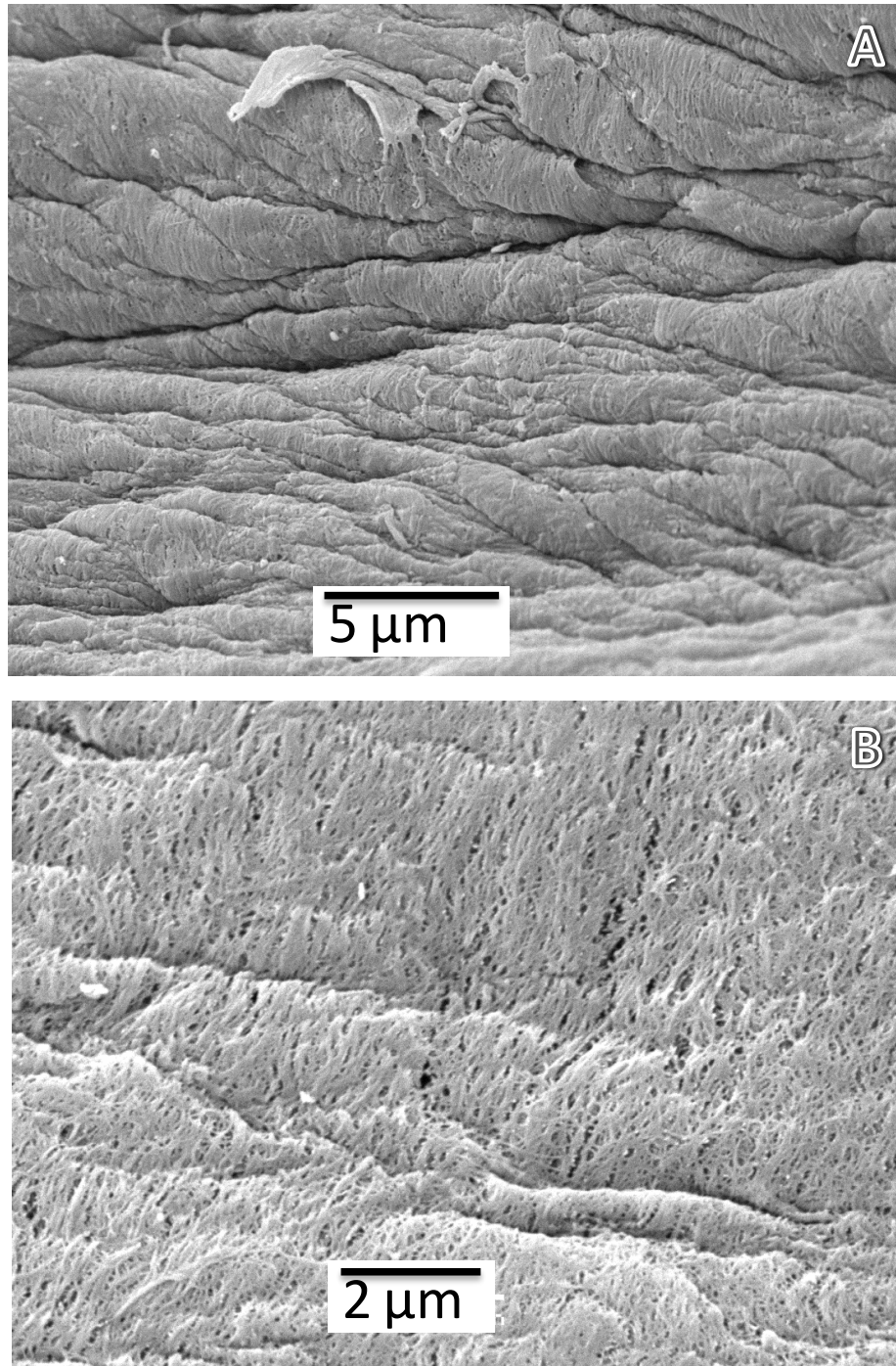


Figure 13: Clichés de MEB d'une matrice de collagène (~ 250 mg/mL) préparée à partir d'une solution diluée de collagène à 3 mg/mL (A) à petit et (B) grand grandissement

L'observation par MEB a montré que les fibrilles de collagène étaient également de taille homogène (~ 100 nm) sur l'ensemble de l'échantillon concentré à partir d'une solution de collagène à 1 mg/mL (Fig. 14A, vue de la surface; B, vue d'une section). Par contre, l'observation de l'arrangement tridimensionnel des fibrilles sur une section de la matrice après fracture permet de mettre en évidence une organisation cholestérique stabilisée sur une centaine de micromètres. En effet, chaque strate correspond à une rotation de 180° dans l'orientation fibrillaire (Fig. 14C&D). Le pas, correspondant à une rotation de 360° , est d'environ $12 \mu\text{m}$.

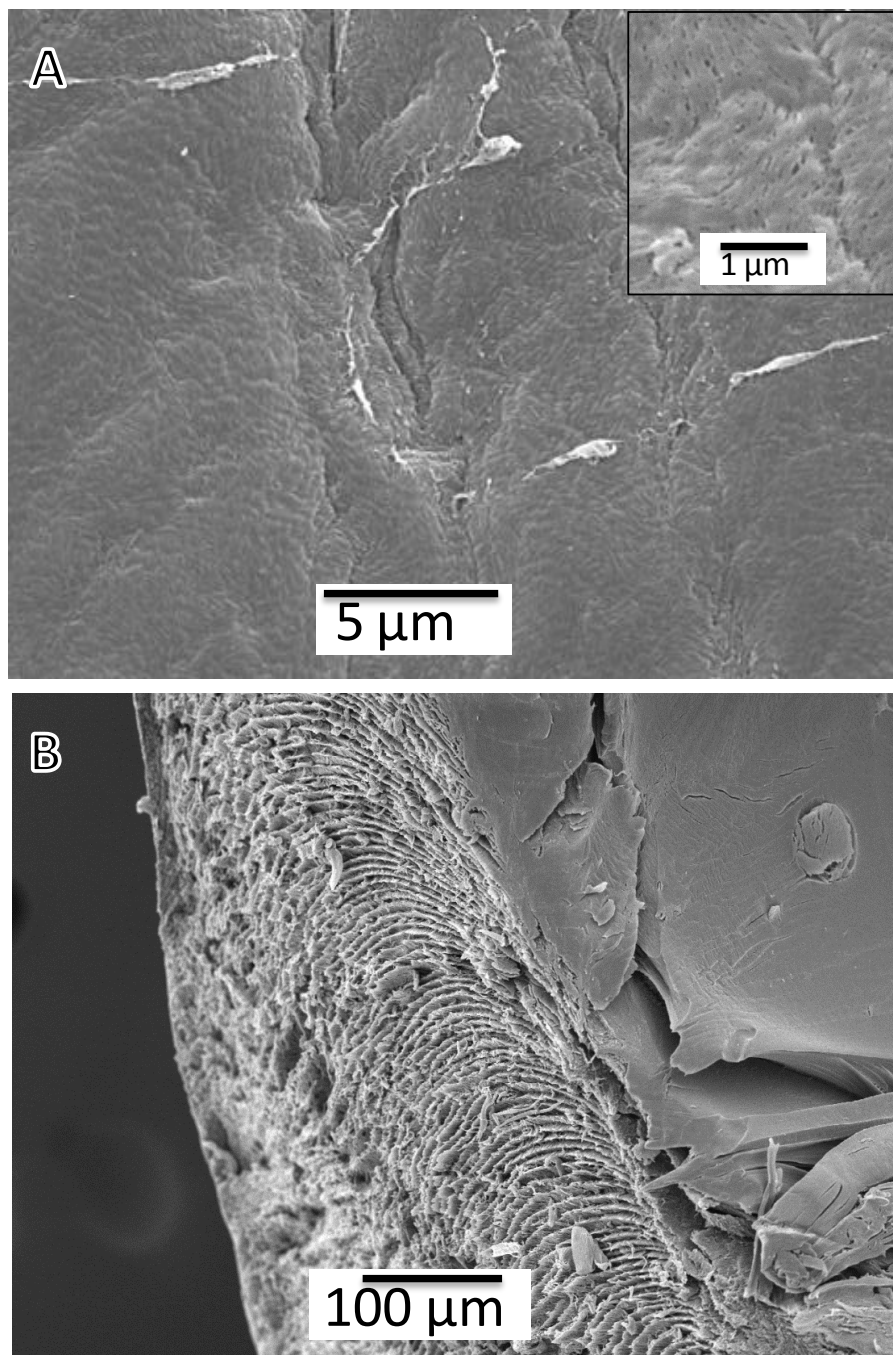


Figure 14 : Clichés d'une matrice de collagène (~ 250 mg/mL) préparée à partir d'une solution diluée de collagène à 1 mg/mL: (A). Surface de la matrice de collagène ; (B). vue d'une section de la matrice

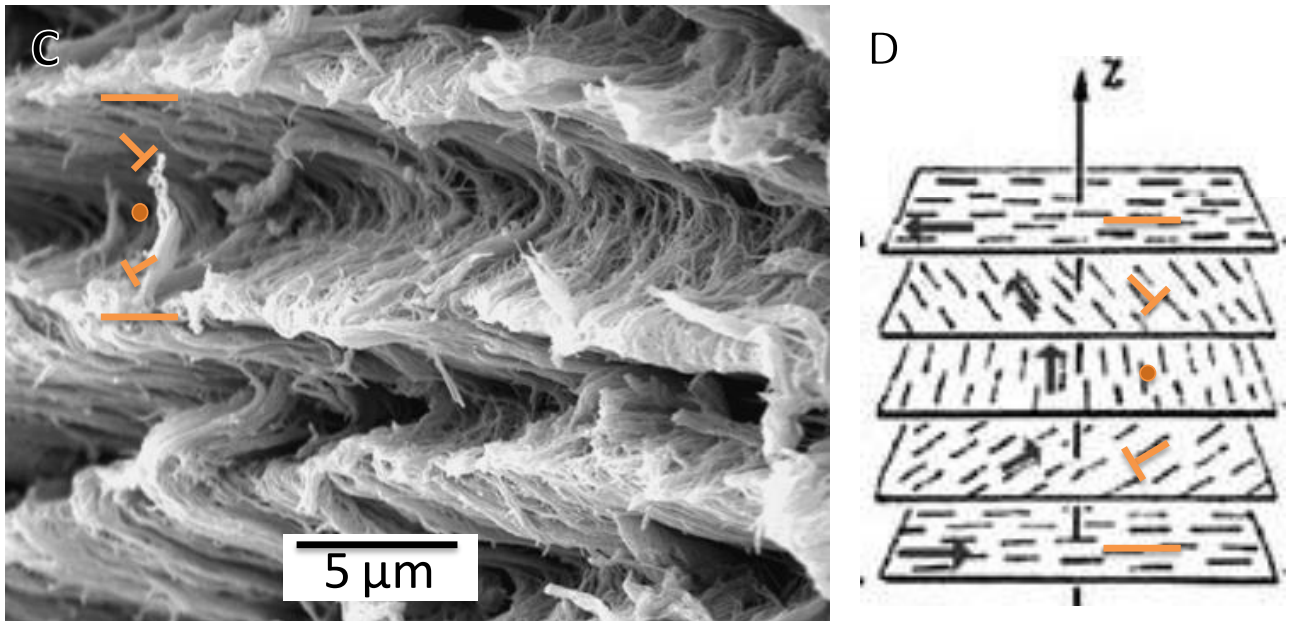


Figure 14 : Clichés d'une matrice de collagène (~ 250 mg/mL) préparée à partir d'une solution diluée de collagène à 1 mg/mL: (C). vue d'une section de la matrice ; (D). Schéma de l'arrangement fibrillaire selon une géométrie cholestérique. Dans chaque plan, les fibrilles sont parallèles entre elles, mais leur orientation change progressivement et dans chaque couche successive, la direction fibrillaire a tourné d'un petit angle autour d'un axe perpendiculaire aux plans; les fibrilles de collagène apparaissent de taille homogène sur les images B et D. Les fibrilles sont représentées dans le plan (-), oblique (∓) ou perpendiculaires (•) au plan d'observation.

L'étude par MEB nous a donné un aperçu tridimensionnel de l'organisation des fibrilles de collagène. Il apparaît que les solutions diluées de collagène à 1 et 3 mg/mL se comportent d'une façon similaire pendant la concentration. Or l'utilisation d'une solution diluée de collagène à 3 mg/mL nous permettrait de raccourcir le temps d'injection par rapport à une solution à 1 mg/mL. Cependant, l'organisation cholestérique des fibrilles de collagène n'a été observée que dans le cas à 1 mg/mL. Donc, sans pouvoir exclure une telle organisation avec les solutions à 3 mg/mL, nous nous sommes focalisés sur les échantillons préparés à partir d'une solution de collagène à 1 mg/mL dans la suite de nos études.

L'observation par MET nous a fourni des informations plus locales. Les matrices de collagène à haute concentration (250 mg/mL) incluses dans la résine sont dures et cassantes, il est donc difficile d'obtenir des coupes d'épaisseur correcte (< 80 nm). Malgré leur épaisseur, nous avons pu obtenir quelques informations sur la distribution des fibrilles dans la matrice.

Les striations dues à l'organisation des molécules au sein des fibrilles, en particulier la distance D de 67 nm, ont été observées sur les clichés de MET (Fig. 15A&B). A la résolution du MET, la distance latérale (1,5~1,7 nm) et la distance longitudinale (~0,28 nm) ne sont pas visibles. Une structure en « contre-plaqué » des fibrilles de collagène est observée (Fig. 15C), ce qui se traduit par une alternance de plans où les fibrilles sont soit perpendiculaires (indiqués par les points blancs), soit parallèles (indiqués par les barres

blanches) au plan d'observation sur le cliché de MET. Dans ce cas, la direction fibrillaire a tourné d'un angle de 90° d'un plan à l'autre autour de l'axe perpendiculaire aux plans.

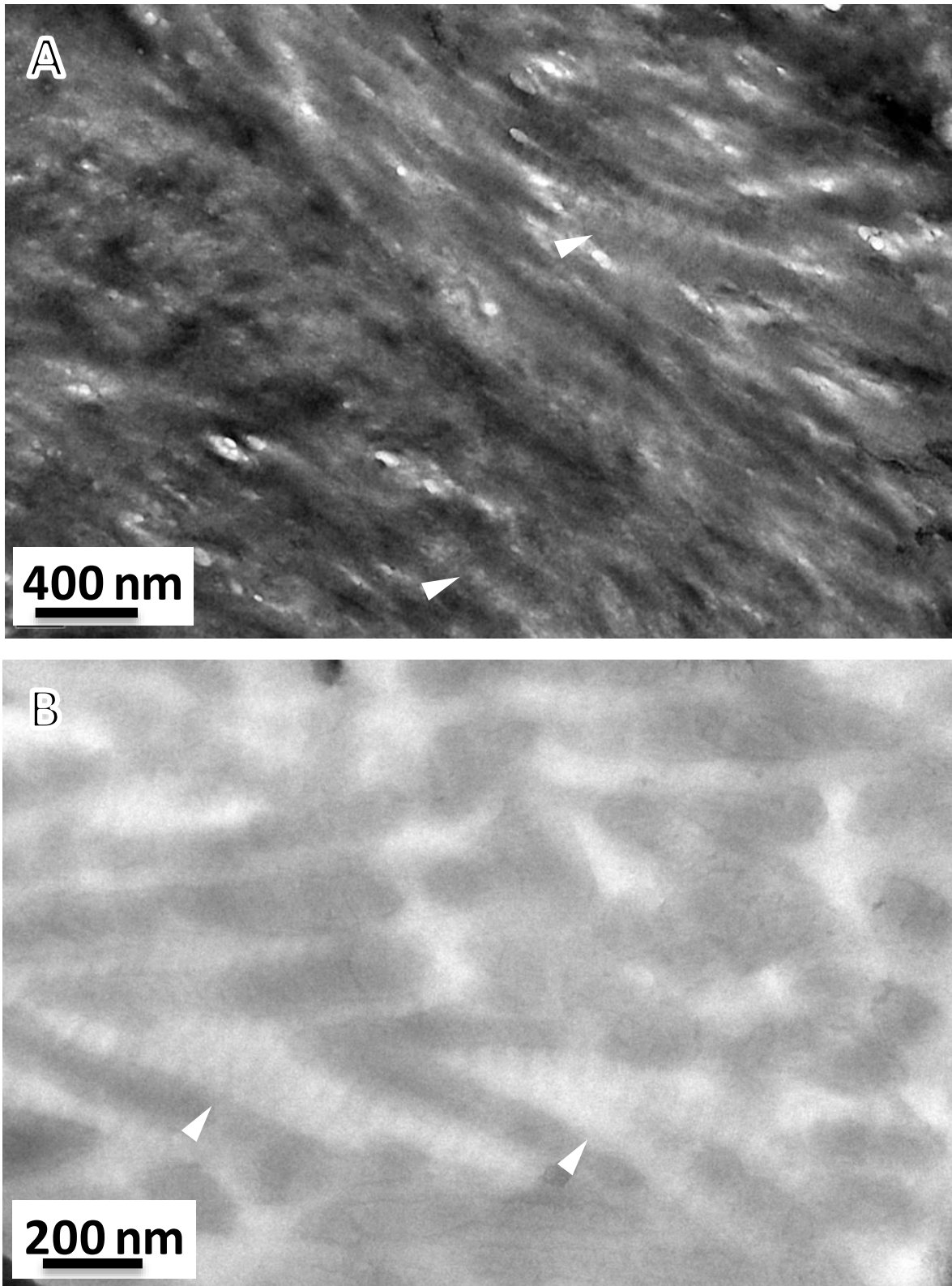


Figure 15 : Clichés de MET de la matrice de collagène, (A). (B). la périodicité axiale de 67 nm est visible (flèche) et montre l'orientation des fibrilles. Les coupes ont été contrastées par l'acétate d'uranyle.

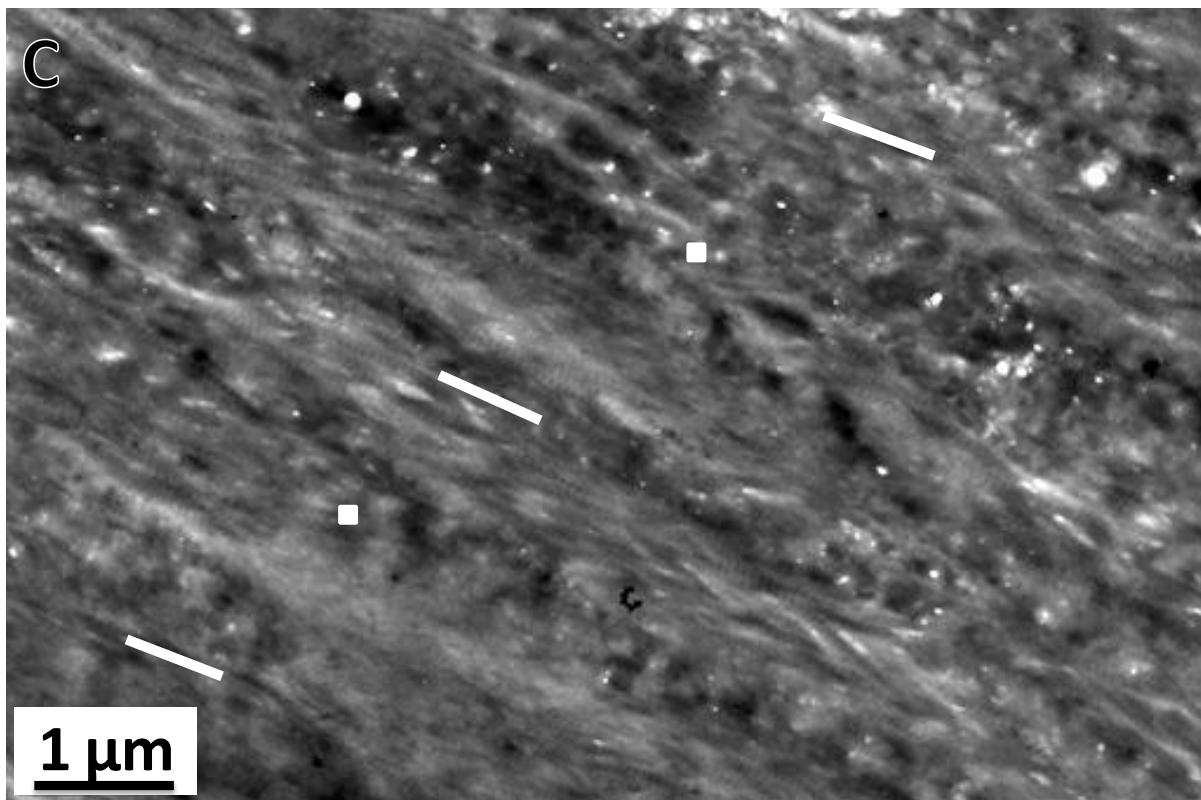
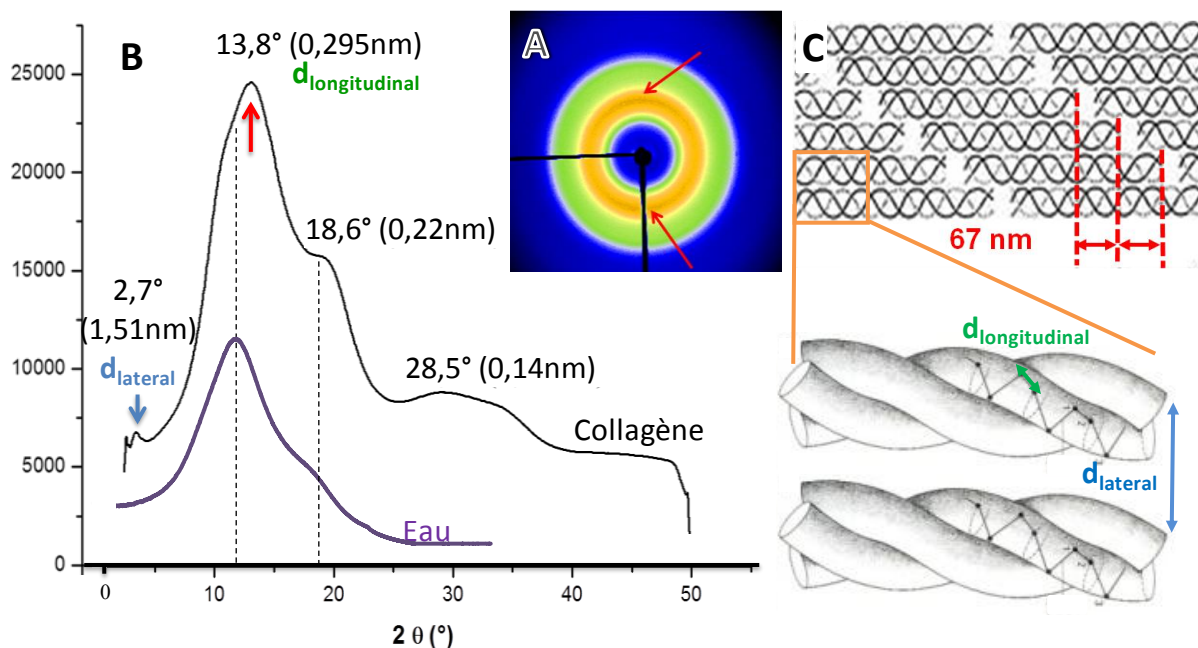


Figure 15: Clichés de MET de la matrice de collagène, (C) Les fibrilles sont représentées dans le plan (-) ou perpendiculaires (•) au plan d'observation. Les coupes ont été contrastées par l'acétate d'uranyle.

L'organisation tridimensionnelle de la matrice de collagène peut aussi être mise en évidence par diffraction de RX qui est une méthode complémentaire par rapport aux microscopies électroniques pour étudier les propriétés structurales de nos échantillons à une échelle allant de 0,1 nm à 100 nm (Hulmes, 1977). L'expérience a été réalisée par S. Renaudin et en collaboration avec J.-M. Nedelec de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, dans le cadre du projet ANR-Nanoshap, en utilisant le rayonnement synchrotron avec une taille du faisceau est 100 μm et une longueur d'onde de 0,7093 \AA .

Les clichés ont été recueillis sur des plaques photosensibles (image plates). La répartition anisotrope des signaux diffusés à $2\theta = 13,8^\circ$ ($d = 0,295 \text{ nm}$) (indiqué par les flèches rouges sur la figure 16 A) correspondant à la distance longitudinale des fibrilles de collagène, indique une orientation préférentielle de ces fibrilles (Falini, 1998). Donc, les domaines d'alignement des fibrilles peuvent atteindre presque 100 μm dans ces matrices.



Un épaulement à 12° en 2θ est attribué à un signal de diffusion amorphe dans la littérature (Maxwell, 2006). Nous avons comparé le diffractogramme avec celui du capillaire rempli d'eau et nous avons retrouvé le même signal. Donc cet épaulement apparaît lié à la présence importante d'eau dans la matrice.

Un faible pic est aussi présent à $2\theta = 2,7^\circ$ ce qui correspond à une périodicité de 1,5 nm, qui coïncide avec la distance latérale entre les triples hélices de collagène (Fig. 15C) (Falini, 1998). Par contre, l'intensité de ce pic est très faible par rapport au reste du diffractogramme. Sachant que l'intensité des pics du diffractogramme est proportionnelle à la quantité des atomes qui composent le plan de diffraction, nous supposons que cette faible intensité du signal de la distance latérale est due à la faible quantité des fibrilles de collagène dans l'axe de diffraction.

Les pics correspondant aux distances 0,22 et 0,14 nm ne correspondent à aucune organisation décrite dans la littérature pour une matrice de collagène et semble être dus à la diffusion d'eau.

Cette expérience de WAXS a été aussi menée au laboratoire avec un faisceau de $400 \mu\text{m}$ (K- α du Cu) (Fig. 18). Pour que nous puissions observer nettement une orientation préférentielle des fibrilles de collagène, la taille du faisceau au laboratoire est supérieure à la taille des différents domaines où sont organisées les fibrilles (plage d'alignement) dans la matrice ($400 \mu\text{m}$ vs. max $100 \mu\text{m}$). L'anisotropie du signal correspondant à la périodicité

axiale ($D = 67 \text{ nm}$) par rapport au signal associé à la distance longitudinale pourrait être mise en évidence à l'aide de la diffusion des RX aux petits angles (SAXS) couplée au WAXS (Brodsky, 1982 & White, 1977). Pour cela, une distance échantillon/détecteur de 176,2 cm est nécessaire contre 147,25 cm au laboratoire. Ainsi, nous n'avons pas pu observer un signal dû à la périodicité axiale.

2.2 Rôle de l'eau sur l'organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène

Dans les fibrilles de collagène, les espaces intrafibrillaires et interfibrillaires permettent d'y accueillir les cristaux d'apatite (Landis, 1996 & Katz, 1973). Ces espaces réservés à un dépôt de la phase minérale du tissu osseux sont occupés par de l'eau physisorbée sur les fibrilles non minéralisées qui aide à maintenir la structure tridimensionnelle de la matrice et donc joue un rôle important dans son organisation (Saitô, 1992).

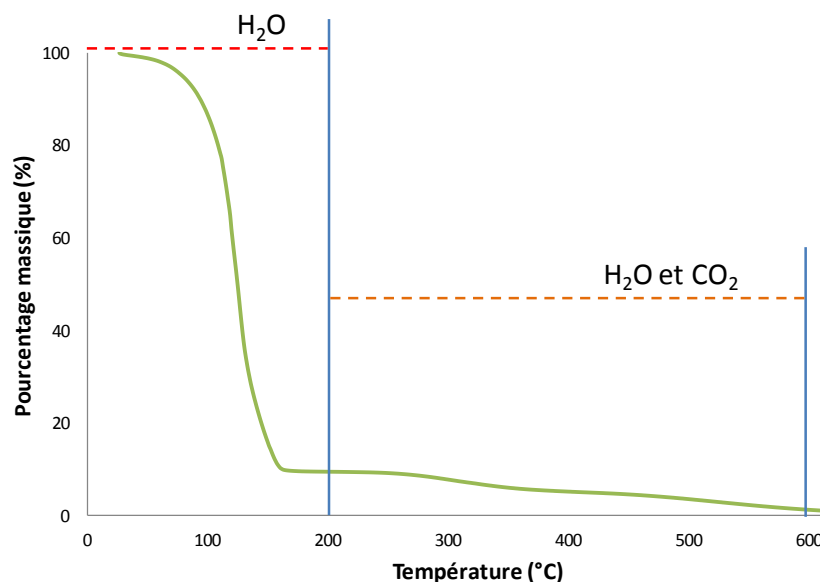


Figure 17: ATG d'une matrice de collagène à 250 mg/mL

Tout d'abord, nous avons estimé la quantité d'eau dans une matrice de collagène par une étude d'analyse thermogravimétrique (ATG) sous air (Fig. 17) (Mkukuma, 2004). La perte de masse entre la température ambiante et 200°C correspond à l'eau physisorbée à la surface des fibrilles de collagène et représente 90% de la masse totale de la matrice. La perte de l'eau chimisorbée et la combustion de la matière organique a lieu entre 200 et 600°C, associée avec une perte de H₂O et CO₂ (détectés par spectroscopie de masse). Cela représente environ 10% en masse de la matrice de collagène.

L'importance de cette eau physisorbée dans la structure des fibrilles de collagène a été démontrée par une étude de WAXS au laboratoire (K- α du Cu et taille du faisceau : 400 μm) en comparant une matrice humide et une matrice séchée sous hotte à flux laminaire.

La matrice a été séchée sous vide pendant une journée à température ambiante, le séchage permet d'éliminer principalement l'eau physisorbée. Le diffractogramme de l'échantillon « sec » (Fig. 18) montre que la distance latérale passe de 1,51 nm (montré précédemment) à 1,22 nm ($2\theta = 7,2^\circ$). Cette diminution de la distance entre les molécules de collagène démontre l'effondrement du réseau de collagène.

Le signal principal sur les diffractogrammes passe de $2\theta = 21^\circ$ à $2\theta = 26,7^\circ$ (Fig. 18) après séchage de l'échantillon. En effet, dans l'échantillon « humide », les signaux à 0,33 nm et 0,21 nm sont dus à la diffusion de l'eau. Dans la matrice séchée, le signal à 0,42 nm est le résultat de la diffusion du capillaire de silice qui est trop faible par rapport à celui de l'eau pour être observé dans l'échantillon humide. C'est aussi grâce à la faible diffusion du capillaire, que le signal correspondant à la distance longitudinale ($2\theta = 30^\circ$, $d_{\text{longitudinal}} = 0,28$ nm) est plus marqué. La distance entre deux acides aminés le long de la chaîne peptidique reste bien inchangée après le séchage.

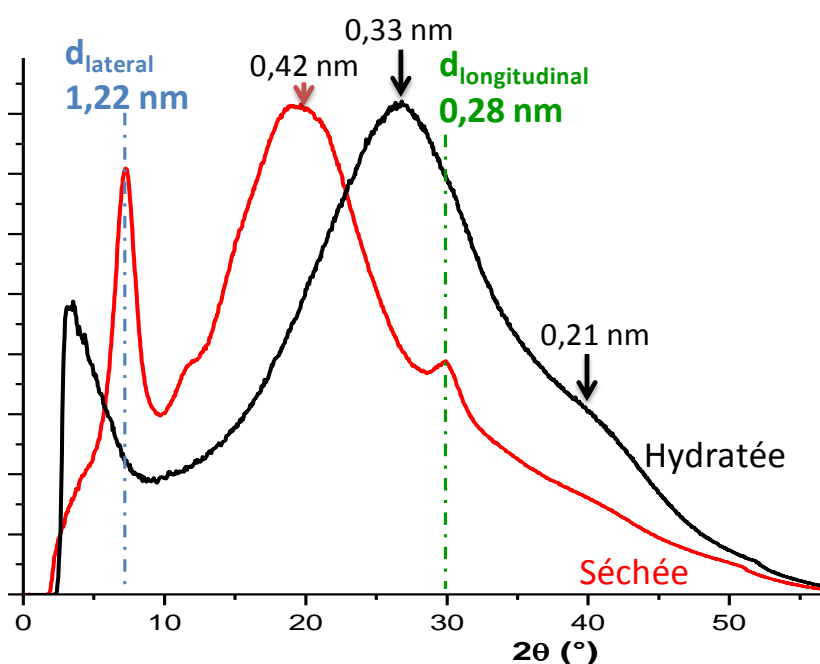


Figure 18 : Comparaison des profils de WAXS avant (profil noir) et après séchage de l'échantillon à température ambiante (profil rouge) d'une matrice à 250 mg/mL

Ces résultats montrent que la perte de l'eau physisorbée affecte le réseau de collagène, mais que la molécule de collagène reste intacte. Ces différents profils seront utiles pour l'interprétation des diffractogrammes obtenus en présence du minéral. Notons que l'impact de la déshydratation sur le réseau de collagène est un phénomène très connu et

amplement étudié dans le contexte des propriétés mécaniques du tissu osseux (Balooch, 2008).

2.3 Matériaux mimétiques des tissus biologiques

La biocompatibilité d'un matériau dépend de sa capacité d'intégration au sein de tissus biologiques, c'est-à-dire à être facilement colonisé par les cellules de l'hôte, à ne pas provoquer de réactions d'inflammation et à être dégradé par l'organisme à la vitesse de l'application souhaitée (Parenteau-Bareil, 2010). Ces propriétés sont fortement liées à la composition chimique et à l'organisation du matériau.

Dans les années 1960, des tissus biologiques décellularisés ont commencé à être utilisés pour des applications médicales (Carpentier, 1977). Mais le choix de l'origine animal du tissu biologique reste complexe à cause des problèmes de biocompatibilité. Les tissus biologiques, le derme ou l'os déminéralisé, utilisés comme bioprothèses sont composés principalement de collagène. Le collagène étant un composant important de la MEC, il correspond à un matériau à la fois biomimétique au niveau fibrillaire et biodégradable au niveau moléculaire. Par contre, ces premières matrices de collagène sont peu concentrées et donc sont réticulés chimiquement (cross-link) afin d'augmenter leurs propriétés mécaniques (Jayakrishnan, 1996). La présence d'agents réticulants tels que le glutaraldehyde (Carpentier, 1969), le formaldéhyde (Buch, 1970), le poly(oxyéthylène) (Tu, 1993), provoque des inflammations dans l'organisme. Ces matrices sont, de plus, rarement biodégradables. L'ajout de molécules anti-inflammatoires est devenue obligatoire (Balakrishnan, 2011).

Les matrices denses de collagène, en particulier celles à 250 mg/mL, montrent une bonne tenue mécanique qui est certainement liée à leur structure tridimensionnelle et aux nombreuses liaisons hydrogène et électrostatiques entre molécules et fibrilles de collagène. Nous avons testé leur cytocompatibilité *in vitro* et leur biocompatibilité *in vivo*.

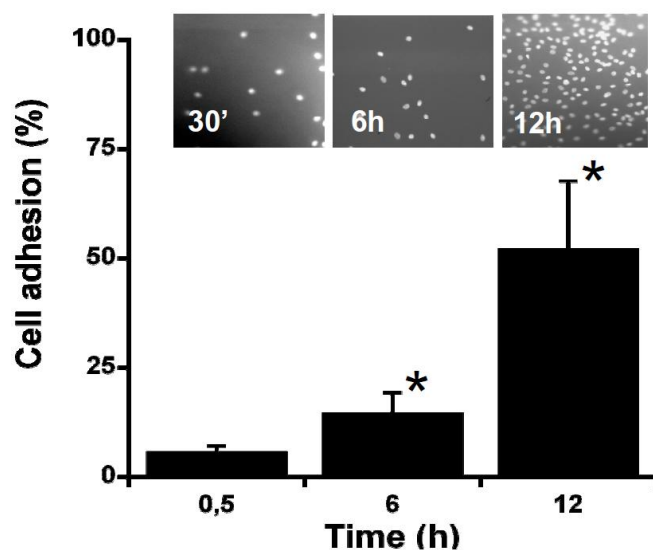


Figure 19 : Test d'adhésion cellulaire: Evolution du pourcentage d'adhésion en fonction du temps sur une matrice de collagène à 250 mg/mL (D'après Wang, 2011)

Un test d'adhésion cellulaire (Fig. 19) a été réalisé avec des fibroblastes dermiques humains déposés sur l'ensemble de l'échantillon. Ces cellules synthétisent le collagène *in vivo*. Après 30 min, 3h et 6h de contact avec la matrice, la quantité de cellules adhérentes est respectivement de $5,9 \pm 1,1\%$, $16,7 \pm 5,5\%$ et $14,8 \pm 4,5\%$ (Fig. 19). Après 12h d'expérience, l'adhésion cellulaire atteint un maximum $52,2 \pm 15,3\%$. Les matrices de collagène montrent une bonne adhésion des fibroblastes, premier critère important pour l'intégration de la matrice dans le tissu biologique.

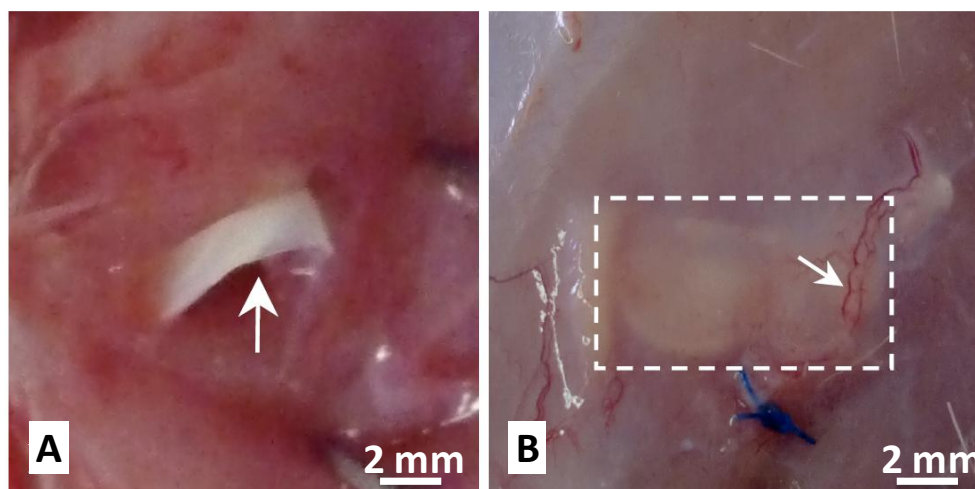


Figure 20: Photos de matrice à 250 mg/mL implantée dans un site intramusculaire au niveau abdominal d'un rat (A) après 30 jours d'implantation (B) la taille de la matrice de collagène a diminué, taille initiale (- - -)

Le test *in vivo* de biocompatibilité a été réalisé sur des petits animaux, des rats de type Wistar. Les matrices à 250 mg/mL ($0,5 \text{ cm}^2$ de surface et 1 mm d'épaisseur) ont été implantées en intramusculaire chez trois rats (Fig. 20A). La matrice est toujours visible après

30 jours, mais la taille de l'implant a diminué (Fig. 20B). Ceci démontre que la matrice de collagène qui a été remaniée et intégrée par l'organisme hôte, possède de bonne propriété de biodegradabilité. L'étude histologique (Fig. 21) montre un début de colonisation cellulaire : les fibroblastes migrent vers l'intérieur de la matrice et les vaisseaux sanguins commencent à se développer au sein de l'implant (marqués *f* et *v* sur Fig. 21C).

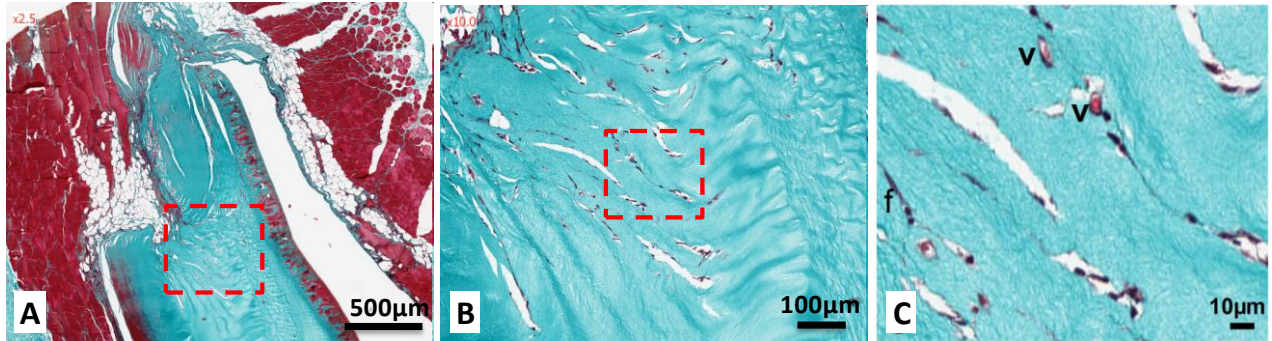


Figure 21 : Observation des coupes histologiques de la matrice implantée : Présence de fibroblastes (*f*) et de vaisseaux (*v*)

Tous ces résultats de tests *in vivo* montrent que la matrice de collagène présente une bonne réponse de biocompatibilité (absence d'inflammation) et de biodégradabilité (décomposition de matrice). L'absence d'agent réticulant assure aussi la non-toxicité de l'échantillon (Khor, 1997).

III. Conclusions

Nous avons réussi à mettre en place un nouveau procédé de concentration de collagène en couplant deux techniques de la littérature. Ce procédé nous donne accès à la synthèse de matrices de collagène à haute concentration (par exemple 250 mg/ml) à partir de solutions faiblement concentrées en collagène (par exemple 1mg/mL). Notons que les matrices de collagène dans la littérature (fibrillaire et à l'état hydratée), possèdent généralement une concentration finale en collagène <5mg/mL quelque soit leur utilisation (modèle pour la biominéralisation, biomatériaux). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir contrôler la concentration finale de la solution de collagène, et d'avoir une organisation hiérarchique reproductible des fibrilles de collagène. De plus, la taille des fibrilles semble être calibrée.

Grâce aux propriétés lyotropiques du collagène, les fibrilles de collagène précipitées après la fibrillogénèse présentent au sein des matrices un arrangement tridimensionnel hélicoïdal ou « contre-plaqué torsadé » tel qu'on les observe dans le tissu osseux décalcifié.

Ce procédé nous a donné accès à la synthèse de composites collagène/apatite nécessaires à l'étude de la biominéralisation de l'os, composites dont l'étude sera décrite dans le chapitre III.

Finalement, les résultats des tests de biocompatibilité et de biodégradabilité montrent que les matrices de collagène préparées par ce procédé sont de bons candidats pour des applications en ingénierie tissulaire.

Références bibliographiques

- A**
- B**
- Bailey **1998** Bailey, A.J. ; Paul, R.G. ; Knott, L. Mechanisms of Ageing and Development 1998 106, 1-56.
- Balakrishnan **2011** Balakrishnan, B.; Banerjee, R. Chemical reviews 2011, 111, 4453-74.
- Balooch **2008** Balooch, M.; Habelitz, S.; Kinney, J. H.; Marshall, S. J.; Marshall, G.W. Journal of Structural Biology, 2008, 162, 404-410.
- Banfield **1954** Banfield, W. G. In Connective Tissue in Health and Disease 1954
- Bergman **1963** Bergman, I. ; Loxley, R., Analytical Chemistry 1963 35, 1961–1965.
- Besseau **1995** Besseau, L.; Giraud-Guille, M. M. Journal of molecular biology 1995, 251, 197-202.
- Besseau **2002** Besseau, L., Coulomb, B., Lebreton-Decoster, C., Giraud-Guille, M.-M., Biomaterials 2002 23, 27–36.
- Bouligand **1972** Bouligand, Y., Tissue and Cell, 1972, 4, 189-217.
- Bouligand **1985** Bouligand, Y.; Deneffe, J.-P.; Lechaire, J.-P.; Maillard, M. Biology of the Cell 1985, 143-162.
- Brodsky **1982** Brodsky, B.; Eikenberry, E. F.; Belbruno, K. C.; Sterling, K. Biopolymers 1982, 21, 935-51.
- Brown **2005** Brown, R. A.; Wiseman, M.; Chuo, C.; Cheema, U.; Nazhat, S. N. Advanced Functional Materials, 2005, 15, 1762–1770.
- Buch **1970** Buch, W.S.; Kosek, J.; Angell, W.W. Journal of Cardiovascular Surgery 1970 60: 673-682.
- C**
- Carpentier **1969** Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C., Journal of Cardiovascular Surgery 1969; 5k467-483.
- Carpentier **1977** Carpentier, A. Medical Instrumentation 1977; 11 (2): 98-101.
- D**
- Danielsen **1986** Danielsen, C. ; Andreassen, T. ; Mosekilde, L. Calcified Tissue International 1986, 39, 69-73
- E**
- Engel **1997** Engel, J. Science 1997 277 (5333): 1785-1786
- F**
- Falini **1998** Falini, G.; Fermani, S.; Gazzano, M.; Ripamonti, A. Chemistry - A European Journal 1998, 4, 1048-1052.
- Fratzl **1993** Fratzl, P.; Fratzl-Zelman, N.; Klaushofer, K. Biophysical Journal 1993;64:260–6.
- G**
- Giraud-Guille **1989** Giraud-Guille, M.M. Biology of the Cell 1989, 67, 97–101.
- Giraud-Guille **1992** Giraud Guille, M.M., Journal of Molecular Biology 1992 224, 861–873.
- Giraud-Guille **1996** Giraud-Guille, M.M., International Review of Cytology, 1996, 166, 59-101.
- Giraud-Guille **1998** Giraud-Guille, M.M., Besseau, L., Connective Tissue Research 1998 37, 183–193.
- Giraud-Guille **2005** Giraud Guille, M.M.; Mosser, G.; Helary, C.; Eglin, D. Micron (Oxford, England : 1993) 2005, 36, 602-8.
- Giraud-Guille **2010** Giraud-Guille, M. M.; Helary, C.; Vigier S.; Nassif, N. Soft Matter, 2010, 6, 4963–4967.

Glimcher 1957	Glimcher, M. J.; Hodge, A. J.; Schmitt, F. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1957, 43, 860-867.
Glimcher 1960	Glimcher M.J. Specificity of the molecular structure of organic matrices in mineralization. In Calcification in Biological Systems. Sognaes RF (ed) American Association for the Advancement of Science, 1960, 421-487
Glimcher 2006	Glimcher, M. J. Reviews in Mineralogy and Geochemistry 2006, 64, 223-282.
Gobeaux 2008	Gobeaux, F.; Mosser, G.; Anglo, A.; Panine, P.; Davidson, P.; Giraud-Guille, M.-M.; Belamie, E. Journal of molecular biology 2008, 376, 1509-22.
Gross 1958	Gross, J. ; Kirk, D., Journal of Molecular Biology, 1958, 233, 355–360
H	
Hanson 1996	Hanson, D.A. ; Eyre, D.R. Journal of Biological Chemistry 1996, 271, 26508-26516.
Helary 2005	Helary, C., Foucault-Bertaud, A., Godeau, G., Coulomb, B., Giraud-Guille, M.-M., Biomaterials 2005 26, 1533–1543.
Hodge 1963	Hodge, A.J., and Petruska, J.A. (1963). Aspects of Protein Structure, G.N. Ramachandran (ed.) pp. 289–300. New York: Academic Press.
Hulmes 1977	Hulmes, D. J. S.; Miller, A.; White, S.W.; Doyle, B. B. Journal of Molecular Biology 1977, 110, 643.
Hulmes 1979	Hulmes, D. J. S.; Miller, A., Nature 1979, 282, (5741), 878-880.
I	
J	
Jayakrishnan 1996	Jayakrishnan .A, Jameela SR., Biomaterials 1996 17: 471-484.
K	
Kadler 1996	Kadler, K. E.; Holmes, D. F.; Trotter, J. a; Chapman, J. a The Biochemical journal 1996, 316, 1-11
Katz 1973	Katz, E. P.; Li, S.-T. Journal of Molecular Biology 1973. 73, 351–369.
Khor 1997	Khor, E. Biomaterials 1997, 18, 95-105.
Knight 1998	Knight, D.P.; Nash, L.; Hu, X. W.; Haffegge, J.; Ho, M. W. Journal of Biomedical Materials Research, 1998, 41, 185–191.
L	
Landis 1996	Landis, W.J., Hodgens, K.J., Song, M.J., Arena, J., Kiyonaga, S., Marko, M., Owen, C., McEwen, B.F., Journal of Structural Biology 1996 117, 24–35.
Lees 1986	Lees, S.; Mook, H. A. Calcified Tissue International 1986;39:291–2.
M	
Martin 2000	Martin, R.; Farjanel, J.; Eichenberger, D.; Colige, a; Kessler, E.; Hulmes, D. J.; Giraud-Guille, M. M. Journal of molecular biology 2000, 301, 11-7.
Maxwell 2006	Maxwell, C. A.; Wess, T. J.; Kennedy, C. J. Biomacromolecules 2006, 7, 2321-2326.
Mkukuma 2004	Mkukuma, L. D.; Skakle, J. M. S.; Gibson, I. R.; Imrie, C. T.; Aspden, R. M.; Hukins, D. W. L., Calcified Tissue International 2004, 75, (4), 321-328.
Mosser 2006	Mosser, G.; Anglo, A.; Helary, C.; Bouligand, Y.; Giraud-Guille, M.-M. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology 2006, 25, 3-13.
N	
Neville 1993	Neville, A. C. Biology of Fibrous Composites, Cambridge University Press, Cambridge. 1993
O	
P	

Parenteau-Bareil **2010** Parenteau-Bareil, R.; Gauvin, R.; Berthod, F. *Materials* 2010, 3, 1863-1887.

Pasteris **2008** Pasteris, J.D. ; Wopenka, B. ; Valsami-Jones, E. *Elements* 2008, 4, 97-104.

Place **2009** Place, E. S.; Evans, N. D.; Stevens, M. M. *Nature materials* 2009, 8, 457-70.

Pollard **2004** Pollard, T. D. ; Earnshaw, W. C. *Biologie cellulaire*. Elsevier Science Inc ; 2004

Prockop **1984** Prockop DJ ; Kivirikko KI. *The New England Journal of Medicine* 1984, 311, 376–96.

Q
R
S

Saitô **1992** Saitô, H.; Yokoi, M. *Journal of biochemistry* 1992, 111, 376-82.

Silver **2002** Silver, F.H. ; Horvath, I. ; Foran, D.J. *Journal of Theoretical Biology* 2002, 216:243–254.

Szpak **2011** Szpak, P. *Journal of Archaeological Science* **2011**, 38, 3358-3372.

T

Torchia **1976** Torchia, D.A. ; VanderHart, D.L. *Journal of Molecular Biology* 1976 104, 315-332

Tu **1993** Tu R, Lu CL, Thyagarajan K, *Journal of Biomedical Materials Research* 1993; 27: 3-9.

U
V

Veis **1984** Veis, A. *Bones and teeth* 1984, Elsevier, New York, pp. 330-374.

W

Wang **2011** Wang, Y.; Silvent, J.; Robin, M.; Babonneau, F.; Meddahi-Pellé, A.; Nassif, N.; Giraud Guille, M. M. *Soft Matter* 2011, 7, 9659.

Weiner **1998** Weiner, S.; Wagner, H. D. *Annual Review of Materials Science* 1998, 28, 271-298.

White **1977** White, S.W.; Hulmes, D. J. S.; Miller, A.; Timmins, P. A. *Nature* 1977, 266, 421.

Woodhead-Galloway **1982** Woodhead-Galloway, J. *The anatomy of a protein* 1982 London : Edward Arnold

X
Y
Z

Zhu **2009** Zhu, P.; Xu, J.; Sahar, N.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Ramamoorthy, A. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131, 17064-5.

Chapitre II. La composante minérale du tissu osseux : l'hydroxyapatite

I.	Les apatites biologiques et leurs analogues de synthèse.....	33
1.	L'hydroxyapatite stœchiométrique.....	33
2.	Les apatites biologiques	35
3.	Les apatites synthétiques	38
3.1	Les apatites carbonatées.....	38
3.2	Méthodes de caractérisation des apatites carbonatées	39
3.3	Les méthodes de synthèse	42
II.	Hydroxyapatites carbonatées préparées par neutralisation	45
1.	Synthèse	45
2.	Caractérisation.....	46
2.1	Analyse élémentaire	46
2.2	Diffraction des Rayons X.....	48
2.3.	Microscopie électronique à transmission	49
2.4	Spectroscopie Infrarouge	50
2.5	Spectroscopie RMN	53
3.	Conclusion.....	60
III.	Etude d'apatites « biomimétiques »	61
1.	Présentation des échantillons	61
2.	Comparaison de la composition des apatites.....	62
3.	Comparaison structurale à diverses échelles	63
3.1.	Caractérisation microstructurale	63
3.2.	Caractérisation de l'ordre local des phosphates par RMN	66
3.3	Caractérisation de la substitution par les ions carbonates.....	71
4.	Conclusion.....	73
	Références bibliographiques	75

La composante minérale du tissu osseux : l'hydroxyapatite

Le chapitre précédent a été consacré à la composante organique principale du tissu osseux, le collagène, et à l'optimisation d'un protocole de synthèse permettant d'en reproduire la structure tridimensionnelle à plusieurs échelles. Ce chapitre est maintenant consacré à la composante minérale du tissu osseux.

I. Les apatites biologiques et leurs analogues de synthèse

La phase minérale dans l'os a une structure très proche de la structure hexagonale de l'hydroxyapatite, mais avec la présence de nombreuses substitutions par des ions tels que F^- , Na^+ , Mg^{2+} ..., les principaux substituants étant les ions carbonate.

Avant d'étudier cette apatite biologique présente dans le tissu osseux qui est une composante très complexe, nous avons dans un premier temps étudié des apatites de synthèse « modèles » afin de comprendre l'effet de la substitution par des ions carbonates sur les caractéristiques structurales des apatites. Pour cela, nous avons choisi une méthode de synthèse par neutralisation permettant l'obtention d'apatites substituées avec des taux variables de carbonates (Osaka, 1991). Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation d'apatites de synthèse dites « biomimétiques » obtenues précédemment au laboratoire (Nassif, 2010), en les comparant à des apatites biologiques présentes dans des tissus osseux.

1. L'hydroxyapatite stœchiométrique

L'hydroxyapatite appartient à la famille de composés iono-covalents de formule générale $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$, où Me est un ion bivalent, XO_4 un ion trivalent et Y un ion monovalent. Deux structures sont répertoriées pour l'hydroxyapatite. La première est la structure monoclinique de groupe d'espace $P2_1/b$ qui correspond à l'hydroxyapatite très pure et strictement stœchiométrique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (HAp) (Elliot, 1973). Les conditions de formation de cette hydroxyapatite stœchiométrique sont très strictes, car la présence de la moindre impureté ou défaut induit la formation d'une hydroxyapatite de structure hexagonale de groupe d'espace $P6_3/m$ (Kay, 1964).

A cause de la similarité entre les apatites biologiques et l'hydroxyapatite de structure hexagonale (Posner, 1958 & Smith, 1978), nous nous sommes intéressés uniquement à cette dernière structure dans ce travail. L'hydroxyapatite stœchiométrique possède dans le système hexagonal les paramètres cristallographiques suivants (Kay, 1964) (JCPDS n°9-432) :

$$a = b = 9,42 \text{ \AA} ; c = 6,89 \text{ \AA} ; \alpha = \beta = 90^\circ ; \gamma = 60^\circ.$$

La maille cristalline contient un motif $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Le squelette cristallin est constitué d'un arrangement quasi-compact des tétraèdres PO_4^{3-} dans lequel tous les PO_4 sont cristallographiquement équivalents. La projection selon le plan (001) de la maille (Fig. 1) montre deux types de tunnels parallèles à l'axe c . Le premier tunnel (tunnel I) avec un diamètre de 2 Å, est entouré de 6 groupes PO_4^{3-} et est occupé par les ions Ca^{2+} (site Ca I), tandis que le deuxième (tunnel II) avec un diamètre de 3 Å, est formé par 6 ions de calcium (Ca II) et est occupé par les ions hydroxydes OH^- dont la liaison O-H est parallèle à l'axe c . Ces tunnels permettent des échanges d'ions et le stockage de petites molécules, comme O_2 , H_2O , etc. (Elliot, 1994).

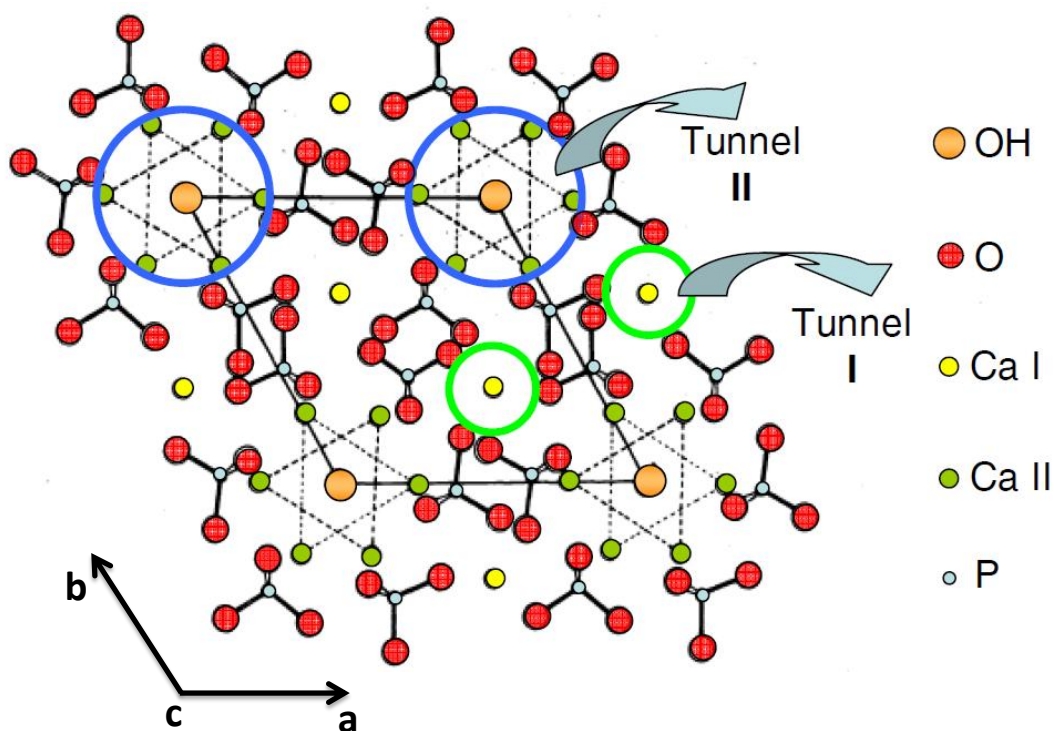


Figure 1: Maille de l'hydroxyapatite selon le plan (001) (D'après Young, 1973)

La structure apatitique peut incorporer une grande variété de substitutions tant cationiques qu'anioniques. La substitution par des cations monovalents (Na^+ , NH_4^+), divalents (Mg^{2+} , Zn^{2+} , etc.), trivalents (Terre Rare $^{3+}$), tétravalents (Th^{4+}), et même hexavalents (U^{6+}) a été reportée (Pan, 2002). Quant aux ions OH^- qui possèdent une grande mobilité, ils peuvent être facilement substitués soit par des ions monovalents (Cl^- , F^-), soit par des divalents comme

CO_3^{2-} . Les sites PO_4^{3-} peuvent être occupés par des anions, comme SiO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} ... La substitution peut impliquer des ions de différentes charges et tailles, ce qui peut entraîner une substitution couplée et/ou la création de lacunes dans la structure afin de maintenir l'électroneutralité au sein de la maille (Mason, 2008). La présence de substituants et de lacunes ne modifient pas significativement la structure de l'apatite. Les paramètres de maille peuvent varier en fonction de la substitution, de 9,37 à 10,75 Å pour a et 6,78 à 7,64 Å pour c (Skinner, 2005).

2. Les apatites biologiques

Le processus selon lequel un organisme vivant forme une phase minérale constitue la biominéralisation. Il a lieu, entre autre, dans des tissus biologiques tels que l'os ou les dents chez les vertébrés. La phase minérale est dans ces exemples, un phosphate de calcium dont la structure est très proche de l'hydroxyapatite (Roseberry, 1931 & Smith, 1978). La morphologie des cristaux et leur composition sont très différentes d'un tissu à un autre, ce qui montre une grande adaptabilité de la phase minérale à la fonction du tissu biologique. Le tableau 1 présente un exemple des compositions chimiques élémentaires des phases minérales dans des tissus biologiques variés. Ainsi dans l'émail et la dentine, la phase minérale est proche de la stœchiométrie, très cristallisée, et très insoluble afin de résister aux agressions externes (pH faible, bactéries...). Il faut néanmoins noter que le plus fort taux de substitution, quelque soit le tissu, est celui par les ions carbonates.

Constituant	Émail	Dentine	Os	HAP
Ca (%)	37,6	40,3	36,6	39
P (%)	18,3	18,6	17,1	18,5
CO ₂ (%)	3,0	4,8	4,8	/
Na (%)	0,7	0,1	1,0	/
K (%)	0,05	0,07	0,07	/
Mg (%)	0,2	1,1	0,6	/
Sr (%)	0,03	0,04	0,05	/
Cl (%)	0,4	0,27	0,1	/
F (%)	0,01	0,07	0,1	/

Tableau 1 : Comparaison de la composition chimique de divers tissus calcifiés en pourcentage massique (d'après d'Elliott, 1994)

Les particules d'apatite en forme de bâtonnets dans l'émail peuvent atteindre 100 nm de longueur et 50 nm de largeur (Fig. 2). Notons que le collagène n'est pas présent dans l'émail.

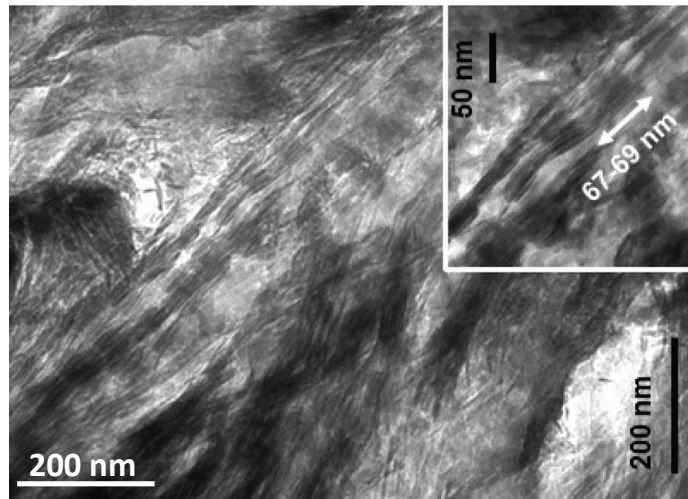


Figure 2 : Cliché de MET de l'émail humain recalcifié pour lequel une organisation régulière des cristaux de phosphate de calcium est observée. (D'après Burwell, 2012)

La phase minérale de l'os est par contre formée de nanoparticules d'apatite lacunaires présentant une solubilité relativement importante, afin d'assurer certaines fonctions de ce tissu, comme d'être remodelable et de pouvoir se comporter comme un réservoir d'ions. La morphologie de ces cristaux a été un sujet de débat dans la littérature. En effet, au sein des fibrilles de collagène, les cristaux sont souvent observés sous forme d'aiguilles (Fig. 3A). Néanmoins, de plus en plus d'études ont confirmé une morphologie en forme de plaquettes (Fig. 3B) (Bocciarelli, 1973 ; Kim, 1995 & Rubin, 2004). Les aiguilles observées correspondent à l'épaisseur des plaquettes, qui sont alignées selon l'axe cristallographique c par rapport à l'axe principal des fibrilles de collagène (Kim, 1995). Les cristaux ont une épaisseur qui varie entre 15 et 40 Å, ce qui correspond à seulement quelques unités de la maille cristalline. Ils ont des longueurs/largeurs moyennes égales à $500 * 250$ Å, l'axe c de la maille se trouvant dans ce plan (Weiner, 1998). La taille des plaquettes augmente avec l'âge de l'os, le taux de substitution carbonatée *in vivo*, la cristallinité et le rapport Ca/P. Le taux de carbonate dans le tissu osseux varie de 4 à 6 % en masse (LeGeros, 1991 & Elliott, 1994). Cette augmentation, accompagné d'une diminution de HPO_4^{2-} , a déjà été observée pendant la maturation des cristaux par Legros *et al.* (Legros, 1987) et la valeur du ratio Ca/P s'approche alors de celle de l'hydroxyapatite stœchiométrique (1,67).

La morphologie spécifique de la phase minérale dans l'os résulte d'interactions spécifiques avec les molécules organiques du milieu (collagène, protéines minéralisantes, protéoglycanes, etc.) (Lowenstam, 1989 & Mann, 1995).

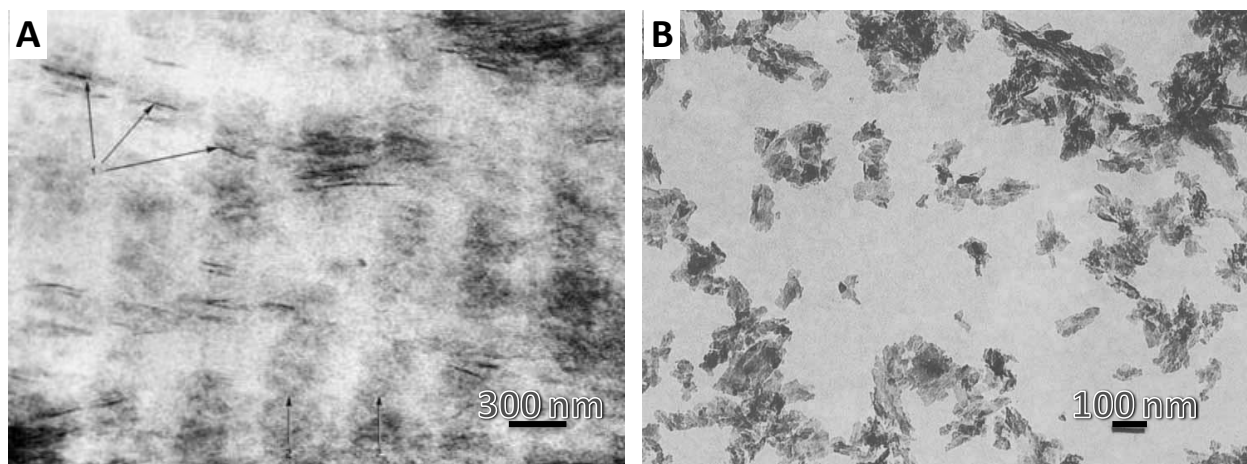


Figure 3 : Clichés de MET. A. Os de poule : la phase minérale apparaît sous forme d'aiguilles, l'intervalle régulier entre les cristaux est de 67 nm ce qui correspond à la « distance D » du collagène ; B. Cristaux d'apatite sous forme de plaquettes extraits de tendon calcifié de poulet (D'après A. Glimcher, 1968 et B. Landis, 1991).

Parmi tous ces tissus biologiques calcifiés, nous nous sommes intéressés ici uniquement aux tissus osseux. Nous nommerons la phase minérale du tissu osseux « bioapatite » dans la suite du manuscrit.

Nous avons vu précédemment que la structure de l'hydroxyapatite possède une grande capacité à accueillir des ions « étrangers ». Ainsi les bioapatites peuvent stocker et/ou libérer des ions comme Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- , CO_3^{2-} , OH^- , etc., ce qui est indispensable pour l'activité métabolique d'un organisme vivant. La substitution la plus importante dans le tissu osseux est comme nous l'avons déjà indiquée, celle par les ions carbonates dont le taux peut atteindre jusqu'à 8% en masse (Elliott, 2002). Des expériences *in vitro* montrent que la substitution en carbonate augmente la solubilité des cristaux d'apatite (Gron, 1963 ; Doi, 1997 ; Gibson, 1999 ; Webster, 2001 & Hankermeyer, 2002). Ceci laisserait supposer que les ions carbonates changent la réactivité de la surface des nanoparticules d'apatite (Porter, 2006). En revanche, dans les études *in vivo* la résorption des cristaux d'apatite diminue avec la maturation, étape pendant laquelle le taux de carbonate augmente. Ces deux observations semblent en contradiction, mais il faut rappeler ici que la variation de la quantité de carbonate dans l'apatite biologique est 5 fois plus faible (4 ~ 6 % masse) que dans les apatites synthétiques (2 ~ 20% masse), et la résorption des cristaux d'apatite biologique est liée avec l'activité des ostéoclastes, les cellules responsables de la résorption de la phase minérale dans le tissu osseux (Glimcher, 1976).

Une autre spécificité de l'apatite biologique osseuse est d'avoir une teneur en hydroxydes correspondant à seulement 20% de celle présente dans l'apatite stœchiométrique.

Ce taux réduit en ions hydroxydes est dû à la présence de substituant tels que les anions F⁻, Cl⁻ et CO₃²⁻, mais surtout à la présence de lacunes (Pasteris, 2004).

La composition chimique des bioapatites est fonction de l'activité biochimique de chaque individu. Elle dépend de la zone de l'os étudiée, du métabolisme cellulaire, de l'âge, de l'état de santé, etc. En plus, la composition chimique n'est pas homogène à l'intérieur d'une même plaquette d'apatite. Des études ont montré l'existence d'une couche désordonnée amorphe à la surface des cristaux où se trouveraient les principales substitutions et aussi de l'eau de structure (Huang, 2009 & Wu, 2002). La coexistence de différentes phases et les interactions spécifiques entre phase minérale et phase organique compliquent l'étude de ces bioapatites dont la composition et la structure cristalline restent mal définies. Une formule chimique générale $\text{Ca}_{10-x+\eta}\square_y(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x+\eta}\square_x$ a été proposée par Skinner (Skinner, 2000), qui prend en compte la présence d'éventuelles substitutions et de lacunes.

3. Les apatites synthétiques

De significatives différences de morphologie, composition chimique et taux de cristallinité existent entre l'hydroxyapatite stœchiométrique et la bioapatite. Il est néanmoins possible de synthétiser des apatites substituées ayant des caractéristiques proches de la bioapatite. L'étude de ces composés « modèles » peut s'avérer utile pour la compréhension des mécanismes de formation du tissu osseux. Ces composés ayant de très bonnes propriétés de biocompatibilité, présentent aussi un grand intérêt dans le cadre de la régénération des tissus osseux (Stupp, 1992 & Daculsi, 1997).

3.1 Les apatites carbonatées

Nous avons vu précédemment que dans l'os la substitution par les ions carbonates est la plus importante (Elliott, 2002). Ces ions sont après les ions calciums et phosphates, le troisième plus important constituant de la phase minérale de l'os. Ils jouent un rôle essentiel quant à la solubilité, et la cristallinité des apatites (Nelson, 1981 & Nelson, 1983). Il nous est donc apparu important d'étudier l'influence de la substitution par les ions carbonates sur les caractéristiques structurales des apatites.

Les ions carbonates peuvent être localisés dans deux types de sites dans la structure apatitique (Fig. 4). La substitution de type A correspondant à la localisation de l'ion carbonate dans le site OH⁻, alors que celle de type B correspond à l'occupation du site phosphate PO₄³⁻. Existe aussi une substitution de type AB qui correspond aux substitutions simultanées des sites A et B. Dans l'os, la majorité des substitutions sont de type B. Le type A représente

seulement environ 11% de l'ensemble des substitutions carbonatées dans l'os humain (Elliott, 1985).

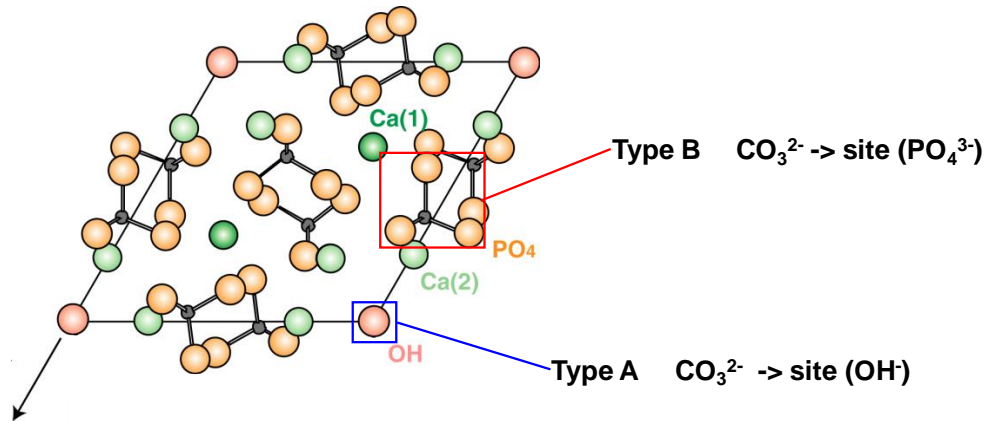
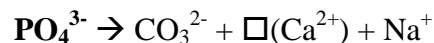
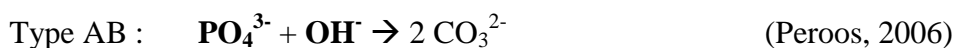


Figure 4 : Schéma des deux types de substitution possible pour les ions carbonates dans une maille apatitique

Les deux types de substitution nécessitent une compensation de charge pour assurer l'électroneutralité du motif cristallin. Or il existe beaucoup de combinaisons possibles pour la compensation de charge. Elle peut aussi bien être assurée par l'insertion d'ions tels que Na^+ , NH_4^+ , etc., quand ceux-ci sont présents, que par la protonation des carbonates et/ou des phosphates.



.....



Il est important de noter que l'environnement des ions carbonates pour un même type de substitution (type B) peut être variable selon le type de compensation de charge. Ceci explique la complexité des études structurales menées sur la substitution par les ions carbonates, que nous allons illustrer par quelques exemples de la littérature.

3.2 Méthodes de caractérisation des apatites carbonatées

Plusieurs techniques peuvent être mises en jeu, particulièrement spectroscopiques, pour caractériser les types de substitution existant dans les apatites carbonatées.

a) Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) est la technique la plus utilisée. En effet, les ions carbonates possèdent quatre modes de vibration dont trois sont actifs en infrarouge, et deux donnent lieu à des bandes intenses : le mode ν_1 (élongation symétrique) est actif seulement en Raman ; les modes ν_2 (déformation symétrique) et ν_3 (élongation asymétrique) apparaissent respectivement dans les domaines $900 - 850 \text{ cm}^{-1}$ et $1500 - 1350 \text{ cm}^{-1}$; l'intensité du mode ν_4 (déformation antisymétrique) ($761, 716, 711 \text{ cm}^{-1}$) est trop faible pour être observée (Vignoles, 1988 & Rey, 1989).

De plus, l'IR permet de différencier les ions carbonates selon leur site de substitution A ou B, car ils sont alors soumis à des contraintes structurales différentes. Le tableau 2 présente les fréquences des bandes d'absorption caractéristiques des groupements CO_3^{2-} , ainsi que PO_4^{3-} , au sein d'apatites carbonatées synthétiques de différentes natures (A, B et AB).

Groupements atomiques	ν_1 élong. sym.	ν_2 déform. sym.	ν_3 élong. antisym.	ν_4 déform. antisym.	Référence biblio.
CO_3^{2-} (site A)		880	1545, 1450	757, 670	Elliott 1994 Feki 1991
CO_3^{2-} (site A)		878	1540, 1500, 1465		Vignoles 1984
CO_3^{2-} (site B)		873	1465, 1412	710, 692	Elliott 1994 Feki 1991
CO_3^{2-} (site B)		871	1470, 1420		Vignoles 1984
CO_3^{2-} labile		866			Rey 1989
CO_3^{2-} (site AB)			1452, 1470, 1500, 1545, 1568		Rey 1989
PO_4^{3-} (apatite de type A)	950		1045, 1025	602, 572	LeGeros 1969
PO_4^{3-} (apatite de type B)	957		1090, 1040	602, 562	Barralet 1995

Tableau 2 : Bandes d'absorption caractéristiques des groupements CO_3^{2-} et PO_4^{3-} dans différents types d'apatites carbonatées synthétiques. Les valeurs des nombres d'ondes sont exprimées en cm^{-1} . (D'après Lafon, 2004)

Pour le mode de vibration ν_3 , l'attribution des sites A/B/AB reste complexe à cause du recouvrement des bandes. A part les exemples donnés dans le tableau 2, Fleet *et al.* (Fleet, 2004 & 2004B) ont démontré l'existence de deux types de site A (A1 à 1449 et 1540 cm^{-1} et A2 à 1507 et 1569 cm^{-1}) et un type de site B (à 1409 et 1474 cm^{-1}) dans une apatite de type AB synthétisée à haute pression.

L'identification des bandes IR est plus simple dans la région ν_2 où ne se trouve qu'une seule bande pour les types A et B (Elliott, 1994 & Rey, 1989).

b) Spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN ^{13}C est une technique qui a été beaucoup moins utilisée que l'IR pour étudier l'environnement chimique des carbonates, compte tenu de sa faible sensibilité, qui rend l'enrichissement isotopique souvent indispensable (Griffin, 1990 ; Kolodziejski, 2005 & Babonneau, 2007).

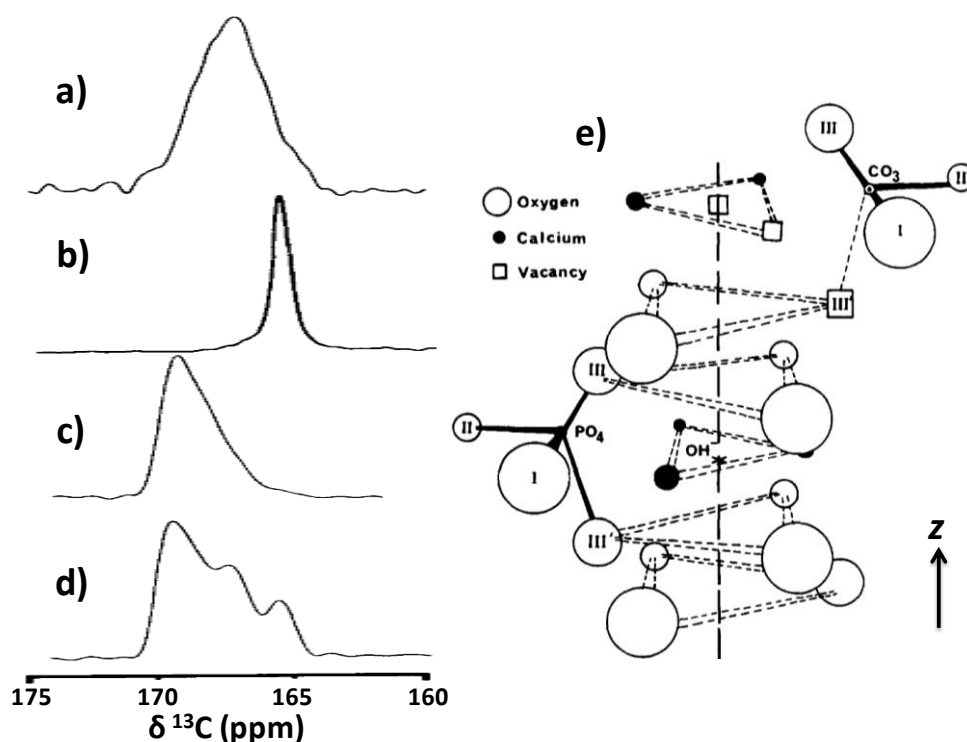


Figure 5 : Spectres RMN ^{13}C MAS de différentes apatites carbonatées : Apatite amorphe (a); Apatites carbonatées de type A (b), de type B (c) et de type AB (d). Position cristallographique des carbonates de type B dans la structure apatitique (e). Trois des quatre sites de l'oxygène I, II, III, III' (III et III' sont équivalents) sont occupés, le quatrième restant vacant, cela mène à différents environnements chimiques des carbonates de type B (D'après Griffin, 1990).

Griffin *et al.* ont identifié par RMN à l'état solide du ^{13}C cinq types d'ions carbonates magnétiquement non-équivalents à partir des différents types d'apatite carbonatée (Apatite amorphe, Apatites carbonatées de type A, B et AB) (Fig. 5) (Griffin, 1990). Les carbonates de type A se caractérisent par un signal fin à 166,5 ppm (Fig. 5b). Les ions carbonates de type B pourraient occuper trois positions cristallographiquement non-équivalentes créés par la présence d'un site vacant de l'oxygène (Fig. 5e), et la compensation de charge pourrait être réalisée par exemple par la création d'une paire de lacunes Ca^{2+} et OH^- . Néanmoins, seuls deux types de carbonate du type B sont identifiés par RMN ^{13}C (Fig. 5c)

avec un signal intense à 170,2 ppm et un plus faible à 169,7 ppm. Dans l'apatite amorphe, une grande distribution d'environnement de carbonates est observée ce qui induit un signal large à 169,5 ppm (Fig. 5a). Quant au spectre de l'apatite carbonatée de type AB (Fig. 5d), les auteurs ont proposé l'attribution suivante: type A à 166,5 ppm, et type B à 170,2 ppm. Quant au pic à 168,2 ppm, il a été attribué aux ions carbonates dans un environnement amorphe.

c) Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est une technique indirecte permettant d'identifier la présence de substituants dans la maille apatitique. Ainsi, l'incorporation des ions carbonates *in vitro* induit la contraction de la maille selon l'axe *a* (jusqu'à 9,369 Å) et son expansion selon *c* (jusqu'à 6,913 Å) (Nelson 1982) (Fig. 1). Une augmentation du rapport *c/a* a aussi été observée *in vivo* pendant la maturation des bioapatites (Meneghini, 2003). Ceci est probablement lié à l'augmentation du taux de carbonate pendant ce processus.

3.3 Les méthodes de synthèse

L'hydroxyapatite peut être synthétisée par de nombreuses voies d'élaboration en jouant sur la température, la pression, les précurseurs ioniques, le pH, etc. Le procédé choisi pour la synthèse de l'apatite est primordial, puisqu'il influe directement sur la morphologie, la taille, la cristallinité,... du produit final.

Par une réaction à l'état solide, un mélange de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ et $\text{Ca}(\text{OH})_2$ chauffé à 1250°C permet d'obtenir des particules d'apatite de grande taille (5 µm) (Ramachandra, 1997). La synthèse hydrothermale dont la température peut atteindre 1150°C, conduit à des apatites de taille nanométrique en forme de bâtonnets (Fig. 6A&B) (Suchanek, 2002). Sous certaines conditions, la synthèse en autoclave dans une gamme de température de 80 °C à 120 °C a permis d'obtenir des apatites en forme de plaquettes allongées selon la direction (001) (Fig. 6E&F) (Lin, 2009). L'apatite est aussi souvent utilisée pour les traitements de surface d'implants en métal inertes, afin d'exploiter sa propriété de biocompatibilité, et pour cela, une méthode de déposition électrochimique a été développée pour traiter les surfaces de prothèses en titane (Fig. 6C&D) (Sung, 2005).

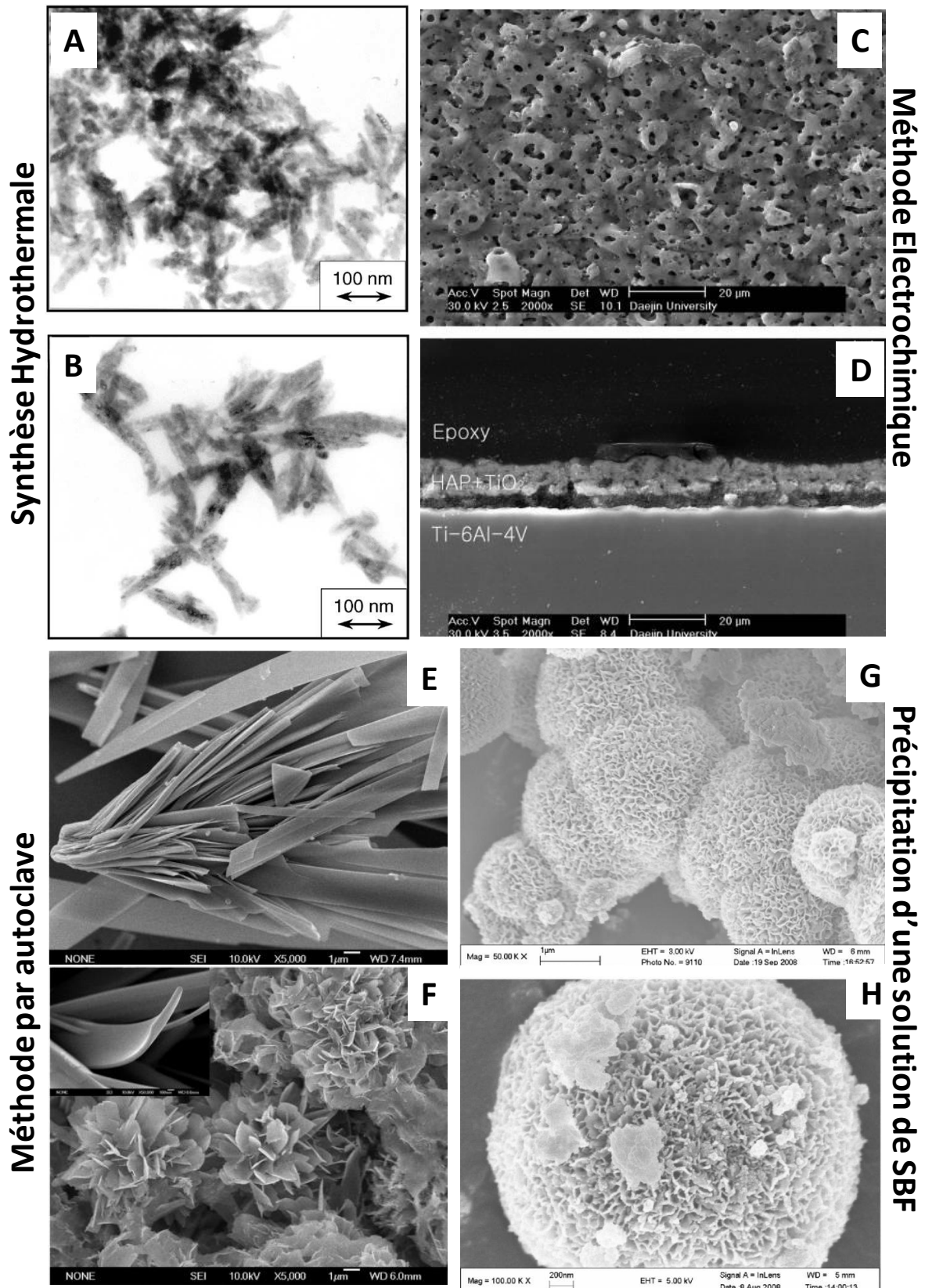


Figure 6 : Clichés de MET et de MEB d'apatites de diverses morphologies obtenues par différentes méthodes de synthèse. A et B : Synthèse hydrothermale (d'après Suchanek, 2002) ; C et D : Synthèse en autoclave (d'après Sung, 2005) ; E et F : Méthode électrochimique (d'après Lin, 2009) ; G et H : Synthèse par précipitation d'une solution physiologique (d'après Pan, 2009).

Ce ne sont que quelques exemples de synthèse parmi la multitude de méthodes proposées dans la littérature. Néanmoins, quelques types de synthèses réalisées à des températures pas ou peu élevées existent.

La première est la méthode dite de neutralisation qui consiste à remonter le pH d'une solution acide contenant des ions calcium en y ajoutant une solution basique de phosphates (Bernard, 1999). Nous avons nous choisi la méthode proposée par Osaka et al. (Osaka, 1991), avec qui le laboratoire collabore et qui s'intéresse notamment à l'absorption de protéines à la surface de ces apatites en fonction du taux de substitution en carbonate. Avec cette méthode, nous pouvons faire varier la quantité de carbonates ajoutés. Les hydroxyapatites obtenues sont bien cristallisées sous forme de petits bâtonnets, donc de formes très différentes des cristaux d'apatite biologique trouvées dans l'os qui sont sous forme de plaquettes.

Il est aussi possible de synthétiser des apatites plus « biomimétiques » dont la forme et la composition chimique sont très proches de celles de la bioapatite en essayant de reproduire les conditions de synthèse décrites *in vivo*.

Concentration (mM)	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
HBSS	141,5	5,8	1,3	0,8	4,2	144,9	0,8	0,8
SBF	141,8	5,0	2,5	1,5	4,2	148,0	1,0	0,5
Plasma sanguin humain	142,0	5,0	2,5	1,5	27,0	103,0	1,0	0,5

Tableau 3 : Comparaison des compositions chimiques de solutions physiologiques de synthèse avec celle du plasma sanguin humain

La première voie consiste à former des plaquettes d'apatites substituées sur une surface « bioactive » par imprégnation dans une solution contenant des sels. Cette solution est, soit une solution dont la concentration en sels est proche de celle du plasma sanguin humain, dite « solution physiologique » (Hanks, 1949 & Kokubo, 1987) ; soit un milieu de culture cellulaire, comme le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), qui contient des acides aminés, des sels (KCl, MgSO₄, NaCl et NaH₂PO₄), du glucose et des vitamines (Klagsbrun., 1979). Le DMEM est souvent utilisé pour des études de minéralisation cellulaire, et aussi pour les études de surfaces dites « bioactives », comme celles des bioverres (Hench, 1998 & Lao, 2009). Les solutions physiologiques sont elles aussi utilisées pour faire croître en surface une couche d'apatite « biomimétique » (Ramila, 2001) soit sur des particules (apatites synthétiques (Fig. 6G&H) (Pan 2009) ou phosphate tricalcique (Juhasz, 2008), par

exemple), soit sur des surfaces métalliques (prothèses (Kokubo, 1996 & Barrère, 1999)). Parmi toutes les solutions physiologiques proposées dans la littérature, les solutions HBSS (Hanks' balanced salt solution) (Hanks, 1949) et SBF (Simulated Body Fluid) (Kokubo, 1987) sont les plus utilisées (Tab. 3). Les principales différences entre ces deux solutions sont leur concentration en calcium et phosphates, et la présence de tampon phosphate dans SBF. Le SBF présente une plus grande similarité vis-à-vis du plasma sanguin humain, mais la présence du tampon qui stabilise les ions calcium en formant des complexes présente un désavantage pour l'utilisation de cette solution physiologique. Pour le traitement de surfaces « bioinertes », Rhee et Tanaka (Rhee, 2000) ont proposé une solution 1,5 fois plus concentrée en sels que le SBF. Ainsi, la formation de l'apatite est plus rapide à partir de cette solution métastable.

Une autre méthode de synthèse d'apatite biomimétique, inspirée d'un protocole de précipitation développé pour le carbonate de calcium (Addadi, 1987), a été mise au point au laboratoire par Nassif *et al.* (Nassif, 2010). Cette méthode consiste à remonter le pH d'une solution acide contenant les ions calcium et phosphates par diffusion de NH_3 . Cette méthode prend en compte des contraintes imposées par la matrice de collagène, en particulier les conditions de fibrillogénèse qui ont été détaillées dans le chapitre I ; la formation de l'apatite a donc lieu à température ambiante. La réalisation d'une co-précipitation des fibrilles de collagène et des cristaux d'apatite est de plus possible avec cette méthode ce qui sera largement illustré au chapitre III (Nassif, 2010B).

II. Hydroxyapatites carbonatées préparées par neutralisation

Dans cette première partie expérimentale, nous avons cherché à voir l'influence de la présence d'ions carbonates substitués sur les caractéristiques structurales de l'hydroxyapatite, puisque comme nous l'avons déjà mentionné, les ions carbonates sont toujours présents dans les bioapatites et constituent la famille la plus importante de substituants. Pour cette étude, nous avons choisi de synthétiser une série d'apatites avec la méthode de neutralisation qui permet de faire varier le taux de carbonates.

1. Synthèse

Nous avons utilisé la méthode proposée par Osaka et al. (Osaka, 1991). Cette synthèse par neutralisation consiste à ajouter un mélange d'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ et de bicarbonate de sodium NaHCO_3 (100 ml, pH =10) dans 100

ml de solution de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sous forte agitation à température ambiante. Les poudres obtenues après 24 h d'agitation sont ensuite lavées à l'eau, centrifugées et séchées à l'étuve à 105°C.

Echantillon	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mM)	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (mM)	NaHCO_3 (mM)
HAp	500	300	-
CHAp1,5	500	300	75
CHAp3	500	300	150
CHAp6	500	300	300

Tableau 4 : Concentrations en précurseurs utilisées pour les synthèses par neutralisation

La synthèse se déroule sous atmosphère contrôlée (Ar) et en utilisant de l'eau dégazée. Ces conditions permettent d'éviter la présence de CO_2 de l'air qui pourrait se dissoudre dans les solutions pendant la synthèse et ainsi fausser la quantité de carbonate obtenue. Les échantillons seront nommés dans le manuscrit en fonction de la quantité de carbonate ajoutée. Par exemple pour CHAp1,5, le rapport molaire Ca/P/C introduit lors de la synthèse est 10/6/1,5.

2. Caractérisation

Nous avons identifié la nature de la phase formée par diffraction des rayons X (DRX). L'environnement des sites P a été analysé par RMN à l'état solide du ^{31}P . Le taux de substitution par les ions carbonates a été déterminé par analyse chimique (spectrométrie d'émission optique, ICP-AES, au service central d'analyse du CNRS). Nous avons utilisé la spectroscopie Infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide du ^{13}C , afin de déterminer les sites (type A/B/AB) occupés par les ions carbonates.

2.1 Analyse élémentaire

Les résultats d'analyse élémentaire sont regroupés dans le Tableau 5.

	Ca/P (molaire)	C (%mass)	N (%mass)	Na (%mass)
HAp	1,58	< 0,3	< 0,10	< 0,15
CHAp1,5	1,63	0,72	0,24	0,18
CHAp3	1,68	1,04	1,23	0,33
CHAp6	1,79	1,61	< 0,10	0,32

Tableau 5 : Résultats des analyses élémentaires réalisées sur les poudres d'apatite obtenues par neutralisation

Dans l'échantillon HAp, le rapport Ca/P est loin de la valeur stœchiométrique 1,67. Elle est donc déficitaire en calcium, et ce déficit ne peut être dû à d'éventuelles substitutions

cationiques ou anioniques compte tenu de la faible quantité détectée de C, N et Na. Si nous nous basons uniquement sur les résultats d'analyse élémentaire, nous pouvons supposer une formule du type $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HPO}_4)_{0,33}(\text{OH})_{1,34}$ avec une grande quantité d'hydrogénophosphates. Or ce n'est pas ce que nous allons trouver lors de l'étude par RMN de cet échantillon. Ce point reste donc à éclaircir.

Pour les apatites carbonatées (CHAp), le rapport Ca/P augmente avec le taux de carbonate ajouté, ainsi que les quantités d'azote et de sodium (si on ne prend pas en compte la teneur en azote de l'apatite CHAp6 dont la valeur reste à vérifier, l'analyse élémentaire n'ayant été réalisée qu'une seule fois). Nous avons vu précédemment que les carbonates se localisent souvent majoritairement dans les sites des phosphates, ce qui pourrait expliquer la diminution de la teneur en phosphate et l'augmentation simultanée en carbonate. Il ne faut pas oublier que les autres ions NH_4^+ et Na^+ peuvent aussi se trouver dans la structure apatitique et que leur présence va influencer sur le rapport Ca/P. Mais nous n'allons pas détailler par la suite ces deux derniers types de substitution.

Afin de déterminer le vrai taux de substitution par les ions carbonate dans les échantillons, nous avons comparé les résultats d'analyse élémentaire et les valeurs théoriques introduites lors de la synthèse (Fig. 7). Le pourcentage massique en carbonates est calculé à partir du pourcentage massique en carbone (Tab. 5), en supposant que tout le carbone est sous forme d'ions carbonates dans les échantillons. Nous obtenons donc respectivement 3,6, 5,2 et 8,1% pour le pourcentage massique de CO_3^{2-} dans CHAp1,5, CHAp3 et CHAp6.

Le taux d'incorporation, c'est-à-dire la quantité de carbonate mesurée sur la quantité de carbonate théorique, diminue avec la quantité de carbonate ajouté. Il est de 44%, 34% et 26% pour CHAp1,5, CHAp3 et CHAp6 respectivement. Néanmoins, dans l'échantillon CHAp6, nous avons réussi à incorporer 8% en masse de carbonate, taux de substitution très important pour une synthèse réalisée dans des conditions de faibles température et pression.

Il est intéressant de remarquer que le rapport Ca/P diminue faiblement avec l'insertion de carbonate dans les échantillons $\text{HAp} \rightarrow \text{CHAp}_{1,5} \rightarrow \text{CHAp}_3$ (Fig. 7). De CHAp3 à CHAp6, le rapport Ca/P reste à la même valeur, bien que la quantité de carbonate continue à augmenter. Ceci pourrait suggérer que les ions carbonate commencent par substituer les sites PO_4^{3-} (Type B), puis les sites OH^- (Type A). Or ce n'est pas ce que nous allons trouver lors des caractérisations par IR du type de substitution de ces échantillons.

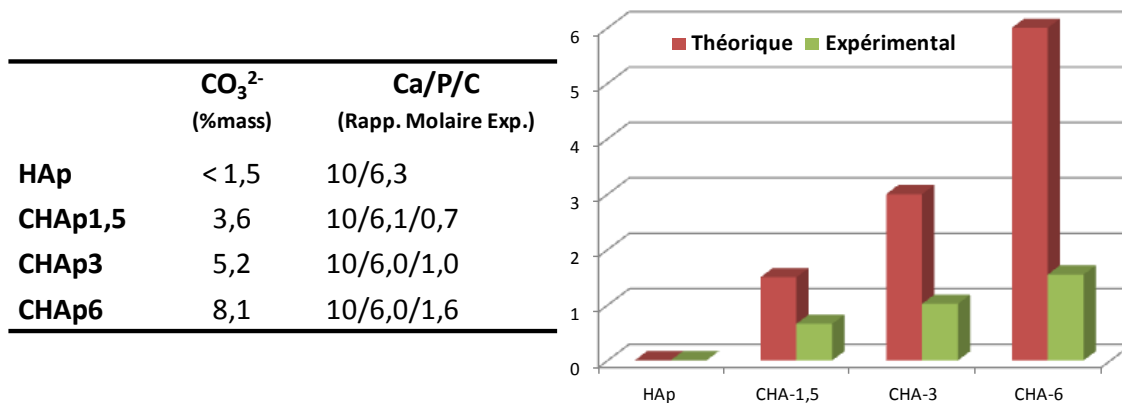


Figure 7: A gauche : Tableau récapitulatif des quantités de carbonate présents dans les échantillons synthétisés par la méthode de neutralisation, ainsi que des rapports molaires Ca/P/C déterminés par analyse élémentaire ; A droite : Comparaison des quantités de carbonate théoriques et expérimentales.

2.2 Diffraction des Rayons X

Par diffraction des rayons X (DRX) sur poudre (Fig. 8), aucune phase de phosphate de calcium autre que l'hydroxyapatite n'a pu être identifiée dans les diffractogrammes et ce quelque soit l'échantillon.

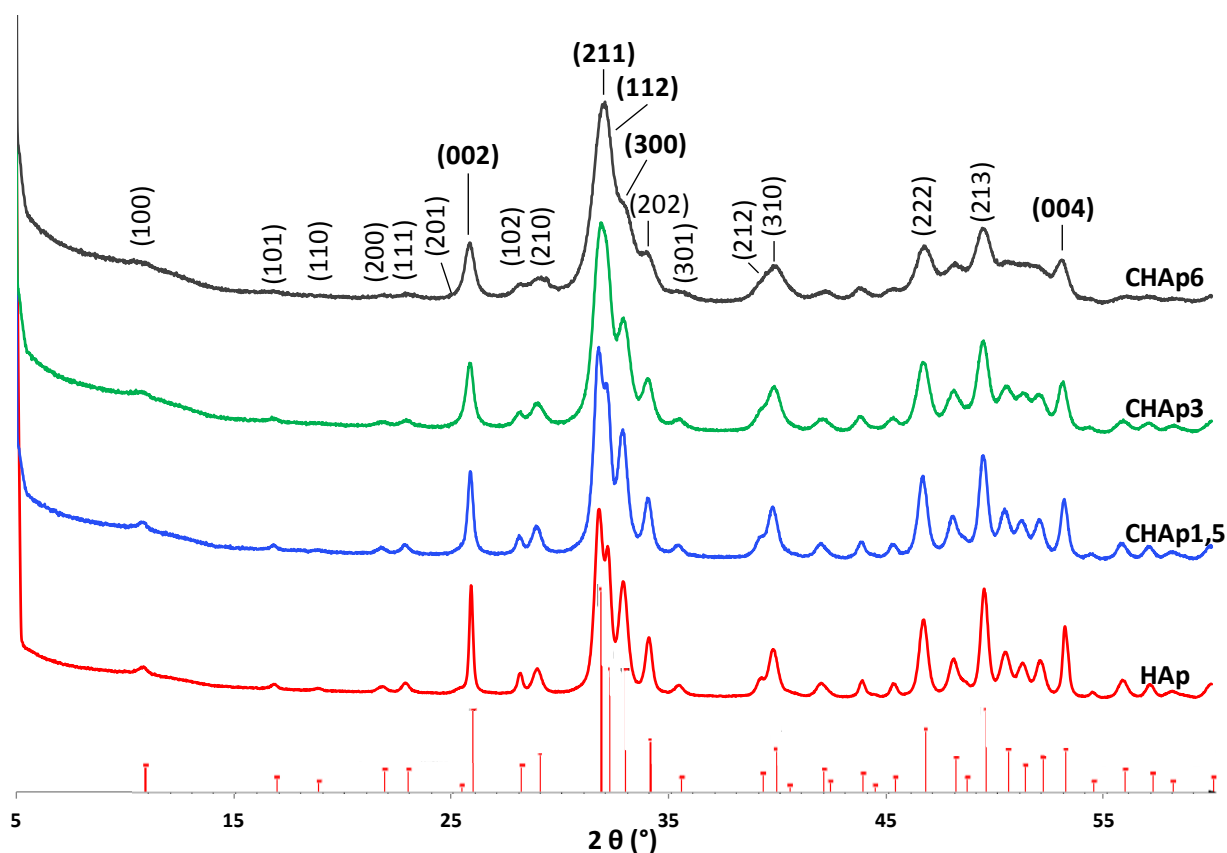


Figure 8: Comparaison des diffractogrammes de HAp, CHAp1,5, CHAp3, CHAp6 avec la fiche JCPDS 9-0432 correspondant à l'hydroxyapatite de structure hexagonale.

Nous avons pu estimer les paramètres de maille (Tab. 6) ainsi que la taille des cristallites (Tab. 7) dans le plan ab et selon l'axe c par affinement du profil des raies de diffraction grâce au logiciel FullProf (Rodríguez-Carvajal, 1993). Nous observons une diminution du rapport a/c avec l'augmentation du taux de carbonate (Tab. 6). Ceci est cohérent avec l'observation de la variation des paramètres de maille des apatites carbonatées reportée dans la littérature (Nelson, 1982).

Echantillon	a (Å)	c (Å)
HAp	$9,425 \pm 0,002$	$6,878 \pm 0,001$
CHAp1,5	$9,430 \pm 0,001$	$6,885 \pm 0,001$
CHAp3	$9,420 \pm 0,001$	$6,897 \pm 0,001$
CHAp6	$9,414 \pm 0,003$	$6,909 \pm 0,002$
Hydroxyapatite stœchiométrique	9,420	6,890

Tableau 6 : Paramètres de maille des divers échantillons d'apatites synthétisées par la méthode de neutralisation

L'échantillon HAp possède une taille de domaine de cohérence cristalline (25 nm *62 nm) plus importante que les apatites carbonatées. De plus, la taille des cristallites est plus important selon l'axe c que dans le plan ab . Ceci est corroboré par les observations de la morphologie des particules par microscopie à transmission électronique (Fig. 11).

Taille des cristallites	a (nm)	b (nm)	c (nm)
HAp	25	62	
CHAp1,5	20	30	
CHAp3	12	19	
CHAp6	7	10	

Tableau 7 : Paramètres de taille des cristallites de différents échantillons

2.3. Microscopie électronique à transmission

Ces nanoparticules d'apatites carbonatées ont été observées par MET. Dans le cas de l'hydroxyapatite stœchiométrique HAp, elles ont une morphologie en forme de petits bâtonnets allongés (Fig. 9), d'une longueur comprise entre 60 et 80 nm et d'une largeur d'environ 30 nm. La forme anisotrope de ces particules indique une direction préférentielle de croissance. Ce résultat est cohérent avec la taille des cristallites de cet échantillon, ce qui montre le caractère monocristallin des particules.

Avec l'augmentation du taux de carbonate, la taille des particules diminue et leur forme s'arrondit, conduisant à des particules plus isotropes. De tels changements ont déjà été observés par Nelson (Nelson, 1981). Ces résultats confirment le rôle d'inhibiteur de croissance du carbonate pendant la formation de l'apatite déjà reporté dans la littérature (LeGeros, 1967).

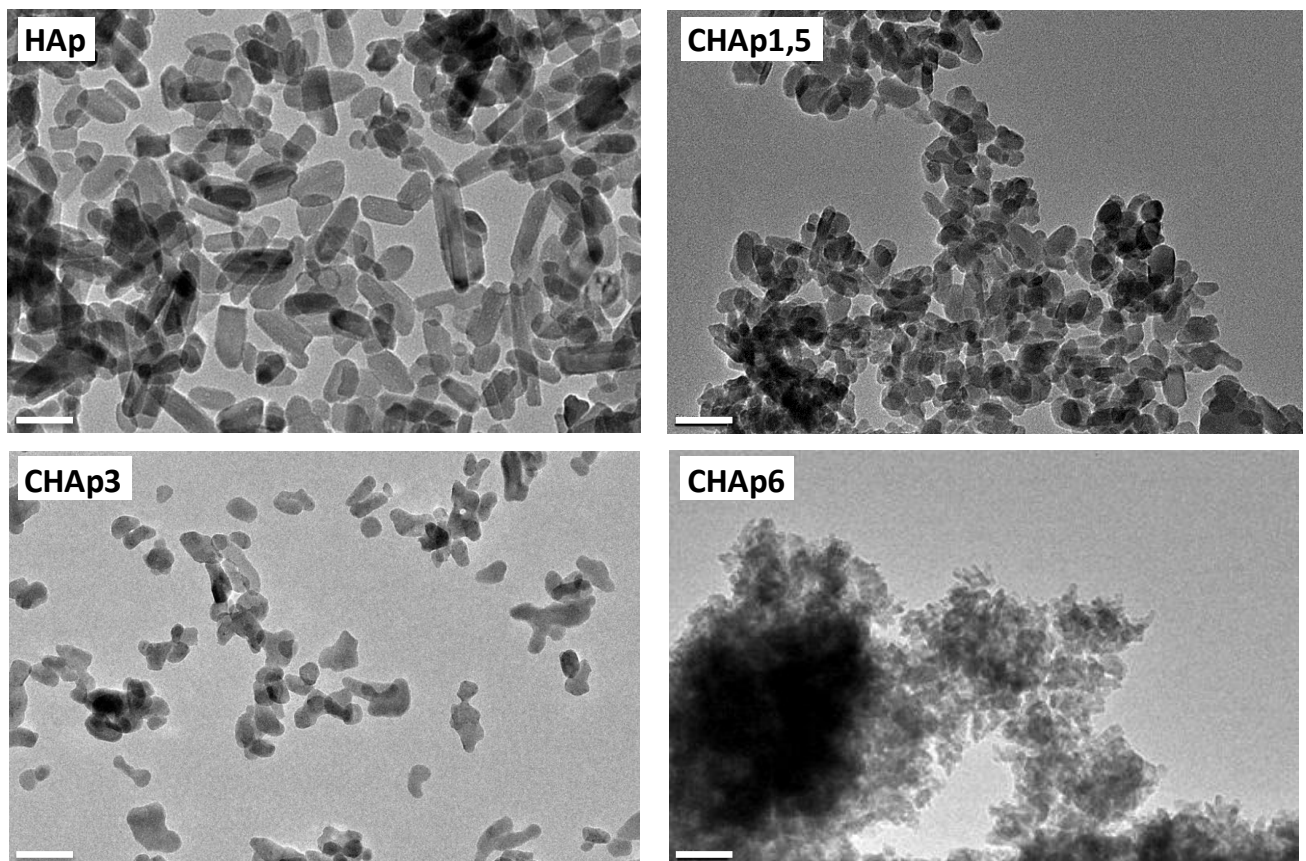


Figure 9: Influence du taux de substitution en carbonate sur la morphologie des particules d'apatite
Clichés de MET de HAp (longueur ~ 60-100 nm, largeur ~ 30 nm), CHAp1,5 (longueur ~ 40 nm, largeur ~ 30 nm), CHAp3 (longueur ~ 30 nm, largeur ~ 20 nm), CHAp6 (longueur ~ 10 nm, largeur ~ 10 nm). Barre d'échelle = 50 nm

2.4 Spectroscopie Infrarouge

Comme déjà mentionné, la spectroscopie Infrarouge est la technique de choix utilisée dans la littérature pour identifier les différents types de substitution des ions carbonates dans la structure apatitique. Les spectres IR des apatites obtenues selon la méthode de neutralisation (HAp et CHAp) (Fig. 10) ont donc été enregistrés dans le domaine $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$.

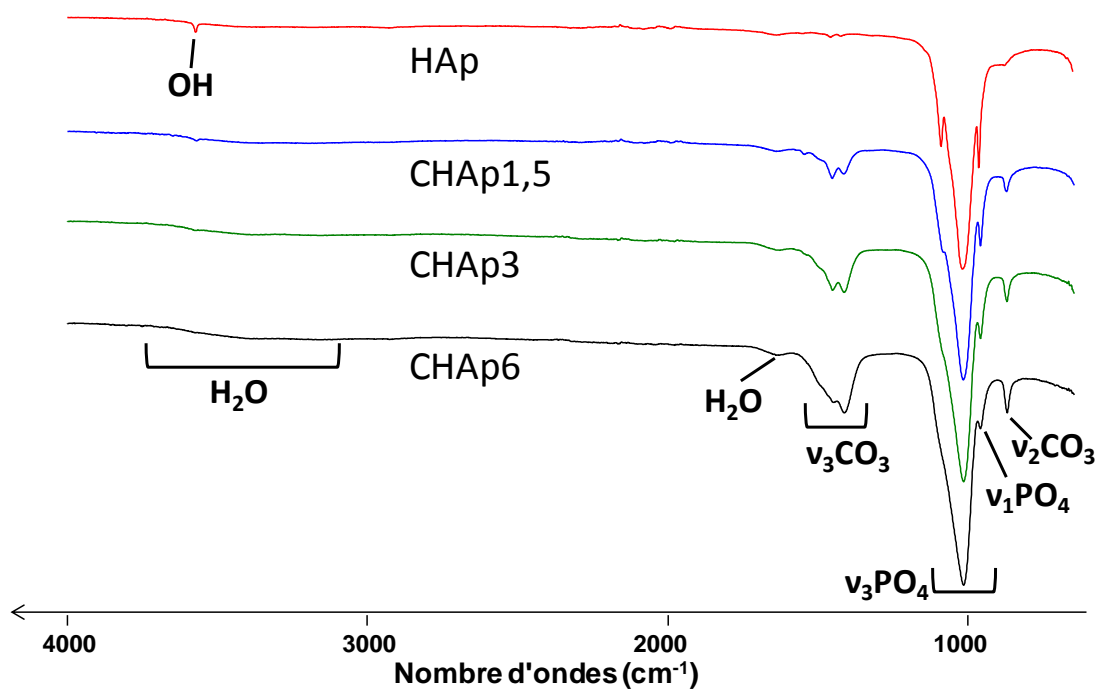


Figure 10: Spectres infrarouge des échantillons d'apatites carbonatées ou non (HAp et CHAp) synthétisées par la méthode de neutralisation

Sur le spectre de l'apatite HAp, les bandes dans le domaine $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ correspondent au mode $\nu_3\text{PO}_4$ (élongation antisymétrique). La bande à 960 cm^{-1} (élongation symétrique) est attribuée à $\nu_1\text{PO}_4$. L'absence d'une bande d'adsorption large dans le domaine $3700 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ montre l'absence d'eau adsorbée à la surface des particules d'apatite. L'élongation symétrique des groupes OH^- apparaît par une bande fine à 3570 cm^{-1} .

Les bandes dans les domaines $1600 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_3\text{CO}_3$) et $900 - 850 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_2\text{CO}_3$) reflètent clairement une carbonatation des apatites, CHAp1,5, CHAp3 et CHAp6. La comparaison des intensités de ces bandes après normalisation des spectres, montre bien que le taux de carbonate inséré dans la structure apatitique augmente, de l'échantillon CHAp1,5 à CHAp3, puis CHAp6, et ceci confirme les résultats de l'analyse élémentaire. La résolution des bandes correspondant au mode $\nu_3\text{PO}_4$ ($1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$) diminue avec le taux de carbonatation. Ceci laisse supposer que l'incorporation de carbonates dans la structure apatitique entraîne une diminution de la cristallinité (Nawrot, 1976). De plus, l'intensité de la bande de vibration à 3570 cm^{-1} (OH) diminue lorsque le taux de carbonate augmente. Ce phénomène déjà mentionné dans la littérature (Vignoles, 1988) est lié aux mécanismes de substitution par les ions carbonates que nous allons détailler dans le paragraphe suivant.

Pour identifier le type de substitution par les ions carbonates, les modes ν_3 et ν_2 des groupements carbonates (CO_3) sont utilisés comme cela a déjà été introduit en 3.2 (Tab. 2). A partir des fréquences des bandes d'absorption, la nature des différentes substitutions (Type A,

B et AB) a été identifiée sur la figure 10. Toutes les bandes d'absorption sont présentes dans tous les échantillons, y compris pour l'échantillon HAp, qui présente néanmoins un taux de carbone trop faible pour être détecté par analyse élémentaire (%C < 0,3). Ceci montre que l'IR est une méthode de caractérisation plus sensible que l'analyse élémentaire dans ce cas.

Intéressés par l'importance relative de ces substitutions, nous avons comparé les intensités des bandes d'absorption des carbonates en normalisant tous les spectres par rapport au mode de vibration $\nu_3\text{PO}_4$ (Fig. 11). En s'inspirant des travaux de Fleet *et al.* (Fleet, 2009), nous avons quantifié la proportion de chaque type de carbonate impliqué dans les divers types de substitution A et B par des distributions de type Gaussien dans la région du mode $\nu_2\text{CO}_3$ en utilisant une bande à 879 cm^{-1} pour le type A et une bande à 873 cm^{-1} pour le type B. Nous avons résumé les résultats de ces simulations dans le tableau 8.

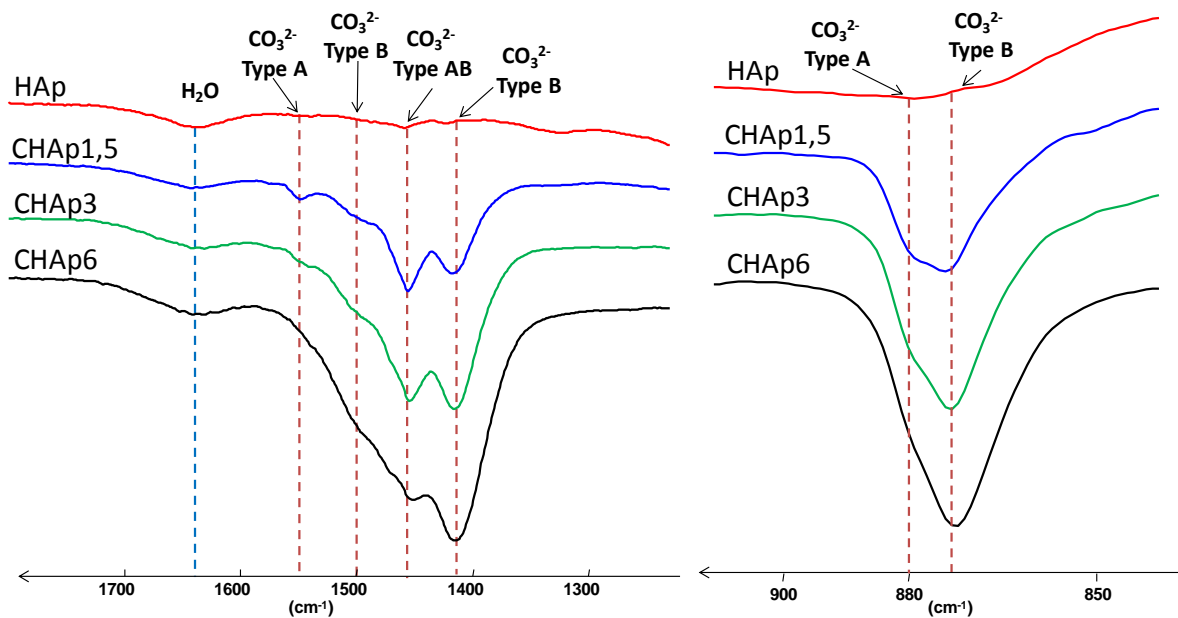


Figure 11: Spectres IR des apatites dans les domaines entre 1700 et 1300 cm^{-1} ($\nu_3\text{CO}_3$) et entre 900 et 850 cm^{-1} ($\nu_2\text{CO}_3$)

	% Type A (Bande à 879 cm^{-1})	CO_3^{2-} (%mass)	% Type B (Bande à 873 cm^{-1})	CO_3^{2-} (%mass)
CHAp1,5	37%	1,3	63%	2,3
CHAp3	15%	0,8	85%	4,5
CHAp6	5%	0,4	95%	7,7

Tableau 8 : Proportions de chaque type de substitution (A & B) obtenue par déconvolution de la bande $\nu_2\text{CO}_3$ dans les apatites synthétisées par méthode de neutralisation et pourcentages massiques de chaque type de substitution déduits à partir des résultats d'analyse élémentaire.

Nous voyons que les deux types de substitution A et B coexistent en proportions variables dans les apatites carbonatées. Le pourcentage de substitution de type B augmente

avec le taux de carbonate, et il est lié à la diminution des ions carbonates et hydroxydes dans les sites A. Ceci avait déjà été observé par Leeuwenburgh *et al.* (Leeuwenburgh, 2004). Ceci peut être expliqué par la position du site A dans la structure apatitique (Vignoles, 1988) qui se trouve dans un des deux tunnels formés par les ions phosphates, tunnels facilement accessibles pour les ions carbonates. Une fois les sites A majoritairement remplis, les carbonates commencent à occuper les sites B (les sites des ions phosphates) qui forment le squelette de la structure apatitique. Ceci induit un réarrangement structural, les tunnels se déforment, les sites A deviennent moins stables. De plus, il faut rappeler que dans le milieu réactionnel, il existe une compétition permanente entre les ions hydroxydes et les ions carbonates pour occuper les sites A, ce qui rend la proportion de ces deux ions dans les sites A dépendant des paramètres de synthèse (Vignoles, 1984).

2.5 Spectroscopie RMN

Afin de caractériser à l'échelle atomique les modifications structurales amenées par la substitution par les carbonates, nous avons utilisé la spectroscopie RMN des noyaux ^1H et ^{31}P . Rappelons que la maille de l'hydroxyapatite comprend un seul site phosphate et un seul site hydroxyde, ce qui doit rendre la lecture des spectres RMN particulièrement aisée.

a) RMN ^{31}P

Nous avons d'abord étudié l'environnement des sites ^{31}P par RMN MAS découplé du ^1H (Fig. 12). Les spectres RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ MAS montrent un seul signal centré sur 2,8-2,9 ppm, valeur de déplacement chimique caractéristique de l'hydroxyapatite. La faible largeur à mi-hauteur (FWHM = 51 Hz) du signal correspondant à HAp est caractéristique d'un très bon ordre local en cohérence avec un fort taux de cristallinité de l'échantillon. En comparant les spectres des apatites, nous pouvons remarquer que le signal des apatites carbonatées s'élargit avec le taux de carbonate. Ceci semble indiquer une distribution d'environnement chimique de plus en plus importante pour les sites de phosphates. Nous observons aussi que le déplacement chimique devient de plus en plus déblindé avec le taux de carbonatation, ce qui a déjà été reporté dans la littérature (Aue, 1984). Une analyse plus fine de ces spectres va être détaillée par la suite.

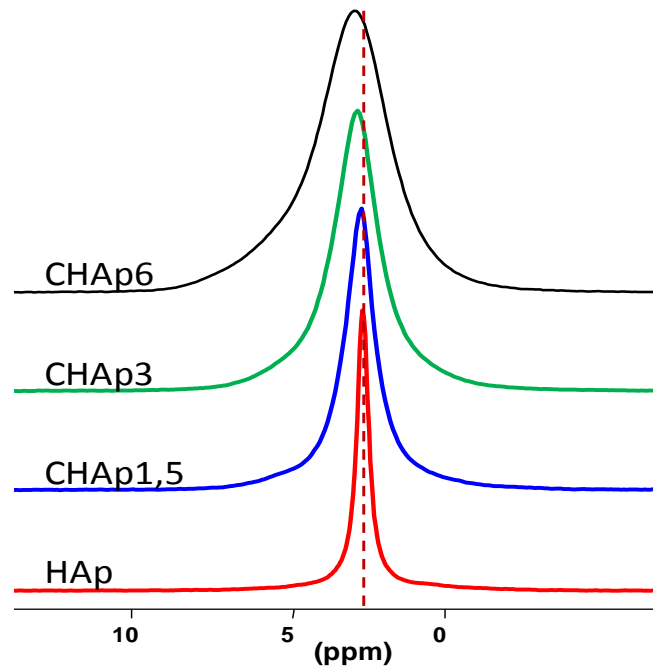


Figure 12: Spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ MAS des apatites HAp, CHAp1,5, CHAp3 et CHAp6 ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\gamma_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$; $d1 = 60 \text{ s}$)

b) RMN ^1H

Les spectres RMN ^1H MAS des différents échantillons sont présentés sur la figure 13. Tous les spectres sont composés principalement d'un signal à 0 ppm correspondant aux groupes hydroxydes et un signal à 5 ppm attribué à la présence d'eau. Nous avons vu précédemment que, dans une maille d'hydroxyapatite, les groupes hydroxydes s'alignent le long de tunnels formés par les phosphates. Ainsi, les oxygènes sont trop loin d'autres oxygènes adjacents ($\sim 3,44 \text{ \AA}$) pour a priori former de fortes liaisons hydrogène $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$. Ceci explique l'observation du signal des groupes hydroxydes à 0 ppm (Griffin, 1990).

La largeur à mi-hauteur de ce signal augmente ($143 \text{ Hz} \rightarrow 342 \text{ Hz}$) avec le taux de carbonates (Tab. 9), ce qui indique une augmentation de la distribution de déplacements chimiques. Ceci est une preuve indirecte de l'insertion des ions carbonates dans la structure apatitique, ce qui induit une variation d'environnement chimique autour des sites hydroxydes.

Le signal à 5 ppm attribué à de l'eau est présent dans tous les échantillons. Son intensité par rapport à celui des hydroxydes augmente avec le taux de carbonate. Si l'eau observée ici est physisorbée, ce comportement est tout à fait cohérent, étant donné la diminution de la taille des particules et donc l'augmentation de la surface exposée, avec le

taux de carbonations. Les signaux à 3,3 ppm et 1,8 ppm observés dans certains échantillons sont dus à la présence d'éthanol résiduel utilisé pour le lavage des rotors.

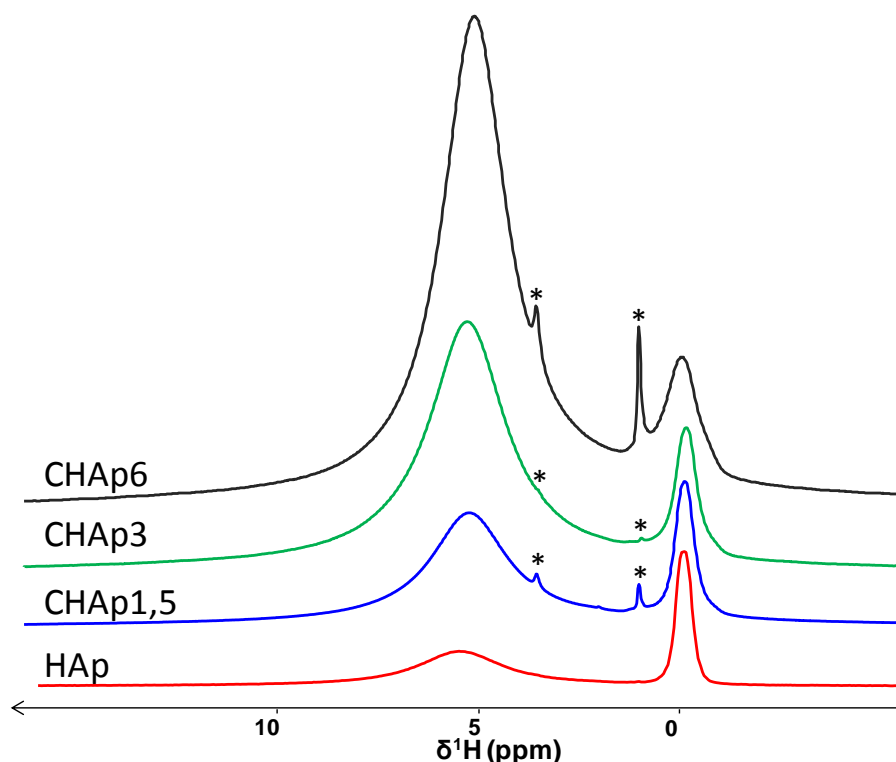


Figure 13 : Spectres RMN ^1H MAS des apatites HAp, CHAp1,5, CHAp3 et CHAp6, ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\gamma_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$).
* : pollution par de l'éthanol.

Echantillon	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	FWHM (Hz)
HAp	5,1	0	143
CHAp1,5	5,0	-0,3	170
CHAp3	5,1	-0,3	174
CHAp6	4,9	-0,3	342

Tableau 9 : Déplacements chimiques et largeur à mi-hauteur des signaux dus aux hydroxyles ($\sim 0 \text{ ppm}$) et à l'eau ($\sim 5 \text{ ppm}$)

c) Expériences d'HETCOR ^1H - ^{31}P

Pour essayer de mieux caractériser l'environnement des sites phosphates dans les apatites carbonatées, nous avons réalisé des expériences de corrélation hétéronucléaire (HETCOR) ^1H - ^{31}P (Fig. 14).

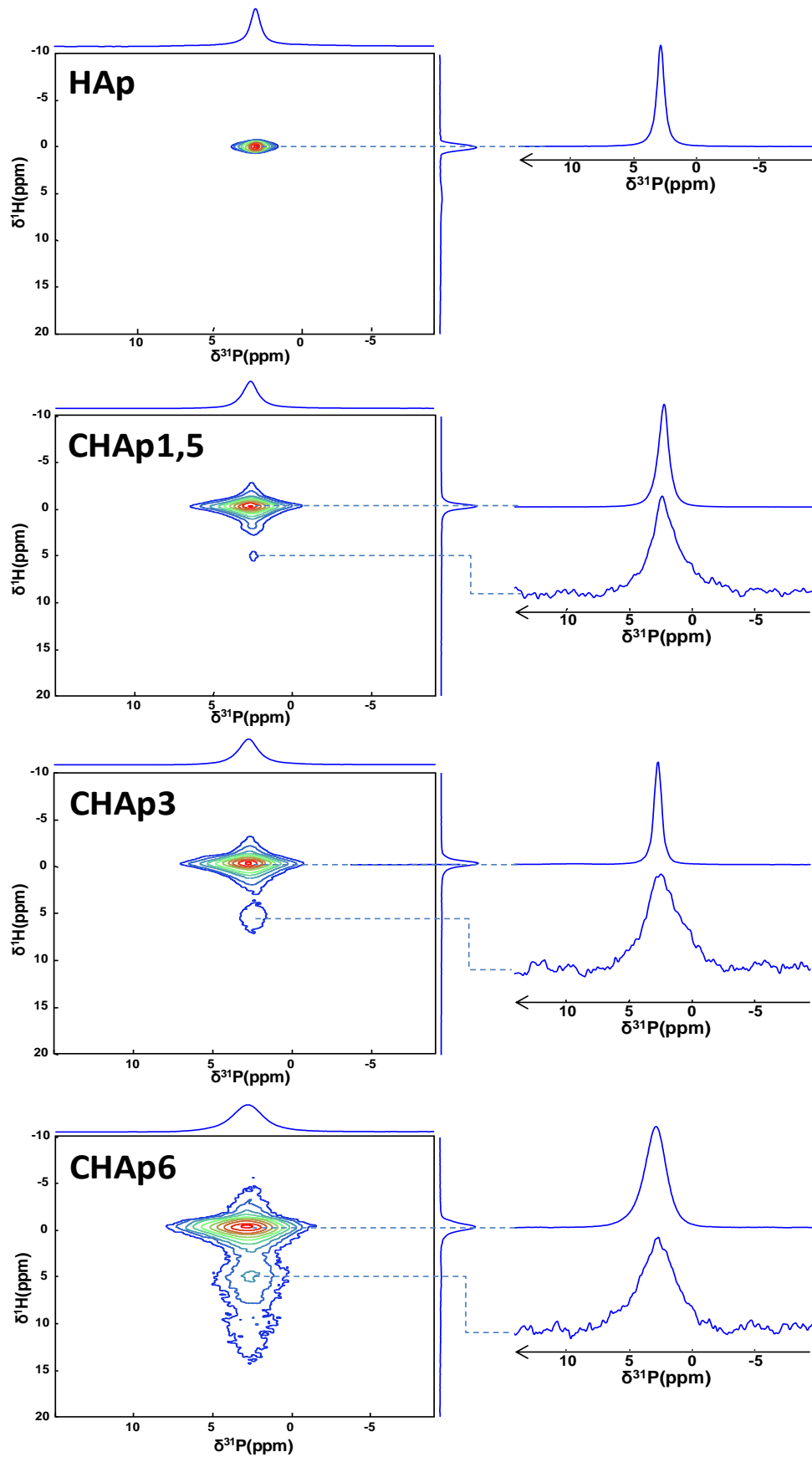


Figure 14 : Cartes ^1H - ^{31}P HETCOR des apatites HAp, CHAp1,5, CHAp3 et CHAp6 ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\gamma_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp}} = 10 \text{ ms}$)

Tous les spectres présentent une tâche de corrélation intense à $\delta_{31P} \sim 3$ ppm et $\delta_{1H} = 0$ ppm caractéristique des sites phosphates de l'hydroxyapatite qui corrèle avec le groupement OH. Une autre tâche de corrélation plus large ($\delta_{1H} = 5$ ppm) présente dans les échantillons carbonatés, correspond à la proximité entre des ions phosphates et des protons de l'eau (Kaflak, 2003). L'apatite carbonatée CHAp6 est le seul échantillon dont le spectre HETCOR $^1H-^{31}P$ présente une longue trainée jusqu'à $\delta_{1H} = 15$ ppm, valeur généralement attribuée à des hydrogénophosphates (HPO_4^{3-}) dans une phase amorphe (Jäger, 2006). Ces résultats laissent supposer que la substitution par les ions carbonates induit la formation d'une phase amorphe hydratée à la surface des nanoparticules qui s'enrichit en hydrogénophosphates à plus fort taux de carbonate.

A l'aide des tranches extraites des spectres $^1H-^{31}P$ HETCOR, nous avons pu extraire les déplacements chimiques et les largeurs de raie correspondant à chaque type de phosphate (Tab. 10). On constate que la distribution d'environnement des phosphates dans la phase d'apatite augmente avec le taux de carbonate (Aue, 1984), en accord avec une substitution des ions carbonates dans la structure apatitique. Le même comportement est observé pour les sites phosphates de la phase amorphe hydratée, suggérant la possible présence de carbonates également dans cette phase.

Echantillons	$\delta^{31}P$ (ppm) phase d'apatite	FWHM (Hz)	$\delta^{31}P$ (ppm) phase amorphe	FWHM (Hz)
HAp	2,9	81	-	-
CHAp1,5	2,8	113	2,9	280
CHAp3	2,8	116	3,1	330
CHAp6	2,9	210	3,0	366

Tableau 10 : Déplacements chimiques et largeurs à mi-hauteur des spectres ^{31}P correspondant à la phase d'apatite et à la phase amorphe hydratée extraits des cartes RMN $^1H-^{31}P$ HETCOR

A l'aide de ces données, nous avons quantifié les deux phases (la phase d'hydroxyapatite et la phase amorphe) présentes dans chaque échantillon en déconvoluant les spectres $^{31}P\{^1H\}$ en deux composantes (Fig. 12). Les résultats sont montrés sur la figure 15. Avec l'augmentation du taux de carbonate, la quantité relative de phosphates dans la phase amorphe augmente, par rapport à la quantité dans la phase cristalline d'hydroxyapatite, ce qui traduit directement une augmentation de la teneur en phase amorphe dans l'échantillon.

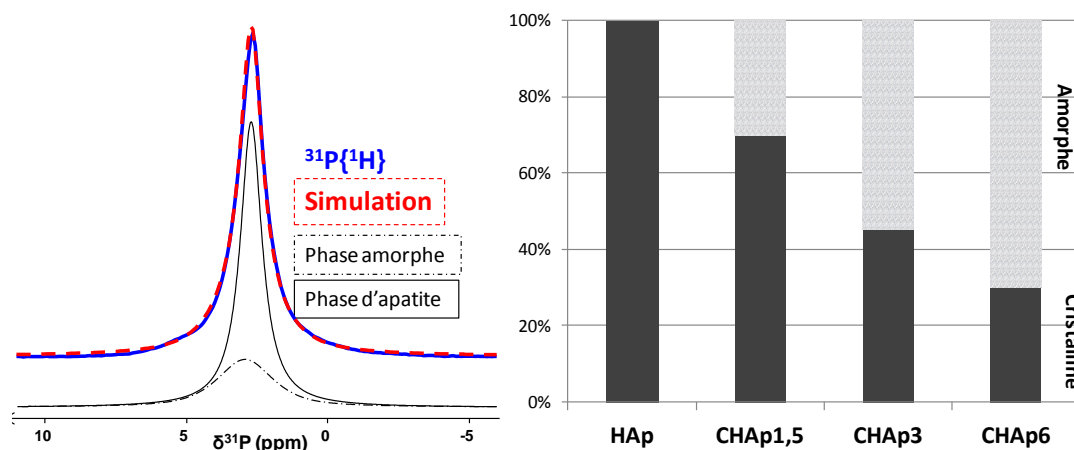


Figure 15: Déconvolution du spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de l'apatite carbonatée CHAp1,5 et résultats de la quantification des phosphates dans les différentes phases.

Dans la littérature, la présence d'une phase amorphe a été proposée pour des apatites synthétiques et biologiques à la suite d'études spectroscopiques, soit par RMN du solide (Roufosse, 1984) et soit par IR (Rey, 1989). Ces études confirment que cette phase amorphe forme une couche hydratée à la surface des nanoparticules d'apatite (Triffitt, 1968). En plus, son augmentation avec le taux de carbonatation est cohérente avec l'augmentation de la surface des particules due à la diminution de leur taille. Nous allons détailler l'étude de cette couche amorphe hydratée dans le chapitre IV.

d) RMN ^{13}C

Comme annoncé précédemment, la substitution par les ions carbonates peut être identifiée par RMN à l'état solide. Le Tableau 11 résume les déplacements caractéristiques des groupements CO_3^{2-} pour les différents types de substitution A, B et A/B au sein d'apatites carbonatées synthétiques de différentes natures (Griffin, 1990 ; Sfihi, 2002 & Babonneau, 2007). Il apparaît qu'un seul signal correspond à la substitution de type A alors que plusieurs signaux compris entre 168,0 et 170,6 sont susceptibles d'être spécifiques de substitutions de type B.

Type de substitution par les ions carbonates	Déplacement δ (ppm)	Référence bibliographique
Type A	166,5* α	*Griffin 1990
Type B	168,0 α / 169,7 α * / 170,2* / 170,6 α	α Babonneau 2007
Type AB	168,2* / 166,5* α _(Type A) / 170,2* _(Type B)	
CO_3^{2-} amorphe	169,5*	

Tableau 11 : Déplacements chimiques caractéristiques des ions carbonates dans des apatites carbonatées

Un échantillon de CHAp3 enrichi en ^{13}C a été préparé en remplaçant NaHCO_3 par $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ afin de permettre une acquisition en un temps raisonnable d'un spectre RMN ^{13}C (Fig. 16). La séquence de polarisation croisée (CP) a été utilisée afin d'améliorer le rapport signal/bruit. Cette séquence consiste à transférer l'aimantation du noyau abondant, ici ^1H , vers le noyau moins abondant ^{13}C . Ici, le transfert s'effectue donc à partir des spins ^1H des hydroxydes que l'on peut supposer réparti de manière homogène dans l'échantillon, et ainsi permettre la détection de tous les carbones présents.

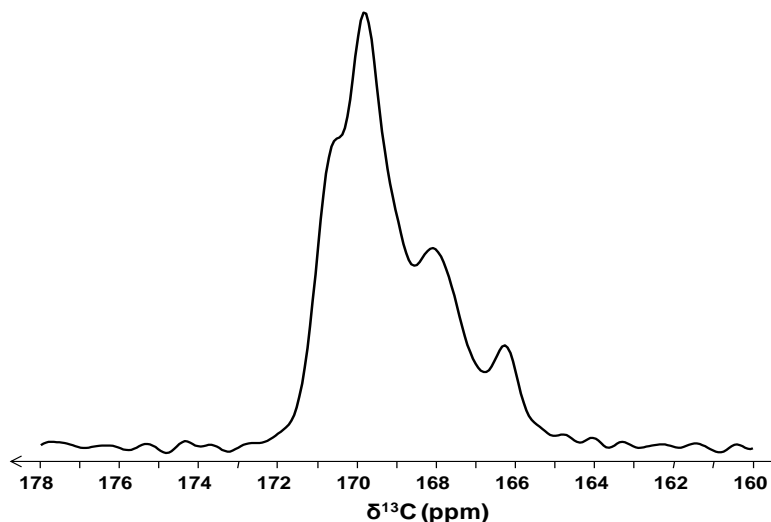


Figure 16: Spectre RMN ^{13}C CP MAS de l'apatite CHAp3 enrichi en ^{13}C ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 5 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp}} = 10 \text{ ms}$)

Le spectre met en évidence quatre signaux à 166,3 ppm, 168,2 ppm, 169,8 ppm et 170,4 ppm, avec des valeurs de déplacement chimique correspondant à des sites carbonates. A partir du tableau 11, on peut suggérer l'attribution suivante :

166,3 ppm \rightarrow Type A ; 168,2 ppm \rightarrow Type AB ; 169,8 ppm et 170,4 ppm \rightarrow Type B

Ceci confirme donc la présence de substitutions de type A, B et AB dans l'apatite CHAp3, comme observé par IR. Comme ce spectre enregistré avec la séquence de polarisation croisée n'est pas directement quantitatif, nous n'avons pas cherché à quantifier les carbonates dans les différents sites de substitution.

Il est important de remarquer que cette analyse a considéré que les carbonates détectés n'étaient que dans la phase d'apatite, et non dans la phase amorphe. Or l'augmentation avec le taux de carbonatation de la largeur de raie ^{31}P correspondant à la phase amorphe nous a laissé suggérer dans le paragraphe précédent la possible présence de carbonates dans la phase amorphe hydratée. Une étude par RMN HETCOR ^1H - ^{13}C publiée

dans la littérature (Babonneau, 2007) sur un échantillon analogue à CHAp3 montre uniquement des corrélations entre carbonates et hydroxydes, ce qui semble démontrer que tous les carbonates sont dans la phase d'apatite.

3. Conclusion

Dans cette étude sur des apatites substituées synthétisées par la méthode de neutralisation, nous avons caractérisé par différentes techniques, l'influence de la présence d'ions carbonates sur la structure et la morphologie de particules d'hydroxyapatites. La diffraction des rayons X a confirmé l'obtention d'une seule phase cristallisée d'hydroxyapatite dans les différents échantillons. L'augmentation du taux de carbonate conduit à l'obtention de nanoparticules de plus petite taille et de morphologie moins anisotrope, confirmant un rôle d'inhibiteur de croissance des carbonates déjà reporté dans la littérature.

L'étude par IR, complétée par une étude par RMN ^{13}C , a mis en évidence la présence de substitution de type A, B et AB. Les proportions relatives d'ions carbonates de type A et de type B ont été déterminés, ce qui a confirmé que la substitution de type A n'est favorisée que dans l'apatite faiblement carbonatée (Nelson, 1982 ; Feki, 1991 & Vignoles, 1988). L'incorporation de carbonates dans la structure apatitique se traduit par des modifications structurales à plusieurs échelles, diminution de la taille des domaines de cohérence vus par DRX et augmentation du désordre local autour des ions phosphates vu par RMN ^{31}P . Mais cette dernière étude a surtout permis la mise en évidence d'une phase amorphe hydratée, dont la quantité augmente avec le taux de carbonatation.

III. Etude d'apatites « biomimétiques »

Nous avons comparé dans cette deuxième partie expérimentale, diverses apatites synthétiques avec une apatite biologique issue d'un tissu osseux, afin de mieux caractériser cette dernière.

1. Présentation des échantillons

Pour faciliter cette comparaison, nous les avons regroupées en quatre familles selon leur provenance (Toutes les synthèses sont décrites dans la partie « Matériels et Méthodes ») :

- **Apatites synthétisées par la méthode de neutralisation** (Osaka, 1991). Nous venons de présenter l'étude réalisée sur ces échantillons. Nous avons utilisé HAp comme référence pour une hydroxyapatite non carbonatée. Et parmi les trois taux de carbonate étudiés, nous avons utilisé CHAp3 que nous noterons dorénavant CHApN, car son taux de carbonate est comparable avec l'échantillon obtenu par la méthode de diffusion.

- **Apatites synthétisées par la méthode de diffusion** (Nassif, 2010). Cette méthode basée sur un procédé de diffusion d'ammoniac conduit à des particules sous forme de plaquettes. Nous les noterons CHApD.

- **Apatite obtenue à partir de SBF**. Elle a été obtenue par un procédé de congélation/décongélation d'une solution de SBF 1,5 (pH = 7,4). La solution « SBF 1,5 » contient des sels et est tamponnée par le trishydroxyméthylaminométhane. Les particules d'apatite obtenues selon cette méthode ont également une forme plaquettaire. Nous la noterons CHApSBF.

- **Bioapatite** : elle provient d'un tissu osseux, à savoir dans notre cas, un os de brebis âgée de deux ans. Cet échantillon d'os nous sert de référence biologique.

L'étude de la phase minérale de l'os est difficile, complexe, notamment à cause de la présence de la phase organique (collagène) et des cellules (lipides). Il est nécessaire pour certaines études d'isoler cette phase ou de minimiser les signaux de la phase organique. Mais un moindre traitement de l'échantillon induit des artefacts chimiques et physiques inévitables. Nous avons choisi de n'utiliser que des traitements physiques afin de préserver au maximum la nature de la phase minérale. Par exemple, pour les études par IR, MET et DRX, des traitements physiques (séchage et broyage) ont été réalisés sur la bioapatite, tout en reconnaissant que la déshydratation peut modifier la cristallinité, la surface et la composition chimique des cristaux d'apatite. Il existe également d'autres méthodes comme le Diffraction

des rayons X aux petits angles et la RMN à l'état solide pour lesquelles la caractérisation ne nécessite aucun traitement. Néanmoins, afin que les échantillons soient vraiment comparables, l'échantillon d'os a subi un traitement de lavage à CHCl_3 (élimination de la phase de lipide), de déshydratation (séchage sous hotte) et de broyage.

La dénomination des échantillons secs et leurs méthodes de synthèse sont résumées dans le tableau 12 :

Nom	Méthode ou traitement	Composition des précurseurs
Bioapatite	Lavage (CHCl_3); Séchage	Os de brebis
HAp stœchiométrique	Méthode de neutralisation	$10 \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 6 (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
HAp carbonatée (CHApN)	Méthode de neutralisation	$10 \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 6 (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + 3 \text{NaHCO}_3$
HAp carbonatée (CHApD)	Méthode de diffusion	$10 \text{CaCl}_2 + 3 \text{NaH}_2\text{PO}_4 + 3 \text{NaHCO}_3$
CHApSBF	Congélation/Décongélation de la solution SBF 1,5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaHCO_3 , NaCl , KCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4

Tableau 12 : Résumé des échantillons d'apatites étudiés

2. Comparaison de la composition des apatites

Nous nous sommes d'abord intéressés à la composition chimique et aux substitutions présentes dans ces échantillons (Tab. 13). Les résultats ont été obtenus par analyse élémentaire. Puisque la composition chimique des bioapatites est variable d'un individu à un autre, nous avons pris comme référence des valeurs expérimentales sur un échantillon de bioapatite caractérisée par Elliott (Elliott, 1994). Cette bioapatite est faiblement déficitaire en calcium, avec un rapport $\text{Ca/P} \sim 1,64$, ce qui démontre la maturité avancée de cet échantillon. Les échantillons de synthèse d'apatite carbonatée CHApSBF, CHApD sont également déficients en calcium ($\text{Ca/P} \sim 1,56$ et $1,64$ respectivement), et leurs taux en carbonate sont du même ordre de grandeur que celui de la bioapatite.

	Ca/P/C (rapport molaire)	C (%mass)	Na (%mass)
Bioapatite*	10/6,1/0,1	0,4	1,0
CHApSBF	10/6,4/0,1	0,5	1,52
CHApD	10/6,1/0,8	0,87	0,52
CHApN	10/6,0/1,0	1,04	0,33
HAp	10/6,3	< 0,3	< 0,15

Tableau 13 : Résultats des analyses élémentaires des échantillons apatitiques (* résultat extrait de Elliott, 1994)

Dans tous les échantillons, des ions sodium sont présents qui jouent sans doute un rôle important pour les compensations de charge dans la structure apatitique substituée. La quantité de sodium dans les échantillons de bioapatite et CHApSBF est plus importante que dans les autres échantillons. Ceci doit être lié à la composition du milieu *in vivo* pour la bioapatite et du milieu de synthèse pour CHApSBF. En effet, la présence de divers ions (K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , etc) pendant la formation de la bioapatite et de l'apatite CHApSBF influence certainement la composition chimique et la structure cristalline finales des échantillons.

3. Comparaison structurale à diverses échelles

3.1. Caractérisation microstructurale

a) Microscopie électronique à transmission

Nous avons tout d'abord comparé la morphologie des nanoparticules d'apatite par MET (Fig. 17). Les échantillons de bioapatite, CHApSBF et CHApD se présentent tous sous forme de plaquettes, avec une morphologie donc très différente de celle en bâtonnets observée précédemment sur les apatites préparées par la méthode de neutralisation, CHApN. Les plaquettes de bioapatite ont des longueur/largeur d'environ 50 nm et une épaisseur d'environ 2 - 4 nm. Cette taille est cohérente avec l'observation de Weiner *et al.* (Weiner, 1998). La taille des particules dans CHApSBF est proche de celle observée dans la bioapatite. A plus grande échelle, nous observons que les plaquettes forment des agrégats sphérolitiques d'environ 0,6 μm de diamètre dont nous supposons qu'ils se forment par croissance radiale à partir d'un même point de nucléation. En fait, nous avons observé des sphérolites de tailles variables. Cette différence de taille est dépendante du temps de croissance de chaque sphérolite et/ou des ions présents autour de la structure en croissance.

L'apatite CHApD obtenue par la méthode de diffusion, présente beaucoup de similitude avec l'apatite CHApSBF, telle que la formation d'agrégats sphérolitiques. Mais la taille de ces plaquettes est plus importante, la longueur pouvant atteindre jusqu'à 200 nm et le diamètre des sphérolites 2 μm . Nassif *et al.* a montré que la direction (001) est la direction préférentielle de croissance correspondant à une orientation de l'intérieur vers l'extérieur des sphérolites (Nassif, 2010).

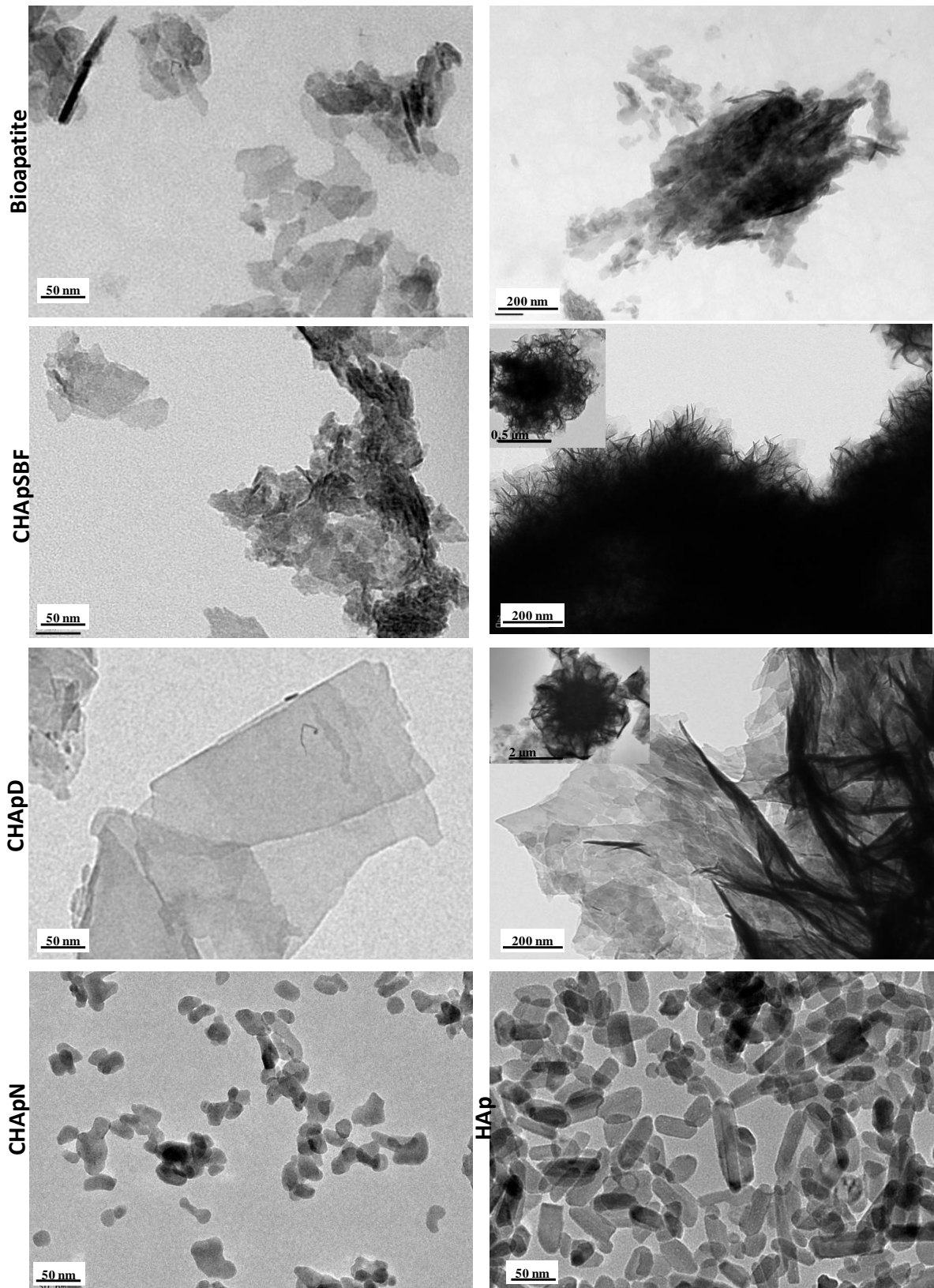


Figure 17: Clichés de MET des divers échantillons d'apatite (bioapatite, CHApSBF, CHApD, CHApN et HAp)

b) Diffraction des Rayons X

La caractérisation des phases cristallines dans ces différents échantillons a été effectuée par diffraction des rayons X (DRX) sur poudre (Fig. 18). Quelque soit la méthode de synthèse, aucune autre phase de phosphate de calcium exceptée l'hydroxyapatite n'a été identifiée.

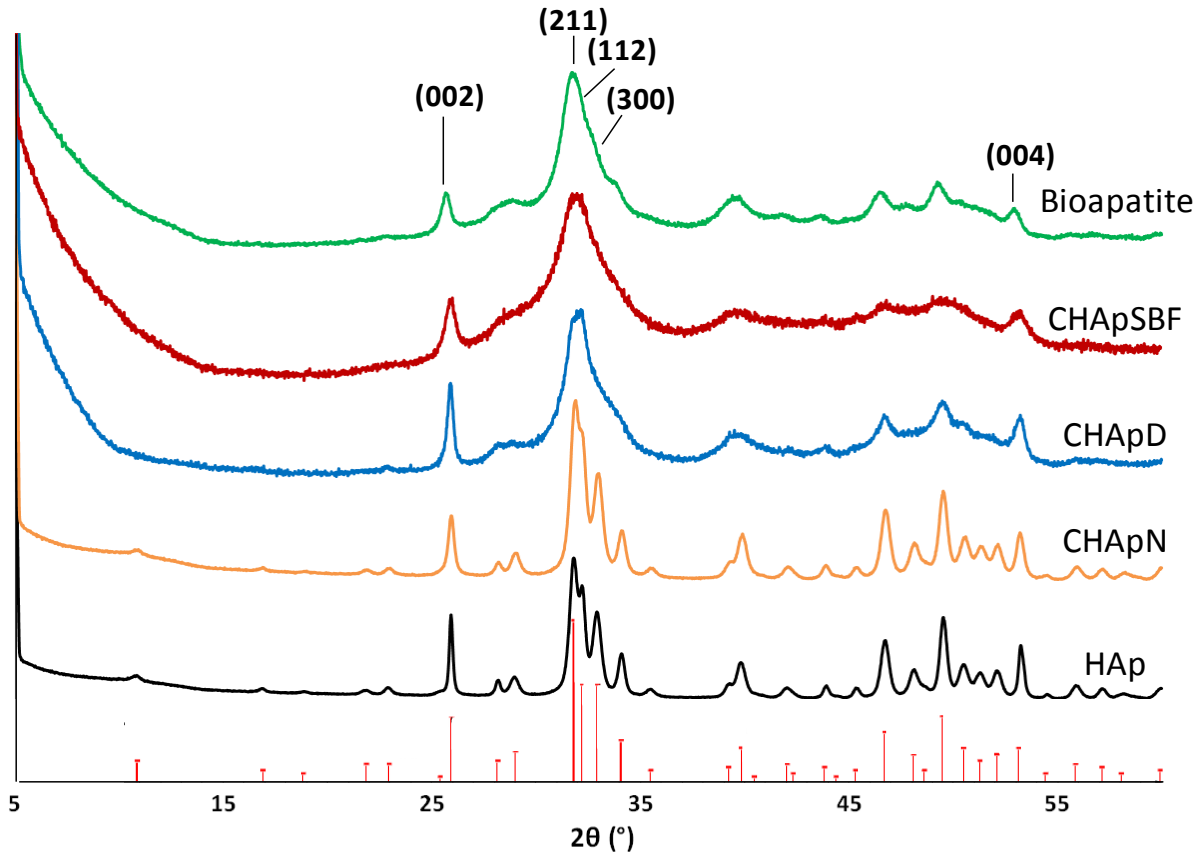


Figure 18: Diffractogrammes des divers échantillons d'apatite : Bioapatite, CHApSBF, CHApD, CHApN et HAp comparés à la fiche JCPDS 9-0432 correspondant à l'hydroxyapatite de structure hexagonale.

Par comparaison avec les échantillons HAp et CHApN étudiés précédemment, CHApSBF et CHApD possèdent des raies de diffraction plus larges ce qui ne permet plus de distinguer les raies de diffraction (211), (112), (300). Cet élargissement de raies est dû à la diminution de la taille des cristallites et/ou aux désordres cristallographiques induits par la substitution et/ou par les défauts d'organisation.

Dans l'échantillon CHApD, on peut cependant remarquer que l'élargissement des raies affecte moins celles de la famille 00l ($2\theta_{002} = 25,9^\circ$ et $2\theta_{004} = 53,1^\circ$). Cette caractéristique suggère un domaine de cohérence cristalline plus important selon l'axe c que

selon les autres directions. Ce résultat est en accord avec l'observation par MET d'une direction préférentielle de croissance plus prononcée dans cet échantillon.

Un affinement par méthode Rietveld a été réalisé sur des diffractogrammes enregistrés avec un rayonnement synchrotron par G. Renaudin, en collaboration avec J.-M. Nedelec de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, dans le cadre du projet ANR-Nanoshap. Les dimensions caractéristiques des cristallites de CHApD sont de ~22 nm le long de l'axe hexagonal (l'axe *c*) et ~6,5 nm dans le plan de base (les axes *a* et *b*), cohérentes avec une forme de bâtonnet. Ce résultat ne contredit pas forcément notre observation par MET qui montre les particules dans l'échantillon CHApD sous forme de plaquettes de plusieurs centaines de nm. En effet, une plaquette peut être composée de plusieurs domaines cristallins. Les cristallites sous forme de bâtonnet pourraient s'orienter les unes par rapport aux autres, côte à côte selon l'axe *a* ou *b*, afin de former une plaquette. Il est intéressant de noter que dans la structure hexagonale, les directions *h*00 et 0*k*0 sont strictement équivalentes, ce qui ne devrait pas favoriser la formation de particules sous forme de plaquette. L'obtention de ces plaquettes est probablement liée aux conditions de formation, même si elles sont actuellement difficiles à cerner (diffusion lente de vapeur d'ammoniac dans un système sans agitation, présence d'interfaces...).

A partir des résultats de MET et de DRX, il est remarquable de noter la très grande similarité de caractéristiques microstructurales (morphologique et cristallographique) entre CHApSBF et CHApD d'une part, et la bioapatite d'autre part, par comparaison avec celles de HAp et CHApN.

3.2. Caractérisation de l'ordre local des phosphates par RMN

Afin de continuer la comparaison structurale de ces divers échantillons d'apatite à une échelle plus locale, nous avons étudié leur réponse par RMN ^{13}P et ^1H .

Les spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ des différents échantillons sont tous composés d'un seul signal vers 3 ppm (Fig. 19). Il est intéressant de remarquer que de HAp à la bioapatite, le signal s'élargit et sa valeur de déplacement chimique est de plus en plus déblindée. Cette variation, déjà observée dans le cadre de l'étude précédente sur la série d'échantillons carbonatés (Fig. 12) est sans doute due à la substitution par les divers ions. On peut d'ailleurs remarquer que les signaux les plus larges sont ceux correspondant à CHApSBF et à la bioapatite, qui sont sans doute les plus substitués.

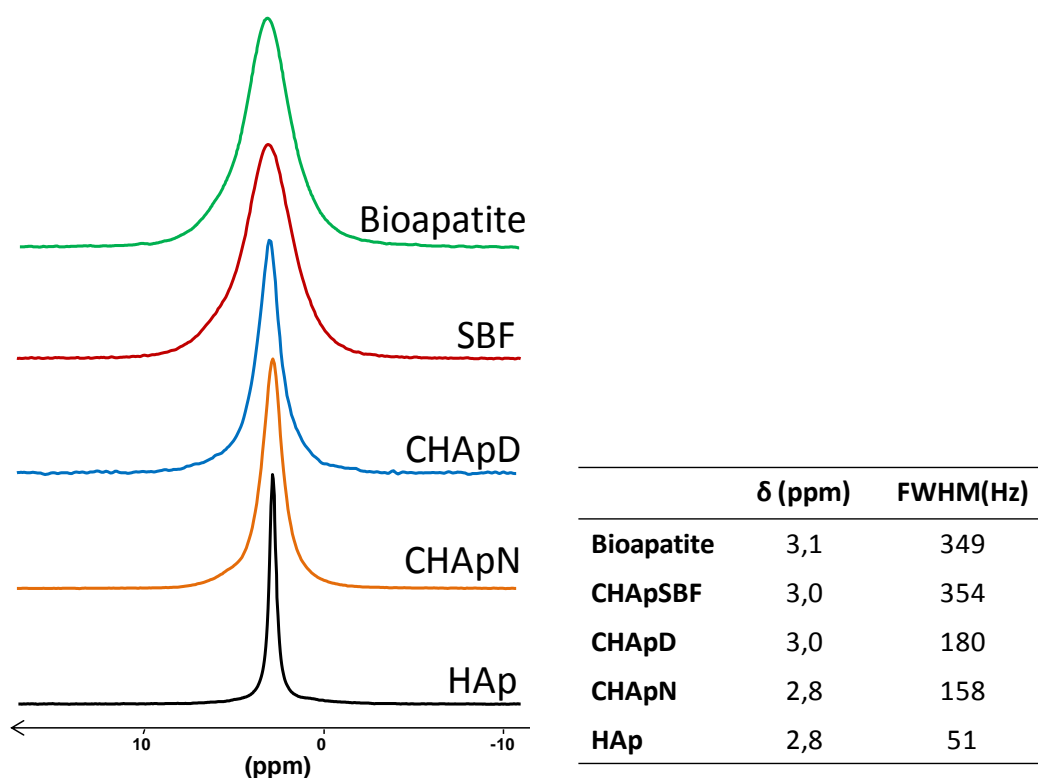


Figure 19: A gauche : Spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ des échantillons de bioapatite, CHApSBF, CHApD, CHApN et HAp ; ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$). A droite : Déplacement chimique et largeur à mi-hauteur des signaux correspondants

Pour poursuivre la caractérisation des échantillons, nous avons comparé leurs spectres RMN MAS ^1H (Fig. 20).

Un signal d'eau à 5,5 ppm est retrouvé dans tous les spectres des échantillons. Nous avons aussi observé le signal intense dû aux groupes hydroxydes de structure à 0 ppm sur les spectres des échantillons CHApD, CHApN et HAp (Fig. 20) (Yesinowski, 1987). En revanche, ce signal semble absent des spectres des échantillons de bioapatite et CHApSBF. Afin de déterminer si les ions hydroxydes sont réellement absents de la structure apatitique ou si leur signal ^1H est simplement masqué par le signal large de l'eau, une analyse plus approfondie par RMN HETCOR ^1H - ^{31}P est nécessaire qui va être décrite par la suite.

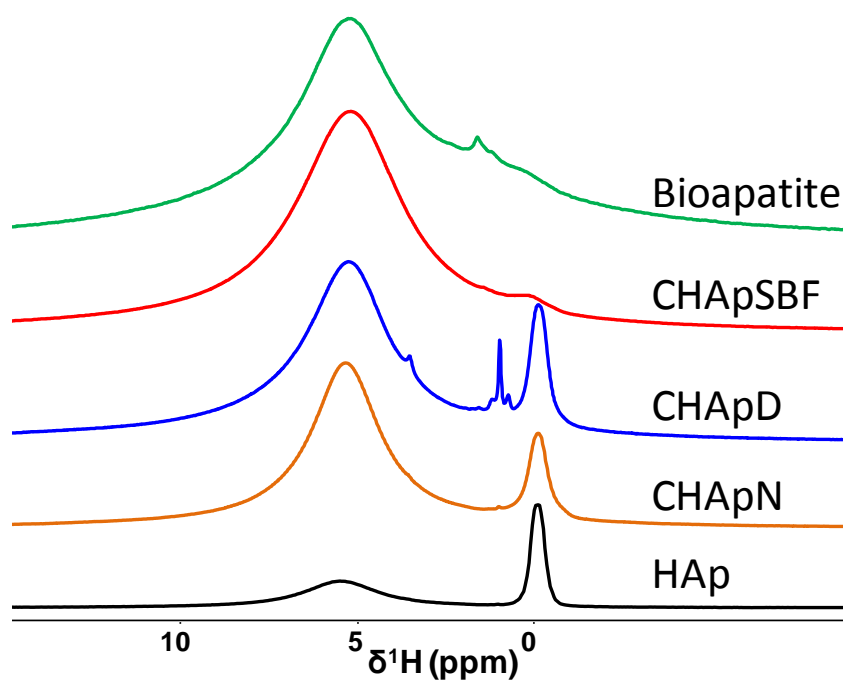


Figure 20 : Spectres RMN MAS ^1H des échantillons d'apatite: bioapatite, CHApSBF, CHApD, CHApN et HAp ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$)

Nous avons remarqué aussi des signaux entre 1 et 2,5 ppm sur le spectre de CHApD. Ces signaux sont souvent observés pour des apatites nanométriques synthétiques et biologiques. Leur origine est toujours inconnue : il est possible qu'il s'agisse d'eau de structure présente à la surface de particules, ou d'eau à proximité des protons du milieu (Jäger, 2006). Ces protons sont aussi considérés par certains auteurs (Mathew, 2011) comme des résidus de précurseurs organiques, ce qui n'est pas notre cas ici. Wilson et al. (Wilson, 2006) ont attribué ces signaux à des OH^- engagés dans une liaison hydrogène (1,4 ppm) et à de l'eau isolée présente dans les canaux où se trouvent les hydroxydes (2,2 ppm). Mais l'absence de corrélation entre ces protons et un quelconque signal ^{31}P , comme nous le verrons lors de l'étude par HETCOR ^1H - ^{31}P (Fig. 21), semble montrer que ces protons ne sont pas à proximité d'ions phosphates. Néanmoins il est possible que ces protons soient mobiles et non détectés par la technique de polarisation croisée.

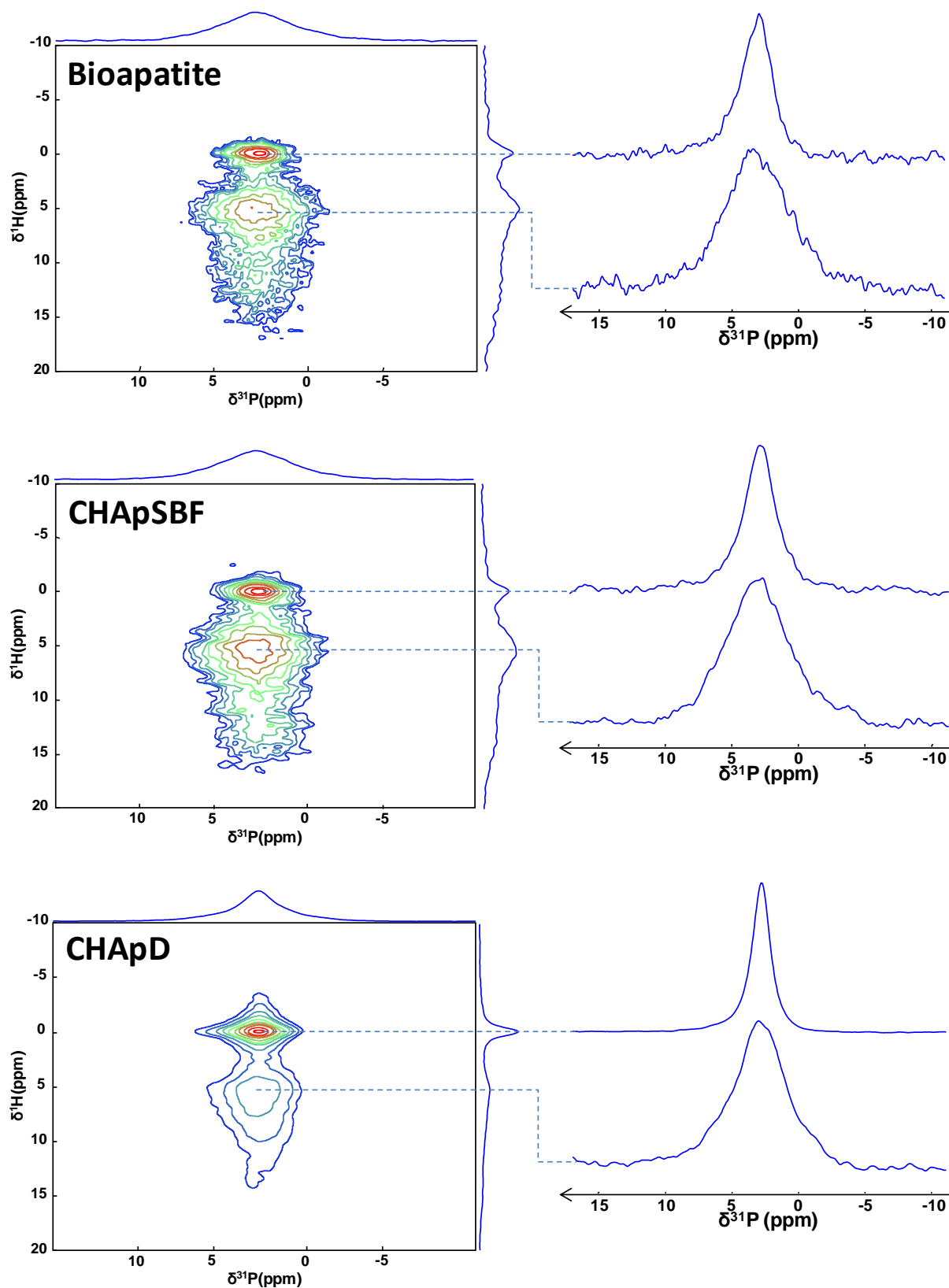


Figure 21 : Cartes HETCOR ^1H - ^{31}P des échantillons de Bioapatite, CHApSBF et CHApD ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $V_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp}} = 1 \text{ ms}$)

Comme précédemment lors de l'étude des échantillons préparés par la méthode de neutralisation, des expériences d'HETCOR ^1H - ^{31}P ont été réalisées pour mieux décrire les phases de phosphate de calcium présentes dans les échantillons (Fig. 21). Tous les spectres sont composés de deux types principaux d'environnement chimique pour les sites de phosphate. Une tâche de corrélation correspond aux phosphates de la structure apatitique, et une autre aux ions phosphates proches de protons de l'eau, et sans doute d'hydrogénophosphates compte tenu de la longue trainée de signal jusqu'à $\delta_{1\text{H}} = 15$ ppm, en particulier dans la bioapatite et CHApSBF.

En comparant les tranches extraites selon la dimension ^{31}P pour les valeurs $\delta_{1\text{H}} = 0$ ppm (phase d'apatite) et $\delta_{1\text{H}} = 5$ ppm (phase amorphe) (Tab. 14), nous avons remarqué que les deux phases sont plus distribuées dans les échantillons de bioapatite et CHApSBF que dans l'échantillon CHApD et surtout CHApN. Il faut noter aussi qu'une distribution de type « Gaussien » a été utilisée pour la simulation des tranches de corrélation correspondant à la phase amorphe, ce qui montre une distribution importante de sites ^{31}P dans cette phase.

Echantillon	$\delta^{31}\text{P}$ (ppm)	FWHM (Hz)	$\delta^{31}\text{P}$ (ppm)	FWHM (Hz)
	phase d'apatite		phase amorphe	
Bioapatite	3,0	300	3,1	660
CHApSBF	3,0	325	3,1	680
CHApD	2,9	140	3,0	430
CHApN	3,0	116	3,1	330

Tableau 14 : Déplacements chimiques et largeurs à mi-hauteur des tranches de corrélation extraites des cartes HETCOR ^1H - ^{31}P et correspondant à $\delta_{1\text{H}} = 0$ ppm (phase d'apatite) et 5 ppm (phase amorphe).

Nous avons noté que la distribution d'environnement des phosphates dans la phase d'apatite et la phase amorphe n'est pas seulement liée au taux de carbonate. En effet, les échantillons de bioapatite ($\%C_{\text{massique}} \sim 0,4$) et CHApSBF ($\%C_{\text{massique}} \sim 0,5$) qui possèdent un taux de carbonate moins important que celui des échantillons CHApD ($\%C_{\text{massique}} \sim 0,9$) et CHApN ($\%C_{\text{massique}} \sim 1,0$), présentent une distribution d'environnements chimiques des sites de phosphates plus importante. Ceci laisse supposer que les substitutions par les divers ions dans ces deux premiers échantillons auraient un rôle important sur l'environnement chimique des phosphates.

3.3 Caractérisation de la substitution par les ions carbonates

Comme déjà indiqué, l'ion carbonate est le troisième composant le plus important (2~8% en masse) de l'apatite osseuse après le calcium et le phosphate. Il est donc très important pour obtenir une apatite « biomimétique » de recréer dans l'apatite de synthèse le même type d'environnement en carbonate.

Nous avons identifié la nature de la substitution par les ions carbonates par IR. Nous avons retrouvé sur les spectres IR des divers échantillons (Fig. 22) les bandes caractéristiques des différents modes de vibration des ions carbonate et phosphate. A noter, dans les échantillons de bioapatite et CHApSBF, une présence importante d'eau ($3700-3000\text{ cm}^{-1}$), déjà observée sur les spectres RMN ^1H .

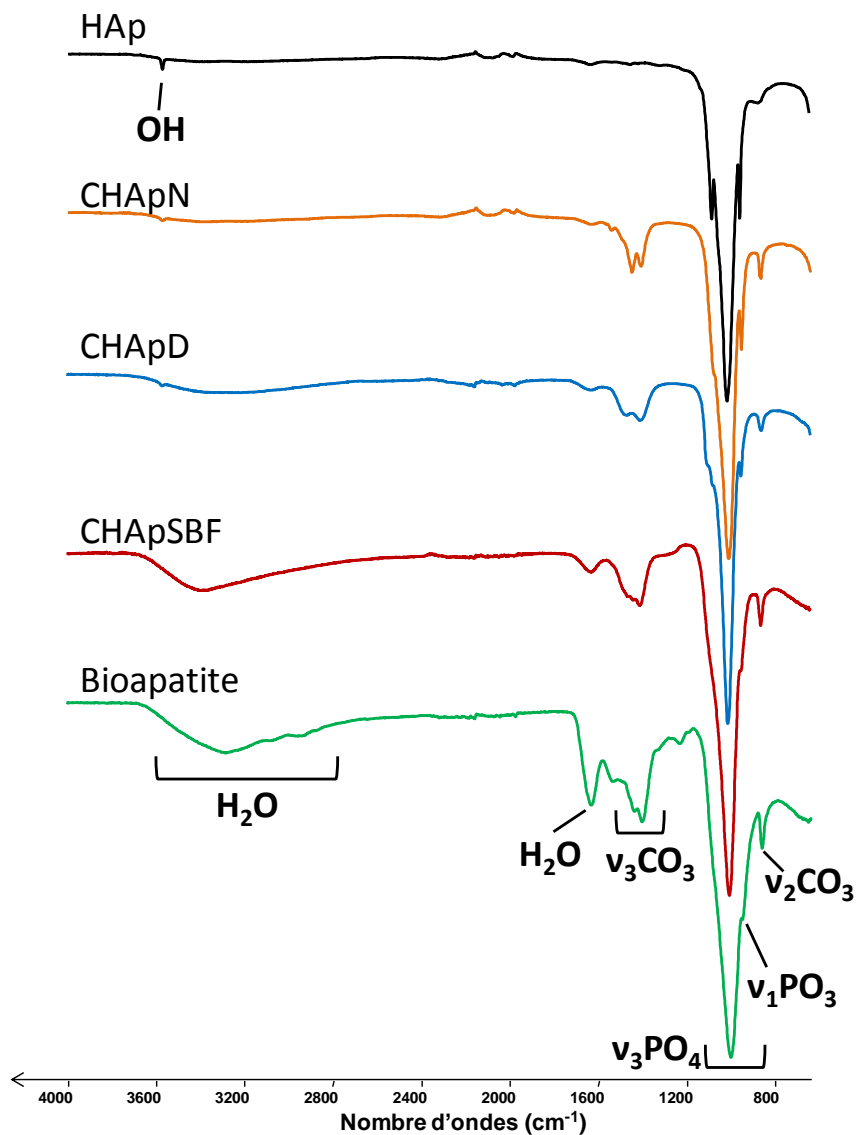


Figure 22 : Spectres infrarouge des échantillons apatitiques : Bioapatite, CHApSBF, CHApD, CHApN et HAp

Afin d'identifier la nature des substitutions par les ions carbonates, nous avons d'abord comparé les bandes d'absorption $\nu_3\text{CO}_3$ dans la région $1600\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 23). Dans l'échantillon de bioapatite, les diverses bandes d'absorption des protéines (CH, COO^-) ou des glycosaminoglycans (NH) sont aussi présentes dans ce domaine. Il est donc difficile de déterminer à partir de cette région du spectre la nature des substitutions dans cet échantillon. Les bandes correspondant au mode $\nu_3\text{CO}_3$ dans les échantillons CHApSBF et CHApD sont similaires, à part la présence de la bande due au type AB dans l'échantillon CHApSBF (Rey, 2007).

Le domaine $900\text{ - }850\text{ cm}^{-1}$ correspondant au mode de vibration $\nu_2\text{CO}_3$ a donc été utilisé ici pour l'attribution du type de substitution dans les échantillons (Fig. 23).

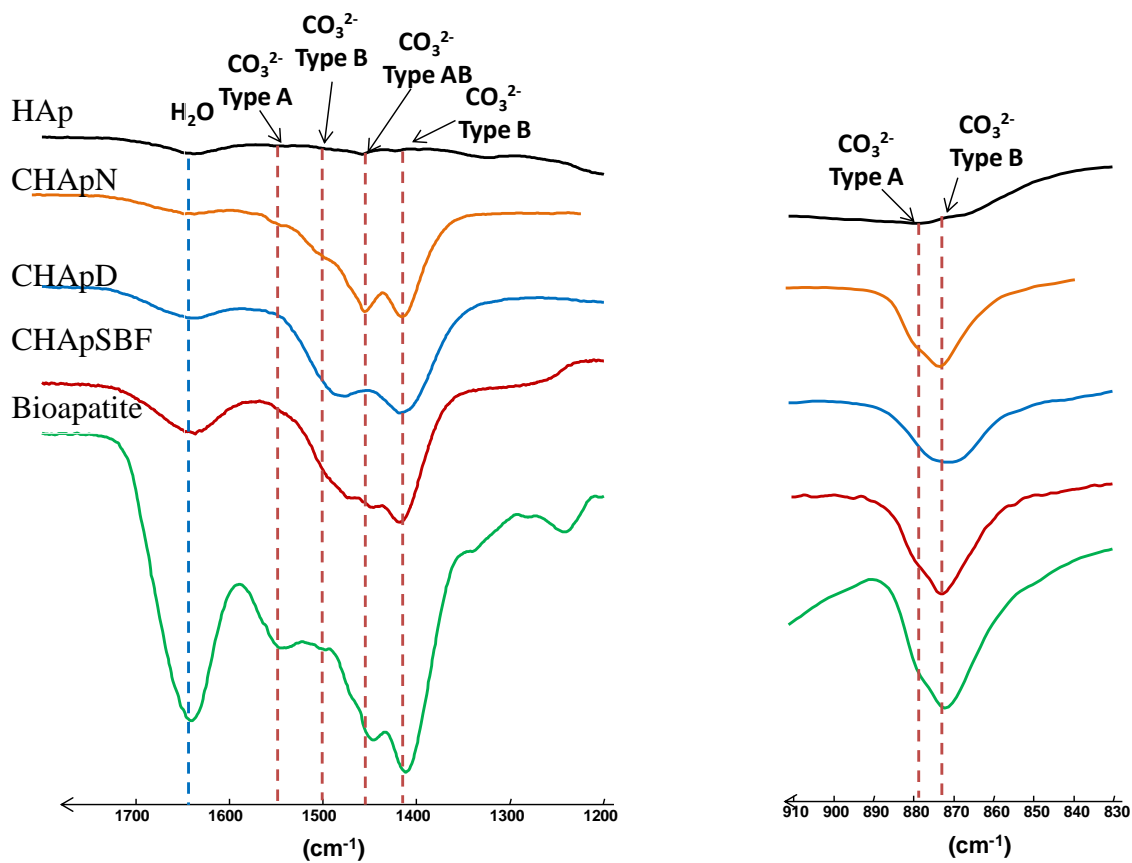


Figure 23 : Spectres IR des divers échantillons d'apatite dans les domaines $1700\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (Figure de gauche) et $900\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ (Figure de droite).

Les allures des spectres des échantillons de bioapatite, CHApSBF, CHApD et CHApN sont tous assez similaires. Dans ces échantillons, la substitution par les ions carbonates est majoritairement de type B, même si la présence de carbonates en site A est également observée.

4. Conclusion

Nous avons dans la troisième partie de ce chapitre comparé des apatites carbonatées synthétisées par diverses méthodes avec une bioapatite, issue d'un tissu osseux, pour essayer d'identifier la ou les apatites de synthèse « biomimétiques », tout en cernant les paramètres agissant sur les caractéristiques structurales de ces bioapatites.

Une importante similitude a été observée entre les échantillons CHApD et CHApSBF, et la bioapatite, en termes de morphologie (plaquettes vues par MET), de cristallinité (diffractogrammes X), et de taux et de nature de substitution par les ions carbonates. Ces deux types d'échantillons sont clairement plus « biomimétiques » que la série d'échantillons synthétisés par la méthode de neutralisation, et présentés dans la seconde partie de ce chapitre.

Entre CHApD et CHApSBF, c'est ce dernier échantillon qui présente les caractéristiques les plus semblables à la bioapatite surtout en termes de substitution (par exemple, présence d'ions Na^+) et de taille de plaquettes, plus petites que dans CHApD. Cependant, CHApSBF et la bioapatite ont été formés dans des conditions très différentes : la bioapatite est formée dans un réseau fibrillaire dense de collagène *in vivo* à la température physiologique de 37°C et en interaction possible avec diverses molécules organiques (PNCs, GAGs, etc.) ; alors que l'apatite CHApSBF est formée par simple congélation (-10°C) / décongélation (température ambiante) d'une solution SBF 1,5 (pH à 7,4). Il apparaît difficile de trouver des points communs entre ces deux voies de synthèse qui conduisent néanmoins à la formation d'apatites si similaires. A noter tout de même, qu'une large variété d'ions sont présents dans ces deux milieux de synthèse (beaucoup moins sont présents lors de la synthèse de CHApD), et ceci pourrait être un paramètre important. Un autre point commun est le pH du milieu de formation (pH = 7,4).

Rappelons que l'objectif ultime de ce travail est d'obtenir des particules d'apatite biomimétiques au sein d'une matrice de collagène, ce qui impose des contraintes fortes sur les conditions de synthèse. Ainsi le mode de synthèse de l'apatite CHApSBF ne peut être utilisé pour la minéralisation du collagène, puisque il est impossible de réaliser en même temps la congélation et la fibrillogénèse du collagène.

Par contre, la méthode d'obtention de l'apatite CHApD, malgré une plus grande taille de cristaux plaquettaires par rapport à ceux trouvés dans la bioapatite, prend en compte les contraintes imposées par la présence d'une matrice de collagène (température, pH) (Nassif, 2010B).

A l'aide de cette méthode, nous allons donc décrire dans le chapitre III, les différentes synthèses que nous avons réalisées, afin de minéraliser un réseau dense fibrillaire de collagène (décrit au chapitre I) en co-précipitant selon un nouveau procédé qui a été optimisé, les fibrilles de collagène avec les particules d'apatite. Nous avons fait l'hypothèse que l'effet du confinement apporté par le réseau de fibrilles de collagène pendant la précipitation de l'apatite mènerait à la formation de particules d'apatite de plus petite taille que dans CHApD.

A noter que les résultats obtenus sur CHApSBF, constituent une étude toute préliminaire. En effet, cette méthode de synthèse originale a été réalisée trop tardivement lors de cette thèse. Pour la suite, une étude complète sur l'influence de la température de congélation/décongélation, le rôle de la concentration des divers ions, l'influence du tampon phosphate sur la nature des apatites CHApSBF pourrait être intéressante afin d'éclaircir l'origine de la similitude entre ces apatites de synthèse et les bioapatites.

Références bibliographiques

A

- Addadi **1987** Addadi, L.; Moradian, J.; Shay, E.; Maroudas, N. G.; Weiner, S. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1987, 84, 2732-6.
- Aue **1984** Aue, W. P.; Roufosse, a. H.; Glimcher, M. J.; Griffin, R. G. Biochemistry 1984, 23, 6110-6114.

B

- Babonneau **2007** Babonneau, F.; Bonhomme, C.; Hayakawa, S.; Osaka, A. Materials Research Society 2007, 984, E. paper : 0984-MM06-05 Symp. Proc.
- Barralet **1995** Barralet, J. E. Processing and sintering of carbonate hydroxyapatite Queen Mary and Westfield College, London, 1995.
- Barrère **1999** Barrère, F.; Layrolle, P.; van Blitterswijk, C. A.; de Groot, K. Bone 1999, 25, 107S ± 111S
- Bernard **1999** Bernard L., Powder Technology 1999 103 19-25.
- Bocciarelli **1973** Bocciarelli DS, Journal of Microscopy 1973 16:21-34
- Burwell **2012** Burwell, A. K.; Thula-Mata, T.; Gower, L. B.; Habeliz, S.; Kurylo, M.; Ho, S. P.; Chien, Y.-C.; Cheng, J.; Cheng, N. F.; Gansky, S. a; Marshall, S. J.; Marshall, G. W. PloS one 2012, 7, e38852.

C

- Cho **2003** Cho, G.; Wu, Y.; Ackerman, J. L. Science 2003, 300, 1123-7.

D

- Daculsi **1990** Daculsi, G.; LeGeros, R. Z.; Heughebaert, M.; Barbieux, I. Calcified tissue international 1990, 46, 20-7.
- Daculsi **1997** Daculsi, G. ; Bouler, J. M. ; LeGeros, R. Z. International Review of Cytology 1997, 172,129 - 191.
- Doi **1997** Doi, Y.; Shibutani, T.; Moriwake, Y.; Kajimoto, T.; Iwayama, Y. Journal of Biomedical Materials Research 39, 603–610.
- Dorozhkin **2002** Dorozhkin, S. V.; Epple, M. Angewandte Chemie (International ed. in English) 2002, 41, 3130-46.

E

- Elliott **1973** Elliott, J.C.; Mackie P.E.; Young R.A. Science 1973,180,1055–1057.
- Elliott **1985** Elliott, J. C.; Holcomb, D. W.; Young, R. Calcified tissue international 1985, 37, 372-5.
- Elliott **1994** Elliott J. C., Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 1994.
- Elliott **2002** Elliott, J. C. Mineralogy & Geochemistry, 2002 48. 427–453

F

- Feki **1991** FEKI, H. E.; REY, C. ; Vignoles, M. Calcified Tissue International 1991 49 (4): 269 - 274.
- Fleet **2004** Fleet, M. E.; Liu, X. Y. Journal of Solid State Chemistry 2004, 177, 3174.
- Fleet **2004B** Fleet, M. E.; Liu, X. Y.; King, P. L. American Mineralogist 2004, 89, 1422.

G

- Gibson **1999** Gibson, I.R., Hing, K.A., Best, S.M., Bonfield, W. Proceedings of the 12th International Symposium on Ceramics in Medicine, Nara, Japan, 1999 pp. 191–194.
- Glimcher **1968** Glimcher M, Krane S (1968) The organization and structure of bone, and the mechanism of calcification. In:Treatise on Collagen. Vol. II-B. Ramachandran G, Gould B (eds) Academic Press, p 68-251
- Glimcher **1976** Glimcher MJ (1976) Composition, structure and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification. In: Handbook of Physiology 7: Endocrinology, vol. VII. Greep RO, Astwood EB (eds)

- Griffin **1990** Griffin, R. G.; Schimizu, M.; Beshah, K.; Rey, C.; Glimcher, M. J. *Journal of Solid State Chemistry* 1990, 84, 71-81.
- Gron **1963** Gron, P.; Spinelli, M.; Trautz, O. R.; Brudevold, F. *Archives of Oral Biology* 1963, 8, 251

H

- Hankermeyer **2002** Hankermeyer, C.R.; Ohashi, K.L.; Delaney, D.C.; Ross, J.; Constantz, B.R. *Biomaterials* 2002 23 (3), 743–750.
- Hanks **1949** Hanks, J. H.; Wallace, R. E. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1949, 71, 196.
- Hench **1998** Hench, L. L. *Journal of the American Ceramic Society* 1998, 81, 1705.
- Heughebaert **1977** Heughebaert J.C. Thesis, Institut national polytechnique, Toulouse, 1977
- Huang **2009** Huang, S.-J. et al. *Chemistry of Materials* 2009 21, 2583-2585

I

J

- Jäger **2006** Jäger, C.; Welzel, T.; Meyer-zaika, W.; Epple, M. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2006, 44, 573-580.
- Jodaikin **1984** Jodaikin, A. ; Traub, W. ; Weiner, S. *Journal of Ultrastructure Research* 1984, 89, 324 -332
- Juhasz **2008** Juhasz J.A.; Best S.M.; Auffret A.D.; Bonfield W. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008 19 1823–1829

K

- Kaflak **2003** Kaflak-Hachulska, A.; Samoson, A.; Kolodziejski, W. *Calcified tissue international* 2003, 73, 476-86.
- Kay **1964** Kay, M. I.; Young, R. A.; Posner, A. S. *Nature* 1964, 204, 1050-1052.
- Kim **1995** Kim HM, Rey C, Glimcher MJ, *Journal of Bone and Mineral Research* 1995 10:1589-1601
- Klagsbrun **1979** Klagsbrun, M.; Neumann, *Journal of Supramolecular Structure* 1979, 11, 349-59.
- Kokubo **1987** Kokubo, T; Ito, S; Shigematsu, M; Sakka, S; Yamamuro, T. *Journal of Materials Science* 1987;22:4067–70.
- Kokubo **1996** Kokubo, T.; Miyaji, F.; Kim, H. M. *Journal of the American Ceramic Society* 1996, 79, 1127 -1129
- Kolodziejski **2005** Kolodziejski, W. *Topics in current chemistry* 2005, 246, 235-70.

L

- Labarthe **1973** Labarthe, J. C.; Bonel, G.; Montel, G., *Annales De Chimie France* 1973, 8, (5), 289-301.
- Lafon **2004** Lafon, J. P. *Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées. Thèse de l'Université de Limoges, Limoges, (2004).*
- Landis **1991** Landis, W. J.; Moradian-oldak, J.; Weiner, S. *Connective Tissue Research* 1991, 25, 181-196.
- Lao **2009** Lao, J. Nedelec, J. M.; Jallot, E. *Journal of Materials Chemistry* 2009, 19, 2940.
- Leeuwenburgh **2004** Leeuwenburgh, S. C. G.; Wolke, J. G. C.; Schoonman, J.; Jansen, J. a. *Biomaterials* 2004, 25, 641-649.
- LeGeros **1967** LeGeros, R. Z. ; Trautz, O. R.; LeGeros, J. P.; Klein, E. *Science* 1967, 155, 1409-1411.
- LeGeros **1969** LeGeros, R. Z. ; Trautz, O. R.; Klein, E.; LeGeros, J.P. *Experientia* 1969, 25, 5–7.

LeGeros 1991	LeGeros, R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. New York: Karger; 1991.
Legros 1987	Legros, R.; Balmain, N.; Bonep, G. Calcified Tissue International 1987, 41, 137-144.
Lin 2009	Lin, K.; Chang, J.; Zhu, Y.; Wu, W.; Cheng, G.; Zeng, Y.; Ruan, M. Crystal Growth & Design 2009, 9, 177-181.
Lowenstam 1989	Lowenstam, H. A. ; Weiner, S. On Biomineralization, Oxford University Press, New York, 1989
M	
Mann 1995	Mann S., Biomimetic Materials Chemistry, Wiley/VCH, New York/Weinheim, 1995.
Mason 2008	Mason, H. E.; Kozlowski, A.; Phillips, B. L. Chemistry of Materials 2008, 294-302.
Meneghini 2003	Meneghini, C.; Dalconi, M. C.; Nuzzo, S.; Mobilio, S.; Wenk, R. H. Biophysical journal 2003, 84, 2021-9.
N	
Nassif 2010	Nassif, N.; Martineau, F.; Syzgantseva, O.; Gobeaux, F.; Willinger, M.; Coradin, T.; Cassaignon, S.; Azaïs, T.; Giraud-Guille, M. M. Chemistry of Materials 2010, 22, 3653-3663.
Nassif 2010B	Nassif, N.; Gobeaux, F.; Seto, J.; Belamie, E.; Davidson, P.; Panine, P.; Mosser, G.; Fratzl, P.; Giraud Guille, M.-M. Chemistry of Materials 2010, 22, 3307-3309.
Nawrot 1976	Nawrot, C. F.; Campbell, D. J.; Schroeder, J. K.; Van Valkenburg, M. Biochemistry 1976, 15, 3445-3449.
Nelson 1981	Nelson, D.G.A. Journal of Dental Research 1981 60(C): 1621-1629
Nelson 1982	Nelson, D.G.A.; Featherstone, J.D.B. Calcified Tissue International 1982, 34,569-581.
Nelson 1983	Nelson, D.G.; McLean, J.D.; Sanders, J.V. Journal of Ultrastructure Research 1983, 84, 1-15.
O	
Osaka 1991	Osaka A.; Miura Y.; Takeuchi K.; Asada M.; Takahashi K. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1991 2, 51-55
P	
Pan 2002	Pan Y, Fleet MJ, Reviews in Mineralogy and Geochemistry 2002, 48:13-50
Pan 2009	Pan, H.-B.; Li, Z.-Y.; Wang, T.; Lam, W. M.; Wong, C. T.; Darvell, B. W.; Luk, K. D. K.; Hu, Y.; Lu, W. W. Crystal Growth & Design 2009, 9, 3342-3345.
Pasteris 2004	Pasteris, J. D.; Wopenka, B.; Freeman, J. J.; Rogers, K.; Valsami-Jones, E.; van der Houwen, J. a. M.; Silva, M. J. Biomaterials 2004, 25, 229-238.
Peroos 2006	Peroos, S.; Du, Z. M.; de Leeuw, N. H. Biomaterials 2006, 27, 2150.
Porter 2006	Porter, A. E. Micron (Oxford, England : 1993) 2006, 37, 681-688.
Posner 1958	Posner, A. S.; Diorio., A. F. Acta Crystallographica 1958, 11, 308-309.
Q	
R	
Ramachandra 1997	Ramachandra, R.; Roopa, H. N.; Kannan T. S. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1997, 8, 511-518.
Ramila 2001	Ramila, A. ; Vallet-Regi, M. Biomaterials 2001, 22, 2301-6
Raynaud 2002	Raynaud, S.; Champion, E.; Bernache-Assollant, D.; Thomas, P. Biomaterials 2002, 23, 1065-72.
Rey 1989	Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T.; Dickson, I. R.; Glimcher, M. J. Calcified tissue international 1989, 45, 157-164.
Rey 2007	Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H.; Barroug, a Materials Science and

Engineering: C 2007, 27, 198-205.

- Rhee **2000** Rhee, S. H.; Tanaka, J. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2000, 11, 449-52.
- Roufosse **1984** Roufosse, a H.; Aue, W. P.; Roberts, J. E.; Glimcher, M. J.; Griffin, R. G. *Biochemistry* 1984, 23, 6115-20.
- Rodríguez-Carvajal **1993** Rodríguez-Carvajal, J. *Physica B: Condensed Matter* 1993, 192, 55-69.
- Roseberry **1931** Roseberry, H.H. ; Hastings, A.B.; Morse, J.K. *Journal of Biological Chemistry*, 1931, 90, 395–407.
- Rubin **2004** Rubin, M. A.; Rubin, J.; Jasiuk, W. *Bone*, 2004, 35, 11–20.

S

- Sfihi **2002** Sfihi, H.; Rey, C. In *Magnetic Resonance in Colloid and Interface Science*, Nato ASI II, Kluwer Acad. Publisher 2002, 76, 409-422.
- Skinner **2000** Skinner, H. C. W. (2000). *Mineral and Human Health, Environmental Mineralogy*, EMU Notes in Mineralogy 2, edited by D. J. Vaughan & R. A. Wogelius, pp. 383–412. Budapest: Eotvos University Press.
- Skinner **2005** Skinner HCW, In: *Essentials of Medical Geology*. Sellinus O (ed), Elsevier, 2005, 667-603
- Smith **1978** Smith, C. B. ; Smith, C. A., *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1978 49:440–444
- Stupp **1992** Stupp, S. I. ; Ciegler, G. W. *Journal of Biomedical Materials Research* 1992, 26, 169 - 183.
- Su **2003** Su, X.; Sun, K.; Cui, F. .; Landis, W. . *Bone* 2003, 32, 150-162.
- Suchanek **2002** Suchanek, W. L.; Shuk, P.; Byrappa, K.; Riman, R. E.; TenHuisen, K. S.; Janas, V. F. *Biomaterials* 2002, 23, 699-710.
- Sung **2005** Sung, Y.; Shin, Y. *Crystal Growth & Design* 2005, 5, 29-32.

T

- Tas **2000** Tas, A.C. *Journal of the European Ceramic Society* 2000 20, 2389
- Triffitt **1968** Triffitt, JT. ; Terepka, A.R. ; Neuman, W.F. *Calcified Tissue Research* 1968 2:165-176
- Trombe **1973** Trombe, J. D. *Annales de Chimie* 1973, 8(4), 251

U

V

- Verwilghen **2007** Verwilghen C.; Rio S.; Nzihou A.; Gauthier D.; Flamant G.; Sharrock, P.J. *Journal of Materials Science*, 2007 42 6062-6066
- Vignoles **1984** Vignoles, M. *Contribution à l'étude des apatites carbonatées de type B*, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1984.
- Vignoles **1988** Vignoles, M.; Bonel, G.; Holcomb, D. W.; Young, R. A. *Calcified tissue international* 1988, 43, 33-40.

W

- Webster **2001** Webster, T.J.; Ergun, C.; Doremus, R.H.; Bizios, R. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001 59, 312–317.
- Weiner **1998** Weiner, S.; Wagner, H. D. *Annual Review of Materials Science* 1998, 28, 271-298.
- Wilson **2005** Wilson, E. E.; Awonusi, A.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Tecklenburg, M. M.; Beck, L. W. *Journal of bone and mineral research* 2005, 20, 625-34.
- Wu **2002** Wu, Y.; Ackerman, J. L.; Kim, H.-M.; Rey, C.; Barroug, A.; Glimcher, M. J. *Journal of bone and mineral research* 2002, 17, 472-80.

X

Y

Young **1973**

Young R.A. ; Some aspects of crystal structural modeling of biological apatites ; Colloques internationaux C.N.R.S., Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique,1973, 21-40.

Z

Chapitre III. Minéralisation des matrices denses de collagène

I.	Introduction	81
1.	Principes de la minéralisation du tissu osseux	81
1.1	Mécanismes proposés dans la littérature sur la biominéralisation de l'os	82
1.2	Les phases précurseurs de l'hydroxyapatite.....	85
1.3	La composition chimique des apatites	87
2.	Modèles <i>in vitro</i> de la minéralisation osseuse.....	87
II.	Préparation des matrices hybrides collagène/apatite.....	91
III.	Résultats et discussion.....	93
1.	Nature de la phase minérale formée dans les matrices hybrides.....	93
1.1	Identification de la phase cristalline dans les matrices hybrides	93
1.2	Environnement chimique des sites phosphates de la phase minérale dans les matrices hybrides.....	96
1.3	Les phases minérales intermédiaires de l'apatite après co-précipitation	103
1.4	Mise en évidence et quantification de la substitution en ions carbonates dans la phase minérale des matrices hybrides	105
2.	Relations spatiales entre la matrice de collagène et la phase minérale	108
2.1	Caractérisations des fibrilles de collagène et de la nucléation/croissance de l'apatite.....	108
2.2	Orientation des plaquettes d'apatite avec les fibrilles de collagène.....	116
2.3	Minéralisation intra et interfibrillaire.....	119
3.	Conclusion de la mise au point d'une matrice hybride mimétique du tissu osseux ...	125
4.	Influence de polymères synthétiques acides, des NCPs et des ions sur la minéralisation <i>in vitro</i>	127
4.1	Etude des polymères acides synthétiques et des NCPs.....	127
4.2	L'influence de la nature des ions dans le procédé de minéralisation.....	135
IV.	Conclusion.....	138
	Références bibliographiques	139

Minéralisation des matrices denses de collagène

I. Introduction

1. Principes de la minéralisation du tissu osseux

Le dépôt d'une quantité importante de cristaux inorganiques dans une matrice organique est le principe de la minéralisation tissulaire. Ce processus est très répandu dans les milieux biologiques, des plus primitives des espèces aux animaux les plus complexes.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés principalement au tissu le plus représentatif chez les mammifères, l'os. L'os effectue aussi bien une fonction mécanique pour soutenir le corps, qu'une fonction protectrice des organes mous, ainsi que celle de réservoir d'ions, notamment calcium et phosphates (Weiner, 1998 & Fratzl, 2007). L'os séché est constitué de 65 à 70% en masse de phosphates de calcium, de 30 à 35% de collagène et d'un faible pourcentage (~3-5%) de molécules organiques, telle que des protéines non-collagéniques (NCPs) riches en fonctions acides (Hunter, 1993 ; Boskey, 1996 & Butler, 1995) et des protéoglycanes. Les protéoglycanes également chargés négativement sont composés d'une protéine et d'un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAGs) (Nelimarkka, 1997). Ces molécules ont été beaucoup étudiées dans la littérature car leur rôle paraît indispensable pendant la biominéralisation ce dont nous parlerons plus en détails ultérieurement.

Dans l'os, les cristaux d'apatite se trouvent dans l'espace intrafibrillaire (Traub, 1989) et interfibrillaire (Hellmich, 2002) de la matrice de collagène. L'axe *c* des cristaux d'apatite est co-aligné avec l'axe principal des fibrilles de collagène (Fig. 1). La synergie intime entre l'apatite et la matière organique confère à l'os des propriétés mécaniques exceptionnelles (Fratzl, 2007). Comment ces plaquettes d'apatites se forment-elles dans l'espace inter- et intrafibrillaire des matrices fibrillaires de collagène? Nous allons voir, parmi les théories de minéralisation proposées qu'il n'y a pas de consensus dans la littérature concernant les premières étapes du mécanisme de formation du tissu osseux à savoir l'initiation de la nucléation et la croissance des apatites.

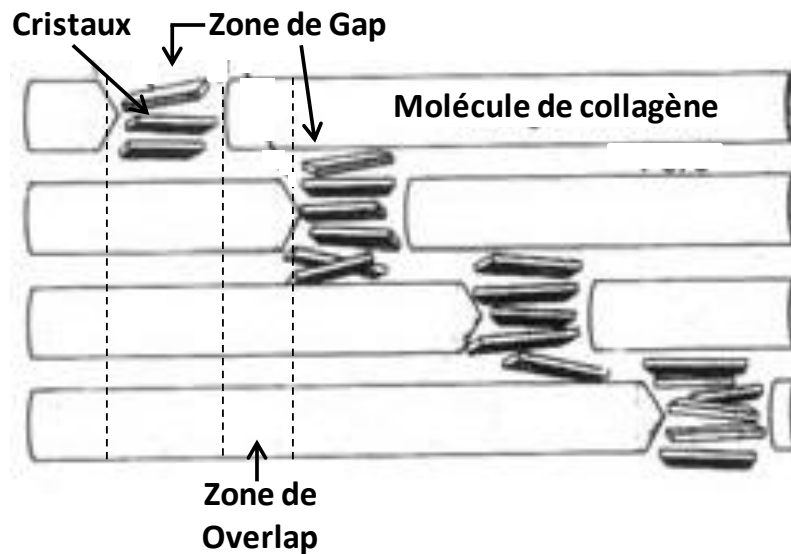


Figure 1: Schéma de la minéralisation d'une fibrille de collagène. Les cristaux d'apatite sont déposés au sein des zones de gap (D'après Glimcher, 1960).

1.1 Mécanismes proposés dans la littérature sur la biominéralisation de l'os

Un premier mécanisme proposé dans les années 1920 implique les cellules ostéoformatrices, les ostéoblastes, pour expliquer l'initiation de la nucléation (Robison, 1923 & Fell, 1934). Il est décrit que ces cellules concentrent localement au sein de vésicules de sécrétion les précurseurs ioniques (notamment les ions calcium et phosphates) de la phase minérale (Lopez, 1978). Ensuite, par un mécanisme de nucléation homogène, les cristaux précipitent dans cette solution sursaturée par le biais de clusters de taille critique qui initie la nucléation. La croissance de ces points de nucléation est assurée par l'addition d'ions à la surface apatitique. Après la formation des cristaux d'apatite, cette phase minérale se dépose à la surface des fibrilles de collagène.

Dans les années cinquante, grâce au développement de la microscopie électronique à transmission permettant une meilleure résolution, les chercheurs ont pu mettre en évidence un lien étroit entre les fibrilles de collagène et la phase minérale (Robinson, 1952). Des cristaux apatitiques sont organisés dans l'espace en suivant l'ordre hiérarchique des fibrilles de collagène. Suite à cette découverte, un mécanisme de nucléation hétérogène a été proposé par Glimcher et ses collaborateurs (Glimcher, 1957). Il est proposé qu'un site spécifique de nucléation dans les fibrilles de collagène interagisse avec les ions de la solution et forme une phase solide à partir des ions en solution.

Beaucoup d'études ont porté sur l'influence des fibrilles de collagène sur la minéralisation. Glimcher *et al.* ont montré que les fibrilles de collagène peuvent initier la nucléation d'apatite (Glimcher, 1957). Cette étude a été appuyée par plusieurs travaux dans la littérature tels que ceux de Christiansen *et al.* qui ont observé la minéralisation des molécules de collagène en l'absence de protéines non-collagéniques (Christiansen, 1992). Murshed *et al.* ont également souligné l'importance de l'organisation 3D des fibrilles de collagène en démontrant qu'elle est nécessaire et suffisante pour initier la calcification (Murshed, 2005).

Dans la structure 3D des fibrilles de collagène, les zones de gap et d'overlap jouent un rôle important dans l'étape de la nucléation de la phase minérale (Fig. 1). Les premiers nucléi des cristaux d'apatite ont été identifiés dans ces régions (Landis 1993). Ce processus, appelé minéralisation fibrillaire, est probablement dû aux effets de confinement au sein des zones de gap et d'overlap dans les fibrilles de collagène (Jackson, 1957 ; Glimcher, 1960 & Landis, 1993). Certains chercheurs ont proposé que la nucléation des cristaux d'apatite pouvait également être initiée dans les mêmes types de site, mais à la surface des fibrilles de collagène (Nylen, 1960 ; Landis, 1996). Ainsi, la minéralisation débiterait dans des espaces intra- et interfibrillaires jusqu'à devenir continue le long des fibrilles.

Une étude récente de Silver et Landis (Landis, 2006 & Silver, 2011) sur des résidus chargés de collagène vise à montrer, notamment par modélisation, une interaction probable des acides aminés situés dans les sites de confinement avec les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} engendrant une supersaturation en ions dans les espaces inter et intra-fibrillaires. Ceci pourrait expliquer le co-alignement de l'axe *c* des cristaux d'apatite avec l'axe principal des fibrilles de collagène.

A part les molécules de collagène, la biominéralisation du tissu osseux *in vivo* a lieu aussi en présence de protéines non-collagéniques (Boskey, 1989). Au moins une vingtaine de ces protéines ont déjà été isolées et/ou séquencées (Robey, 1996). Un de leurs points communs est la présence importante d'acides aminés naturels acides, tels que l'aspartate, le glutamate et la forme anionique de la phosphosérine (Fig. 2).

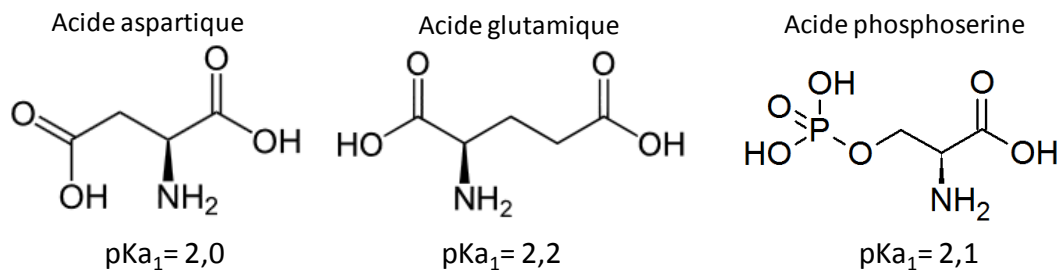


Figure 2 : Formules des acides-aminés et constantes d'acidité: acide aspartique, acide glutamique et acide phosphoserine.

L'importance de ces protéines non-collagéniques a souvent été évoquée dans la littérature (Boskey, 1995 ; Hunter, 1996 ; George, 1993 & George, 2008). Leur localisation laisse supposer leur implication dans la régulation du processus de biominéralisation de l'os. Dans les mécanismes de minéralisation proposés par George *et al.* (Fig. 3), les protéines interviennent à plusieurs étapes : l'activation des sites de nucléation dans les fibrilles de collagène et la régulation de la croissance apatitique. Ces protéines spécifiques pourraient faciliter ou contrôler la nucléation et la croissance des cristaux dans des sites spécifiques du collagène en s'associant avec celui-ci.

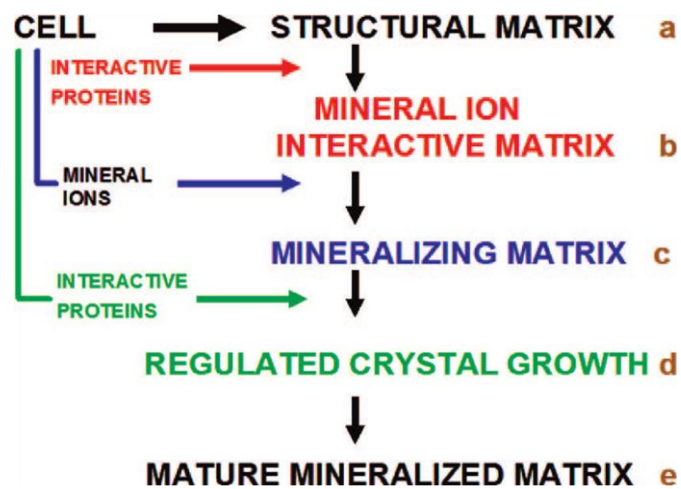


Figure 3: Proposition des étapes de la biominéralisation de l'os avec l'intervention des protéines non-collagéniques (NCPs) D'après George 2008: (a) « Activation » de la matrice structurale après l'ajout de protéines ; (b) Enrichissement des ions sur la matrice ; (c) Minéralisation de la matrice; (d) Addition de nouvelles protéines régulant la croissance cristalline au sein de la matrice ; (e) Matrice minéralisée.

Plus précisément, la théorie la plus répandue sur le rôle des protéines non-collagéniques est leurs interactions avec les ions calcium. En effet grâce à leur fonction acide, il est proposé que ces protéines puissent interagir avec les ions calcium afin d'augmenter

localement leur concentration pour promouvoir une nucléation hétérogène (Deshpande, 2008 ; Glimcher, 1984 & George, 2008). Par interaction sélective avec la surface cristalline apatitique, les protéines moduleraient également la forme de l'apatite en plaquette ainsi que leur orientation (Beniash, 2011).

Plusieurs études ont démontré qu'une seule protéine pouvait jouer plusieurs rôles pendant le processus de biominéralisation (Saito, 1997 & Shaw, 2008) tels que par exemple: (i) stabiliser de « potentiels » précurseurs amorphes de la phase minérale ; (ii) participer à l'initiation de la nucléation ; (iii) servir d'inhibiteur de croissance et de régulateur de la morphologie de la phase minérale. Il est intéressant de remarquer qu'une même protéine pourrait être à la fois l'initiateur et l'inhibiteur pour la nucléation d'apatite pendant la minéralisation. En effet, en fonction de sa concentration, son environnement (solution ou gel) (Hunter, 1993) et son interaction avec les autres molécules, la protéine n'aurait pas la même fonction pendant la minéralisation (Boskey, 1998). Ceci explique les résultats souvent contradictoires sur les mêmes types de protéines dans la littérature, d'où l'importance d'étudier les NCPs dans un modèle biomimétique fidèle de l'os c'est à dire en milieu confiné et ordonné. Notons que le devenir des protéines pendant le processus de minéralisation *in vivo* (notamment l'obtention de plusieurs fragments) rend également difficile la détermination de leur rôle.

L'implication importante de molécules organiques (collagène, protéines non collagéniques) dans le processus de minéralisation (la vitesse de croissance des cristaux, l'orientation des cristaux, leur co-alignement avec les fibrilles de collagène, leur taille et leur forme) est communément admis, mais les mécanismes mis en jeu pendant la minéralisation ne font pas l'objet d'un consensus dans la littérature.

1.2 Les phases précurseurs de l'hydroxyapatite

Pour avancer dans la compréhension du mécanisme de minéralisation, les chercheurs s'intéressent aussi aux phases précurseurs de l'hydroxyapatite, si elles existent. L'identification de la première phase formée aiderait à déterminer les propriétés chimiques et structurales des sites de nucléation dans les fibrilles de collagène et de mettre en évidence la contribution des protéines non-collagéniques ou d'autres biomolécules dans le processus de nucléation.

Le diagramme d'énergie (Fig. 4) (Mann, 1983) montre que la formation directe de la phase thermodynamiquement la plus stable, sans le passage par des phases cinétiques intermédiaires, n'est pas favorable énergétiquement. A l'inverse, la formation successive de

phases cinétiques serait favorable, pour aboutir également à la formation de la phase apatitique sans franchir de barrières énergétiques trop élevées. C'est pourquoi, il a été proposé que la phase d'apatite se forme *via* une phase intermédiaire pendant la minéralisation. Cette phase intermédiaire cinétiquement favorable se transformerait alors facilement en hydroxyapatite. Jusqu'à ce jour, aucune technique ne nous permet d'observer *in situ* de telles transitions de phase, si elles existent. Et la nature chimique du premier cristal formé au sein du tissu osseux (amorphe, octacalcium de phosphate (OCP), apatite) reste inconnue et source de débats. Mais cette hypothèse d'un passage par une phase métastable est soutenue par des observations expérimentales *in vitro*.

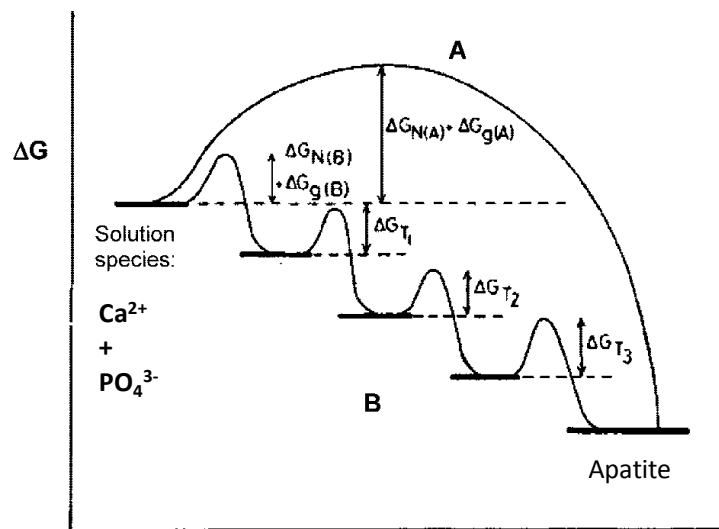


Figure 4: Diagramme d'énergie pour la formation d'hydroxyapatite: selon la voie A, la cristallisation s'effectue « directement » à partir des espèces en solution; selon la voie B, la formation de l'apatite est réalisée à partir de phases de transition métastables à savoir différentes structures cristallines et amorphes de phosphate de calcium. (D'après Mann, 1983)

Dans les années 60, deux mécanismes de formation de l'os sont proposés basés sur le passage par un précurseur de phosphate de calcium. Les travaux de Brown (Brown, 1966) suggère le passage par une phase d'OCP ($\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) avant la formation d'hydroxyapatite. Son hypothèse repose sur la morphologie en plaquettes des particules d'OCP et sa structure proche de celle de l'hydroxyapatite. Posner *et al.* eux ont proposé le phosphate de calcium amorphe (ACP, Amorphous Calcium Phosphate) comme phase intermédiaire (Harper, 1966 & Termine, 1966) en se basant sur des résultats obtenus par DRX et IR. Cette phase intermédiaire serait stabilisée par des biomolécules présentes dans la matrice extracellulaire. A cause de son court temps de vie dû à sa faible stabilité et de la faible quantité de cette phase (inférieur à 5%) (Boskey, 1998), même avec les techniques d'aujourd'hui, l'observation *in vivo* d'une telle phase semble difficilement réalisable et le débat continue sur le(s) potentiel(s) précurseur(s) impliqué(s). Néanmoins, l'utilisation de la

cryo-microscopie électronique à balayage (Cryo-MEB) a permis de mettre en évidence des particules amorphes dans les arêtes du poisson zèbre (Mahamid, 2008 & 2010)

Egalement récemment, il a été proposé que la minéralisation nécessitait le passage par un « Polymer-Induced Liquid-Precursor » (PILP) (Olszta 2007). Ce mécanisme est basé sur l'utilisation de polymères synthétiques acides, le polyaspartate, pour mimer les NCPs *in vivo*. Pendant ce processus, les polymères négativement chargés interagissent avec les ions calcium afin de former un « précurseur liquide » dont le caractère fluide permettrait de s'infiltrer dans les espaces intra-fibrillaires de collagène par capillarité. En présence, d'ions phosphate, ce précurseur évolue vers une phase amorphe qui va précipiter en hydroxyapatite. Cette hypothèse met favorablement en avant un transport d'ions très important au sein de la matrice. Il est important de souligner que l'utilisation d'un tel polymère pour former des particules amorphes et favoriser les interactions collagène-hydroxyapatite afin de mener à bien la minéralisation avait été proposée antérieurement par Bradt *et al.* (Bradt, 1999).

1.3 La composition chimique des apatites

La composition chimique de la phase minérale dans le tissu osseux évolue en permanence. Pendant la maturation de la phase minérale, le taux de calcium augmente entraînant une augmentation de la cristallinité par la diminution des défauts structuraux. Compte tenu de la présence importante de lacunes et de substitution dans les sites des ions calcium, l'apatite biologique est toujours déficiente en calcium, même si son rapport Ca/P s'approche de la valeur stœchiométrique (1,67) avec l'âge. Comme nous avons déjà abordé ce sujet à savoir la composition chimique des apatites dans le chapitre précédent (Chapitre II), nous n'en rediscuterons pas ici.

2. Modèles *in vitro* de la minéralisation osseuse

Etant un des composants majoritaires de l'os, le collagène est fréquemment utilisé dans la littérature pour étudier la minéralisation dans le tissu osseux. Mais les précautions imposées pour conserver l'intégrité et les propriétés intrinsèques de cette molécule ne sont pas toujours respectées pendant la mise en place du modèle. Par exemple, notamment, les molécules de collagène se dénaturent irréversiblement en gélatine au delà de 37°C. Ainsi, nous pouvons suspecter en observant les clichés de MET des échantillons minéralisés à 40°C par Kikuchi *et al.* (Fig. 5A) que le collagène malgré la présence de quelques striations

transversales soit globalement dénaturé en gélatine (Kikuchi, 2001). L'auto-assemblage des molécules de collagène en fibrilles, « la fibrillogénèse » n'est pas toujours réalisée correctement. Le cliché Fig. 5B montre une matrice de collagène minéralisée dans laquelle aucune fibrille de collagène n'est observée. (Tampieri, 2003).

Néanmoins, il existe des modèles d'étude de minéralisation *in vitro* qui prennent en considération les précautions nécessaires à l'utilisation du collagène évoquées précédemment. Ces modèles conduisent à la formation de fibrilles striées de collagène. Mais, l'organisation 3D du réseau de fibrilles de collagène est le plus souvent négligée.

En effet, la concentration finale en collagène dans la matrice est généralement très faible (< 5 mg/mL), telle que pour l'éponge de collagène commerciale Cellagen® (Olszta, 2007) ou la matrice de collagène préparée par Deshpande *et al.* (Deshpande, 2008) dont la concentration massique de collagène est à 0,1 à 0,2 %. Ainsi dans ces modèles, la concentration de collagène reste très inférieure aux conditions *in vivo*, menant à l'absence d'une organisation tridimensionnelle et une densité des fibrilles de collagène mimétique de la matrice organique de l'os. Comme nous pouvons l'observer sur le cliché de MEB de la figure 5C, les fibrilles de collagène ne sont pas organisées spatialement. Cette structure engendre peu de liaisons ioniques et/ou hydrogène entre les fibrilles de collagène, qui sont essentielles pour obtenir de bonnes propriétés mécaniques des matrices. Dans ce modèle de collagène à faible concentration, l'espace interfibrillaire est notablement plus grand que dans le tissu osseux, les effets de confinement peuvent donc s'y avérer plus rares.

D'autres modèles sont basés sur la minéralisation de tendons (Traub, 1989 & Nudelman, 2010). Dans le tendon, la densité en collagène est très proche de celle de l'os. En revanche, il présente une organisation 3D uniaxiale. Cette organisation induit une perte d'information spatiale qui limite les conclusions obtenues à partir de ce modèle bien que, comme observé sur le cliché de MET d'un tendon (Nudelman 2010) (Fig. 5D), les striations correspondant à la périodicité axiale de 67 nm sont remarquablement définies.

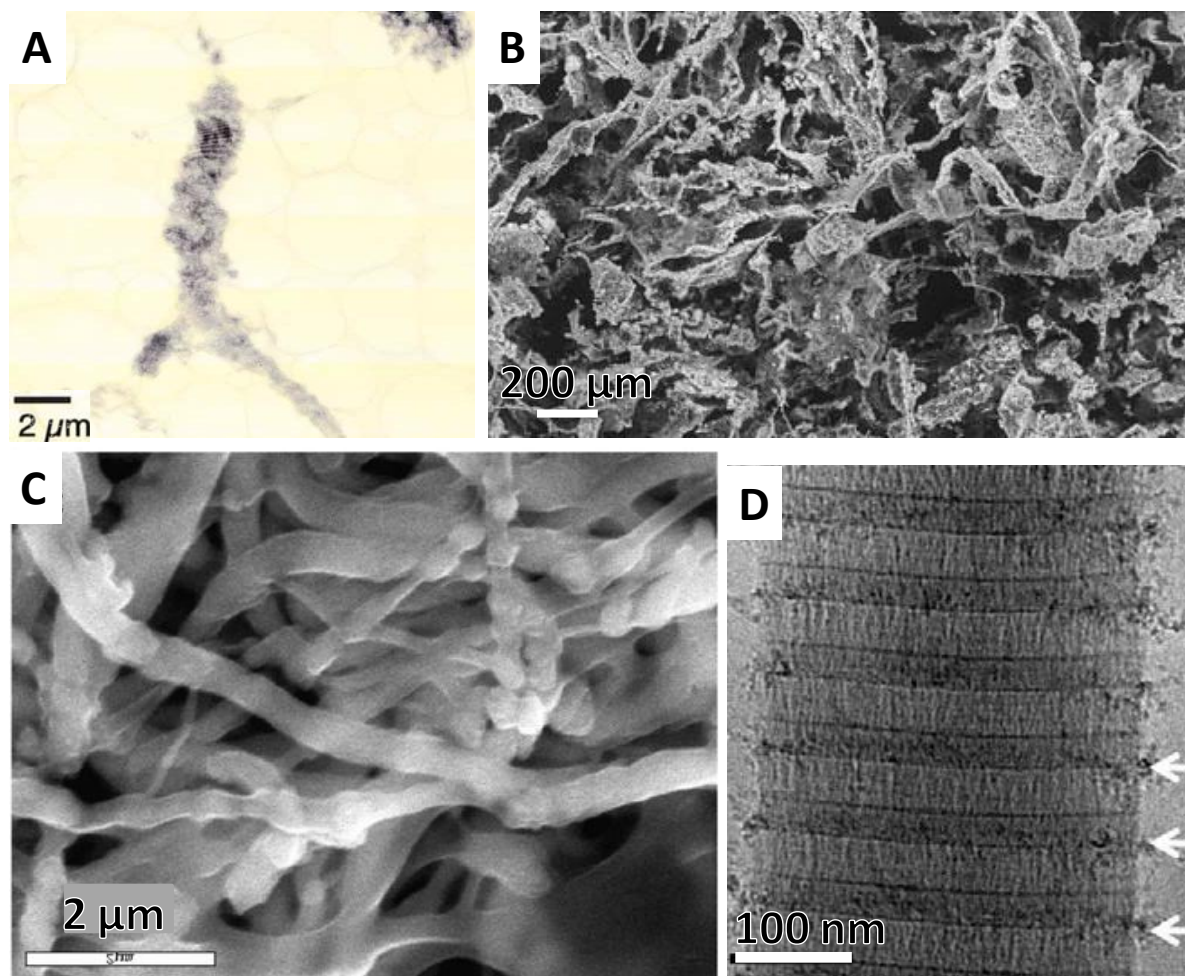


Figure 5 : A. Cliché de MET d'une matrice de collagène après chauffage à 40°C (d'après Kikuchi, 2001) ; B. Cliché de MEB d'une matrice de collagène après atomisation (d'après Tampieri, 2003) ; C. Cliché de MEB d'une matrice minéralisée de collagène ~ 5mg/mL (d'après Olszta, 2007) ; D. Cliché de MET d'un tendon coupé (d'après Nudelman, 2010)

Weiner et Wagner ont proposé de décrire l'architecture de l'os selon sept niveaux d'organisation hiérarchique (Weiner, 1998). Compte tenu de la difficulté de synthétiser une telle matrice *in vitro*, certains auteurs ont utilisé des matrices biologiques, c'est-à-dire des matrices décalcifiées à partir d'arêtes de poisson (Chen, 2005) ou de la dentine (plus précisément au niveau de lésions formées par les caries) (Burwell, 2012). Les arêtes de poisson sont souvent utilisées pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux en raison de l'arrangement similaire des fibrilles de collagène dans ces deux types de tissus. En revanche, elles contiennent plus de lipides (Phleger, 1976) et sont moins calcifiées (Biltz, 1969) que le tissu osseux des vertébrés. Certains auteurs ont supposé que sa faible teneur en acides-aminés présentant des fonctions -OH (telle que l'hydroxproline) induisait une plus faible interaction du collagène avec la phase minérale que dans les os de mammifère (Pasteris, 2004). Même si les échantillons d'os déminéralisés et embryonnaires apparaissent comme les modèles les plus

pertinents, l'étape de déminéralisation (par traitement acide ou EDTA) reste une étape limitante pour l'utilisation de ces modèles. En effet, le traitement peut altérer la matrice organique en solubilisant certains de ses composants (notamment le collagène et les NCPs) et entraîner la présence de débris cellulaires. Ainsi le procédé est difficilement reproductible (Gilbert, 2006).

Les connaissances et le savoir-faire relatif au collagène dans notre laboratoire ont permis de réaliser des matrices denses de collagène mimant l'organisation de la matrice organique du tissu osseux et de les minéraliser (Nassif, 2010). Le co-alignement des cristaux d'apatite avec l'axe principal des fibrilles de collagène a été, dans ce cas, réalisé au sein d'une matrice de collagène à 300 mg/mL mais en présence de polymères synthétiques, un PolyAspartate. De plus, les matrices obtenues sont faiblement minéralisées (~5% en masse) et l'organisation 3D de ces matrices de collagène est difficilement reproductible à cause de la technique de dialyse inverse utilisée ici pour concentrer le collagène (Chapitre I). Nous avons ainsi mis en place un nouveau modèle de minéralisation basé sur le procédé d'injection continue couplé à la dialyse (Wang 2011), procédé décrit dans le chapitre I. Avec ces matrices, nous avons réalisé une minéralisation « bio-inspirée » en adaptant le protocole de synthèse de CHApD introduit dans le chapitre II.

En effet, notre modèle prend en compte plusieurs facteurs qui paraissent essentiels pour mener à bien la minéralisation à savoir: (i) Accéder aux propriétés d'auto-assemblage des molécules de collagène pour recréer la structure hiérarchique de la matrice osseuse, (ii) induire correctement la fibrillogénèse afin de reproduire les espaces de confinement et pouvoir en mesurer l'impact, (iii) coprécipiter le minéral avec le collagène et agiter pendant les imprégnations dans un fluide physiologique simulé pour recréer le fluide extracellulaire et la dynamique de la formation du tissu osseux. Ces résultats nous ont permis de discuter le rôle des NCPs et du procédé PILP pendant la minéralisation.

II. Préparation des matrices hybrides collagène/apatite

Nous avons minéralisé des matrices concentrées à 250 mg/ml en collagène car, comme décrit dans le chapitre I, elles possèdent une densité et une organisation hiérarchique qui miment celles décrites dans l'os compact. Etant donné le peu de consensus dans la littérature sur le rôle exacte des protéines non-collagéniques dans l'initiation de la minéralisation, nous n'avons utilisé que les composants majoritaires de l'os : les molécules de collagène, les sels minéraux et l'eau. L'absence de ces molécules organiques limite aussi le nombre d'interfaces simplifiant ainsi son étude que nous décrirons ultérieurement dans le chapitre IV.

Pour recréer des conditions *in vitro* les plus proches du vivant, nous avons choisi de concentrer la solution acide de collagène en présence de sels minéraux. En effet, les ions présents dans le fluide extracellulaire comme le calcium, les phosphates et carbonates pénètrent et circulent en continu dans les tissus biologiques. Nous les avons donc introduits dans la solution mère de collagène (1 mg/mL) afin de précipiter simultanément la matrice de collagène et la phase inorganique dans la chambre de dialyse déjà décrite au Chapitre I.

La reproductivité des matrices de collagène, l'absence d'additifs organiques ainsi que l'ajout d'ions carbonates dans la phase minérale présentent une réelle avancée au regard des études de minéralisation précédemment réalisées au laboratoire (Nassif, 2010).

Deux compositions différentes de sels ont été utilisées (Tab. 1) dont la force ionique est similaire à celle du plasma sanguin humain. Le choix de la concentration des sels est, soit basé sur la synthèse d'apatites carbonatées par diffusion de vapeur d'ammoniac (Nassif, 2010B) décrite au chapitre II, soit fixé par celle d'une solution de « Simulated Body Fluid » (SBF) dont la composition ionique vise à mimer celle du plasma sanguin humain (Kokubo, 1987) décrite aussi au chapitre II. Par contre, il est important de souligner que les concentrations en ions calcium, phosphates et carbonates dans la solution CHA est environ 20 fois supérieure à celles présentes dans la solution SBF et par rapport aux conditions *in vivo*.

Concentration (mM)	CaCl ₂ 2H ₂ O	NaH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	NaHCO ₃	NaCl	KCl	MgCl ₂ 6H ₂ O	Na ₂ SO ₄	Force ionique (mM)
CHA solution	46.1	13.8	-	13.8	-	-	-	-	165.9
SBF solution	2.5	-	1	4.2	142	3	1.5	0.5	165.7

Tableau 1: Composition des ions présents dans la solution acide de collagène diluée (1 mg/mL)

Après avoir concentré la solution acide de collagène en présence des sels, les matrices hybrides sont précipitées par remontée de pH sous vapeur d'ammoniac. Les matrices hybrides sont nommées **Coll/CHA** et **Coll/SBF** en fonction de la solution saline utilisée.

Afin d'augmenter le taux de minéralisation des matrices hybrides, celles-ci ont été immergées dans une solution de SBF (pH=7,4) cette fois-ci concentrée 1,5 fois plus que dans les conditions décrites *in vivo* (Rhee, 2000). La solution SBF est une solution métastable qui est souvent utilisée pour le traitement de surface « inerte » de biomatériaux implantables osseux. L'imprégnation est effectuée sous agitation pendant 7 jours à 37°C. Les matrices hybrides sont alors nommées **Coll/CHA(SBF)** et **Coll/SBF(SBF)** selon le même principe que précédemment.

Le produit de référence, une matrice de collagène fibrillaire sans sels mise dans un bain de SBF 1,5 **Coll(SBF)**, est également préparée.

Après imprégnation dans la solution SBF 1,5, les matrices hybrides sont toutes recouvertes d'un précipité blanc. Il est également observé sur la paroi interne du récipient confirmant les propriétés métastables du SBF préparé.

Les préparations et les traitements de toutes les matrices hybrides sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Matrices hybrides	Ions présents pendant la concentration du collagène	Imprégnation dans du SBF 1,5
Coll/CHA	Solution CHA	Non
Coll/CHA(SBF)	Solution CHA	Oui
Coll/SBF	Solution SBF	Non
Coll/SBF(SBF)	Solution SBF	Oui
Coll(SBF)	Rien	Oui

III. Résultats et discussion

Les échantillons ont tous été caractérisés à plusieurs échelles grâce à différentes techniques. Dans un premier temps, nous avons identifié la nature de la phase minérale dans les matrices hybrides en les comparant avec celle de l'os, puis nous avons étudié l'association entre la phase minérale et le collagène. Pour cela, différentes méthodes de caractérisation ont été utilisées : la diffraction des rayons X aux grands angles en transmission (Wide Angle X-Ray Scattering, WAXS) nous permet de caractériser la nature de la phase inorganique ainsi que l'organisation structurale des fibrilles de collagène; la microscopie électronique à transmission (MET) nous permet de caractériser localement l'organisation des fibrilles de collagène et la répartition de la phase minérale au sein de la matrice organique; l'analyse thermogravimétrique (ATG) nous permet de quantifier le taux de minéralisation (la charge en minéral) et la spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire à l'état solide (RMN) nous fournit des informations plus détaillées sur la nature de la phase minérale.

1. Nature de la phase minérale formée dans les matrices hybrides

1.1 Identification de la phase cristalline dans les matrices hybrides

Avant tout, il est impératif d'identifier la nature de la phase minérale et de vérifier la présence éventuelle de phases « contaminantes » de phosphate de calcium et/ou de phases intermédiaires dans les matrices hybrides afin de connaître l'impact de la matrice de collagène sur la nature des cristaux. En effet, la synthèse de CHApN et de CHApSBF (cf. chapitre II) ne mène qu'à la formation d'apatite. La présence d'une autre phase de phosphate de calcium impliquerait que le collagène influence la cinétique de précipitation. Pour cela, nous avons utilisé la diffraction des Rayons X. Cette méthode nous permet une étude directe de la phase minérale dans les matrices humides sans aucun traitement (séchage ou fixation). En effet, l'échantillon est enfermé hermétiquement dans un capillaire de 2 mm de diamètre, qui lui est placé sous vide.

Dans un premier temps, nous comparons les diffractogrammes des matrices Coll/CHA et Coll/SBF (Fig. 6) sur lesquelles un faible pic ($2\theta = 31,1^\circ$, $d_{\text{longitudinale}} = 0,29$ nm) correspond à la distance longitudinale entre deux acides aminés dans la molécule de collagène (Woodhead-Galloway, 1982). Ce type de profil a déjà été observé pour des matrices

faiblement ou non minéralisées (Nassif, 2010). Ceci prouve que les molécules de collagène ne sont pas dénaturées pendant l'expérience. En effet, la distance entre les acides aminés est plus grande dans de la gélatine (0,31 nm) (Glimcher, 1960). Nous n'avons pas pu détecter la présence d'une phase minérale dans l'échantillon Coll/SBF, à cause de son faible taux de minéralisation à 1%, déterminé par ATG. En revanche, la présence d'environ 8% de minéral dans la matrice Coll/CHA, mesurée par ATG, est suffisante pour être détectée par DRX. Un faible épaulement est présent à $2\theta = 25,9^\circ$ (Fig. 6 indiqué par une flèche). Ce pic paraît correspondre au plan (002) de l'apatite (Nassif, 2010). Néanmoins, la présence d'un seul pic de diffraction d'intensité faible ne nous permet pas de trancher sur la nature de cette phase. Sa caractérisation par une méthode plus sensible telle que la RMN à l'état solide est réalisée, nous allons en discuter ultérieurement.

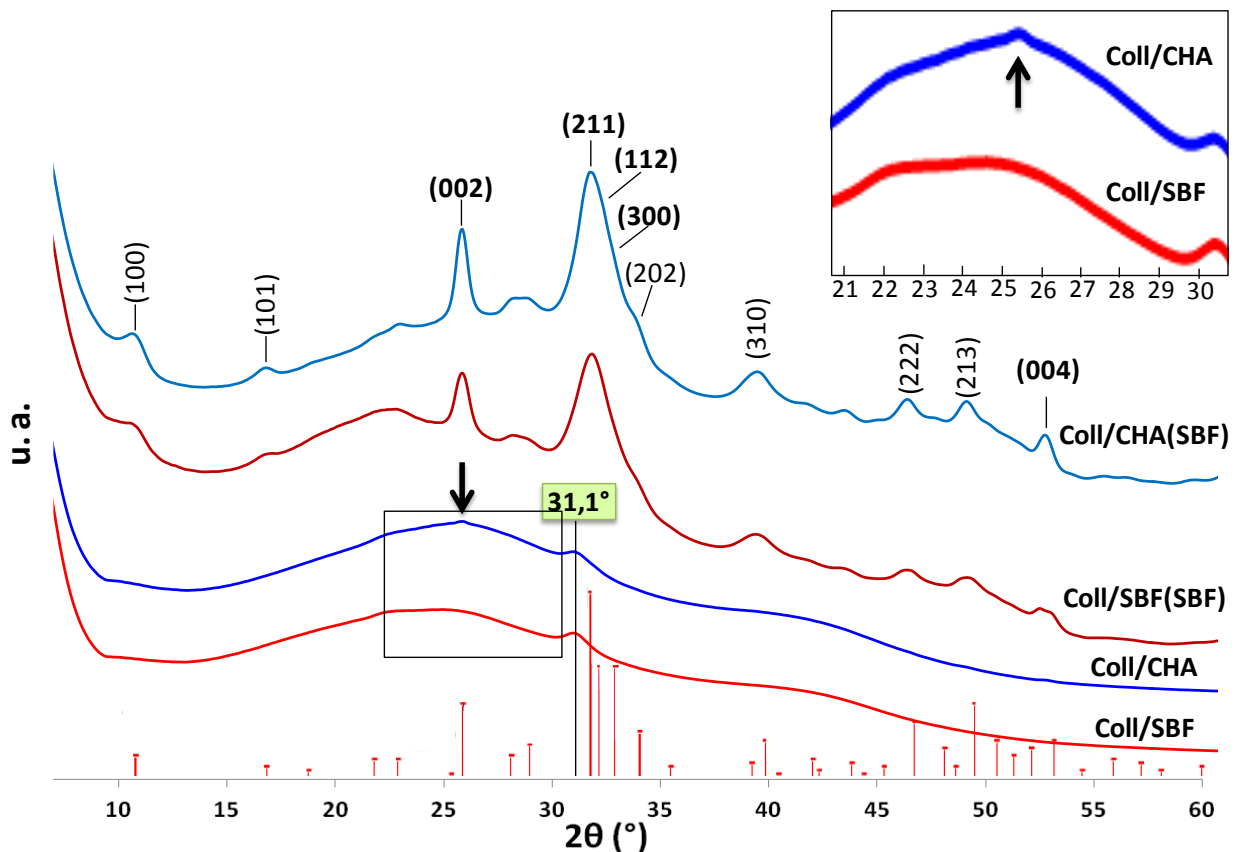


Figure 6 : Diffractogrammes des matrices hybrides, Coll/CHA(SBF), Coll/SBF(SBF), Coll/CHA et Coll/SBF (CuK α). Les données du fichier JCPDS 9-0432 pour l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ de structure hexagonale sont montrées en référence.

Nous avons envisagé que pendant l'imprégnation dans les bains de SBF 1,5, les ions diffuseraient au sein de la matrice par les espaces intra et interfibrillaires afin d'alimenter les premiers points de nucléation obtenus après la co-précipitation et/ou de précipiter par

hétéronucléation au contact avec les fibrilles de collagène. Donc le taux de minéralisation devrait augmenter après les bains de SBF 1,5.

En effet, après imprégnation dans trois bains successifs de SBF 1,5 d'une semaine chacun, le profil du diffractogramme (Fig. 6) indique la présence d'hydroxyapatite dans les matrices hybrides Coll/CHA(SBF) et Coll/SBF(SBF). Le taux de minéralisation dans ces deux matrices a donc beaucoup augmenté.

Ces deux échantillons sont caractérisés par des raies de diffraction avec une largeur à mi-hauteur très importante, indiquant une taille nanométrique des cristallites et/ou diverses substitutions (CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Cl^- , Na^+ ...) possibles dans le réseau apatitique. Il était difficile d'étudier plus finement la structure de la phase minérale dans ces échantillons avec l'équipement du laboratoire.

Ainsi en collaboration avec G. Renaudin et J.-M. Nedelec de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, dans le cadre du projet ANR-Nanoshap, nous avons pu déterminer la taille des cristallites de la phase minérale dans nos échantillons Coll/CHA(SBF) et Coll/SBF(SBF) à partir d'un affinement par la méthode de Rietveld de diffractogrammes enregistrés sur rayonnement synchrotron (Annexe). La difficulté d'obtenir du temps de faisceaux synchrotron ne nous a pas permis de vérifier la reproductibilité de ces résultats. Il faut donc considérer ces résultats avec les précautions nécessaires.

Nous devons d'abord remarquer que la seule phase détectée dans nos échantillons est l'apatite. Aucune phase contaminante ou précurseur n'a été détectée. Ceci montre que la présence de collagène ne semble pas influencer fortement la cinétique de formation de la phase minérale. Nous avons ensuite remarqué une différence importante de la taille des cristallites dans ces deux échantillons (Tab. 2). La taille des cristallites dans l'échantillon Coll/CHA(SBF) est beaucoup plus grande que celle obtenue dans Coll/SBF(SBF). Rappelons que ces matrices se différencient par la concentration et la nature des ions dans la solution initiale acide diluée de collagène (1 mg/mL). Il est important de noter que la morphologie et l'organisation 3D des fibrilles de collagène varient en fonction de la nature et la concentration des ions présents pendant la fibrillogénèse (Boedtker, 1956 & Gobeaux, 2008). Ainsi, les charges de surface résultantes des fibrilles de collagène peuvent également expliquer cette différence dans les échantillons Coll/CHA(SBF) et Coll/SBF(SBF). Plus de caractérisations sont donc nécessaires afin de trancher sur l'origine de la différence de la taille des cristallites dans les matrices hybrides.

Echantillons	Coll/CHA(SBF)	Coll/SBF(SBF)	CHApD
Taille des cristallites (HAp) (Å)			
– le long de l’axe hexagonal (00l)	250	100	220
– suivant le plan de base (hk0)	70	70	65

Tableau 2 : Résultat des affinements Rietveld des diffractogrammes des matrices hybrides : Coll/CHA(SBF) et Coll/SBF(SBF) et de la poudre CHApD.

Nous avons aussi comparé la taille des cristallites de l’échantillon d’apatite carbonatée en forme de plaquettes, obtenus sans matrice de collagène, décrit dans le chapitre II (Tab. 2). Les tailles de cristallites sont similaires dans Coll/CHA(SBF) et CHApD. Ceci indiquerait que les divers ions qui composent le SBF n’influencent pas la taille des cristallites dans les composés précipités à partir de la solution mère de CHApD, ce qui devrait être le cas lorsque l’apatite est coprecipité à partir du SBF. Il serait intéressant d’immerger CHApD dans SBF 1,5, afin de vérifier cette hypothèse. Les études d’environnement chimique du ^{31}P pourraient nous éclairer sur ce point.

1.2 Environnement chimique des sites phosphates de la phase minérale dans les matrices hybrides

La spectroscopie RMN à l’état solide s’avère être une technique intéressante pour caractériser les matrices hybrides, puisque cette méthode n’est pas limitée par la cristallinité de la phase étudiée. Intéressés par la nature de la phase minérale dans nos échantillons, nous avons sondé l’environnement chimique du phosphore par RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ MAS dans les matrices hybrides. D’abord, nous avons vérifié l’absence de phosphore dans une matrice de collagène (Coll) par acquisition d’un spectre RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ MAS. Avant les expériences RMN, nous avons essayé de nous affranchir au maximum de l’apatite ayant pu précipiter en surface des matrices qui ont été immergées dans la solution de SBF (cf plus loin dans le chapitre). Pour cela, nous avons gratté leurs surfaces avec une spatule. Les spectres RMN ^{31}P des échantillons Coll/CHA, Coll/CHA(SBF), Coll/SBF(SBF) et de l’os frais sont comparés sur la figure 7. L’échantillon Coll/SBF n’a pas pu être enregistré à cause de son trop faible taux de minéralisation (1% en masse). L’échantillon d’os frais est extrait d’os longs (sites métaphysaires ou diaphysaires) de brebis âgées de 2 ans. D’une manière générale, les spectres RMN relatif aux échantillons d’os frais sont enregistrés 2 h maximum après l’explantation.

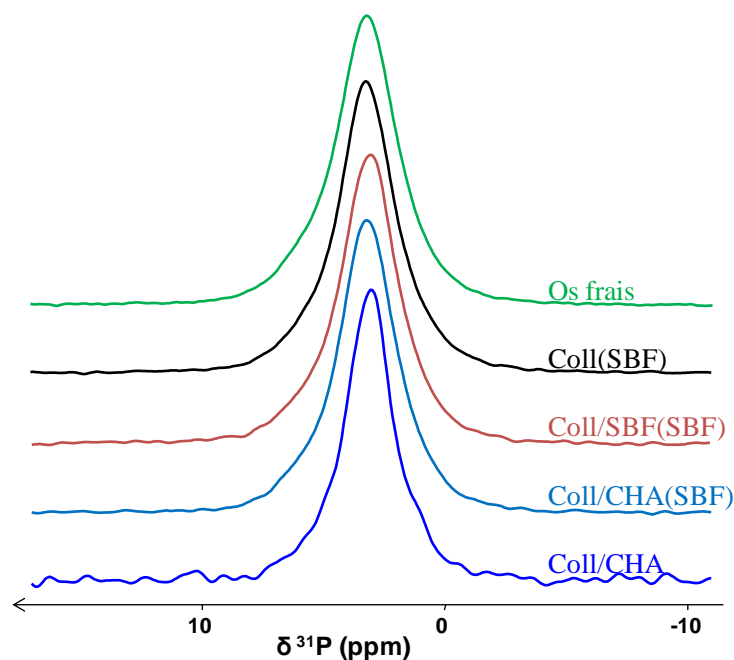
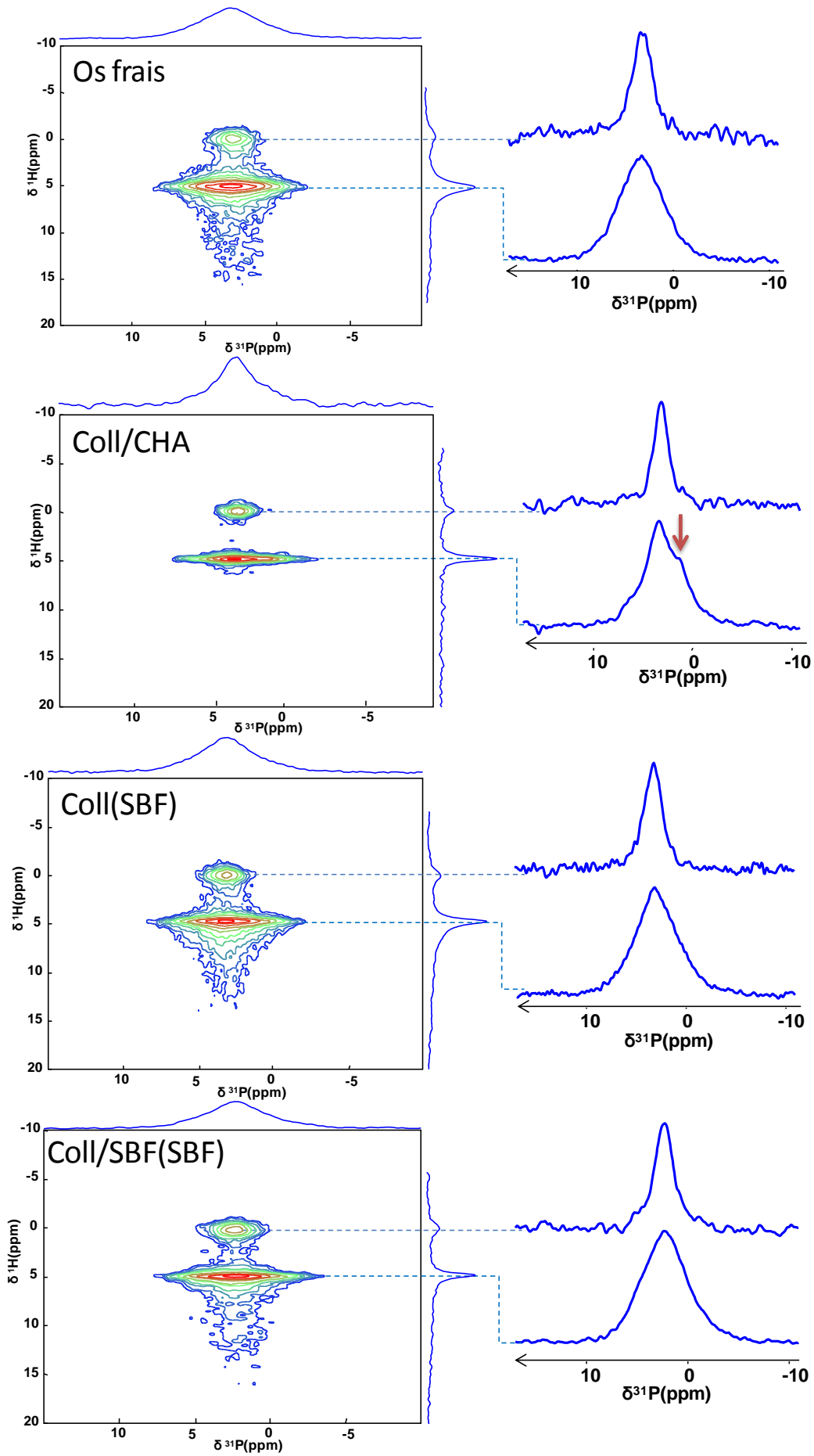


Figure 7: Spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ MAS des matrices hybrides et de l'os ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\gamma_{\text{MAS}} = 8 \text{ kHz}$)

Les spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ MAS présentent tous un seul signal centré à 3 ppm, qui est caractéristique de l'apatite. Il est intéressant de remarquer que la largeur à mi-hauteur du signal de l'os frais (340 Hz) est identique à celle des échantillons Coll/(SBF) (340 Hz), Coll/SBF(SBF) (340 Hz) et Coll/CHA(SBF) (340 Hz). En revanche, le signal ^{31}P de la matrice Coll/CHA est plus fin (260 Hz), ce qui suggère un meilleur ordre local des phosphates dans la phase minérale de cet échantillon. Cette étude confirme qu'aucune phase contaminante probable (brushite) ou intermédiaire (OCP) n'est présente dans les échantillons Coll(SBF), Coll/SBF(SBF) et Coll/CHA(SBF). En revanche, dans la matrice Coll/CHA, un faible épaulement est observé à 1,4 ppm qui semble indiquer la présence d'OCP en très faible quantité (~ 1%).

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la phase minérale des apatites carbonatées est composée de deux phases distinctes, un cœur apatitique et une couche externe amorphe. Une étude approfondie par des expériences de corrélation hétéronucléaire (HETCOR) ^1H - ^{31}P (Fig. 8), nous a apporté plus d'informations sur les différents environnements chimiques des sites P dans les phases respectives de chaque échantillon. Nous avons choisi un temps de contact de 1 ms afin de favoriser les signaux de la phase amorphe dont les protons possèdent un temps de relaxation $T_{1\rho}$ plus court que les hydroxyles de la phase apatitique.



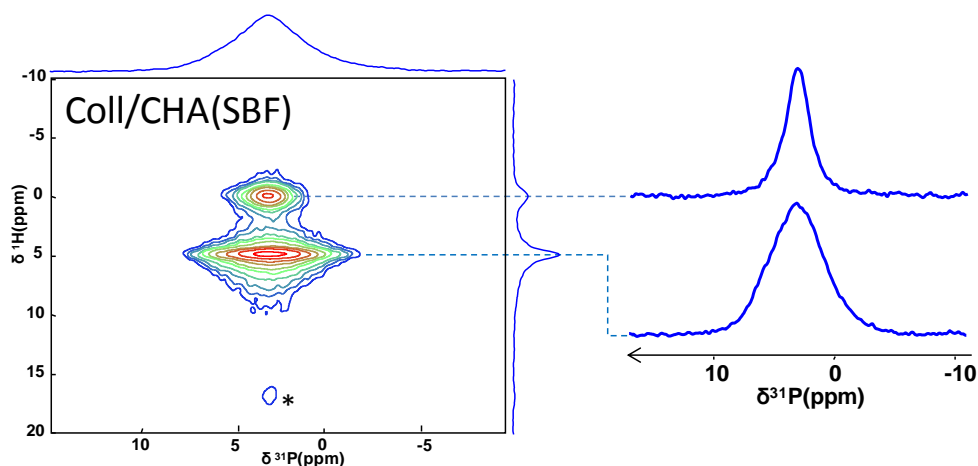


Figure 8 : Cartes ^1H - ^{31}P HETCOR des échantillons d'os frais, Coll/CHA, Coll(SBF), Coll/SBF(SBF) et Coll/CHA(SBF). Les tranches ^{31}P extraites correspondent à $\delta_{1\text{H}} = 0$ ppm et 4,9 ppm, ($B_0 = 7,05$ T ; $\nu_{\text{MAS}} = 8$ kHz (sauf Coll/CHA(SBF) $\nu_{\text{MAS}} = 5$ kHz) ; $t_{\text{cp1}} = 1$ ms) * : bande de rotation.

Sur tous les spectres RMN ^1H - ^{31}P HETCOR (Fig. 8), nous avons distingué deux types d'environnements chimiques pour le phosphore-31 : une tâche de corrélation entre les sites phosphate de la structure apatitique ($\delta_{31\text{P}} \sim 3$ ppm) et les ions hydroxyles de l'hydroxyapatite ($\delta_{1\text{H}} = 0$ ppm), et un autre signal de corrélation entre des ions phosphates et des protons de molécules d'eau sans doute fortement adsorbée à la surface des particules ($\delta_{1\text{H}} = 4,9$ ppm). En effet, tous les échantillons sont humides, puisque l'os et les matrices hybrides sont intacts lors de la caractérisation.

Echantillons	$\delta^{31}\text{P}$ (ppm)	FWHM (Hz)	$\delta^{31}\text{P}$ (ppm)	FWHM (Hz)
	$\pm 0,1$ ppm	± 20 kHz	$\pm 0,1$ ppm	± 20 kHz
	Phase d'apatite		Phase amorphe	
Os frais	2,9	270	3,1	660
Coll/CHA	3,1	200	3,0	490
Coll(SBF)	3,2	260	3,1	630
Coll/SBF(SBF)	3,0	270	3,2	660
Coll/CHA(SBF)	3,2	285	3,1	660
CHApD*	3,0	140	3,1	430

Tableau 3 : Déplacements chimiques et largeurs à mi-hauteur des tranches de corrélation extraites des spectres RMN ^1H - ^{31}P HETCOR correspondant à la phase d'apatite cristalline et la phase non-apatitique (*spectre enregistré avec 10 μL de l'eau doublement distillée).

Une analyse plus approfondie des spectres RMN ^1H - ^{31}P HETCOR (Tab. 3) montre, d'une façon générale, que la projection selon la voie ^{31}P à $\delta_{1\text{H}} = 0$ ppm présente un pic moins large et plus symétrique que celui à $\delta_{1\text{H}} = 4,9$ ppm, ce qui indique une distribution d'environnements chimiques moins importante pour les ions phosphates dans la phase d'apatite que dans la couche amorphe hydratée externe.

En comparant les spectres ^{31}P projetés des échantillons d'os frais, de Coll(SBF), de Coll/SBF(SBF) et de Coll/CHA(SBF) (Tab. 3), nous avons remarqué que leur largeur à mi-hauteur correspondant, respectivement, à la phase apatitique (~ 270 Hz) et à la phase hydratée (~ 650 Hz) sont comparables. Ceci montre que les environnements locaux dans la phase minérale de l'os sont similaires à ceux trouvés dans les matrices hybrides Coll(SBF), Coll/SBF(SBF) et Coll/CHA(SBF).

Il est intéressant de rappeler que dans les études RMN du noyau ^{31}P effectuées sur les apatites précipitées sans collagène, présentées dans le chapitre II, nous avons observé une grande similitude entre les signaux ^{31}P de l'apatite précipitée à partir d'une solution SBF 1,5 (CHApSBF) et celui de l'apatite biologique.

Ceci laisse supposer que même si la charge en minéral est très différente dans ces trois matrices avant l'imprégnation dans la solution de SBF 1,5, les précurseurs ioniques qui alimentent la phase minérale de ces matrices proviennent majoritairement ou exclusivement des solutions SBF 1,5. Et l'analogie entre les matrices hybrides et l'os frais est probablement dû à la nature « biomimétique » des précipitations formées à partir de la solution SBF 1,5. Néanmoins, ces conclusions contredisent les résultats précédents obtenus par affinement Rietveld (Tableau 2) qui indiquait que le SBF n'avait pas d'impact sur la taille des cristallites. On peut donc se demander si ces résultats ne sont pas dus essentiellement à la présence résiduelle d'une couche d'apatite, en surface des matrices, précipité à partir du SBF 1,5. D'autres expériences doivent être menées plus précautionneusement afin d'éclaircir ce point.

En revanche, concernant la matrice Coll/CHA (Fig. 8), les largeurs à mi-hauteur des tranches correspondant à la phase apatitique (200 Hz) et à la phase amorphe (490 Hz) sont un peu moins larges que celle des autres matrices hybrides. Ceci pourrait provenir du fait que la variété d'ions disponibles pour les substitutions est moins importante que dans le cas du SBF. Ceci semble impliquer une plus grande cristallinité de la phase apatitique et une variété d'environnements chimiques moins grande dans la phase amorphe pour Coll/CHA.

La tranche extraite du spectre HETCOR à $\delta_{1\text{H}} = 4,9$ ppm indique une contamination par de l'OCP dans la matrice ($\delta_{31\text{P}} = 1,4$ ppm, indiqué par une flèche rouge dans la Fig. 8). Sur le spectre RMN MAS $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ quantitatif de cet échantillon (Fig. 7), cette phase contaminante n'est présente qu'en très faible quantité (1%). De plus, la phase d'OCP n'a été détectée qu'une seule fois sur trois échantillons différents. Nous avons déjà observé de l'OCP lors de la synthèse de l'apatite CHApD (qui a inspiré la solution mère de la matrice Coll/CHA)

lorsque la durée d'exposition aux vapeurs d'ammoniac n'était pas respectée. Donc, la présence d'OCP dans la matrice Coll/CHA est peut-être due à une durée trop courte d'exposition sous vapeur d'ammoniac de la matrice.

Comme nous l'avons dit précédemment, l'apatite de la matrice Coll/CHA est formée à partir des mêmes précurseurs ioniques, mais 2,4 fois moins concentrés que CHApD. De plus, pour la matrice Coll/CHA, la précipitation des cristaux d'apatite et la fibrillogénèse du collagène ont lieu simultanément. Le dépôt des particules se fait donc dans les espaces confinés existant entre les molécules de collagène. Ainsi nous avons voulu étudier un possible impact de la matrice de collagène lors de la formation des particules d'apatite.

Pour que les échantillons de la matrice humide Coll/CHA et l'apatite CHApD, soient dans les mêmes conditions d'enregistrement, nous avons ajouté 10 μL d'eau doublement distillée dans l'échantillon CHApD avant l'acquisition de ses spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ et $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ HETCOR (Fig. 9, Fig. 10).

Nous avons d'abord comparé la largeur à mi-hauteur des spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ MAS de ces deux échantillons (Fig. 9). Celle-ci est plus importante pour CHA (FWHM = 200 Hz) que pour Coll/CHA (FWHM = 270 Hz).

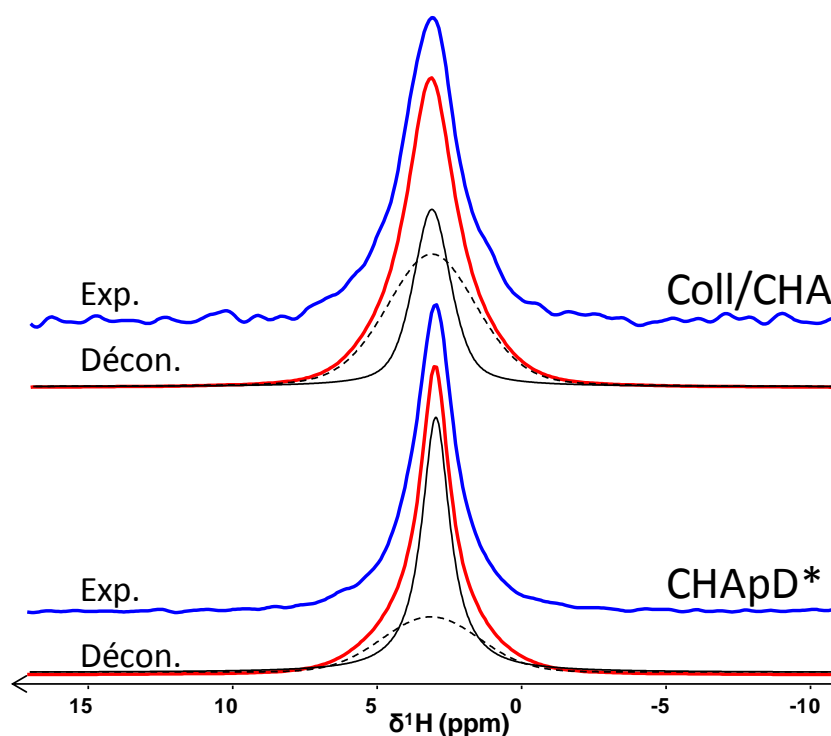


Figure 9 : Spectres RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ des échantillons Coll/CHA et CHApD* mouillée ; déconvolution des spectres expérimentaux (rouge) à l'aide des tranches extraites des spectres HETCOR correspondant à la phase d'apatite (ligne noir) et à la phase amorphe (ligne noire pointillée) ; * 10 μL d'eau doublement distillée ajoutée dans le rotor avant l'enregistrement du spectre ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 8 \text{ kHz}$)

Nous avons ensuite comparé les spectres ^1H - ^{31}P HETCOR relatifs aux deux échantillons (Fig. 8 et Fig. 10). La carte ^1H - ^{31}P HETCOR de l'apatite CHApD mouillée est similaire à celle de Coll/CHA(SBF), elle possède aussi deux types d'environnements chimiques pour le phosphore-31 : un signal correspondant à la phase apatitique et une corrélation entre des ions phosphates et des protons de molécules d'eau sans doute fortement adsorbée à la surface des particules ($\delta_{1\text{H}} = 4,9$ ppm). Nous constatons que des signaux d'hydrogénophosphates distribués entre 5 ppm et 17 ppm selon la dimension ^1H dans l'échantillon d'apatite CHApD sec (Chapitre II, Partie III, 3.2) ne sont pas détectés, la disparition de ces signaux peut être due, soit au fait que le pic intense de l'eau moyenne ces signaux de faible intensité, soit à un échange chimique rapide entre les ^1H de la couche amorphe et l'eau ajoutée.

Nous avons noté que la tranche ^{31}P correspondant à la phase apatitique de la matrice Coll/CHA est plus large (FWHM = 200 Hz) que celle de l'apatite CHApD (FWHM = 140 Hz). Le même élargissement était observé pour les sites phosphate dans la couche amorphe externe (490 Hz vs 430 Hz).

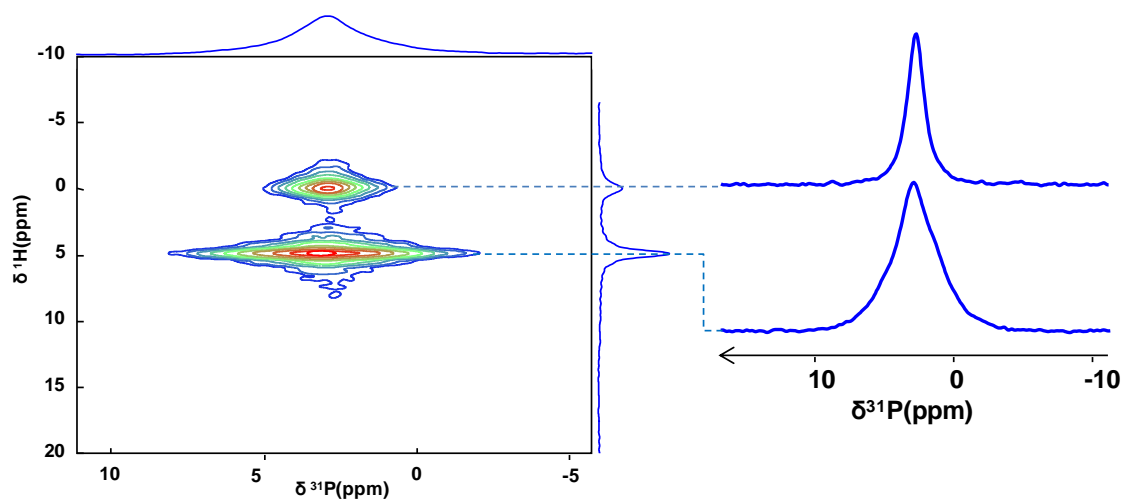


Figure 10 : Cartes ^1H - ^{31}P HETCOR d'apatite CHApD* avec 10 μL d'eau doublement distillée. Les tranches ^{31}P extraites correspondent à $\delta_{1\text{H}} = 0$ ppm et 4,9 ppm, ($B_0 = 7,05$ T ; $\nu_{\text{MAS}} = 8$ kHz ; $t_{\text{cp1}} = 10$ ms)

Après déconvolution des spectres $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ quantitatifs à l'aide des tranches extraites des spectres ^1H - ^{31}P HETCOR (Fig. 9), nous avons constaté que la phase amorphe est plus importante dans la phase minérale de l'échantillon Coll/CHA (61%) que dans l'échantillon CHApD (33%). Ainsi, une quantité plus importante de la phase amorphe dans la phase minérale de la matrice Coll/CHA peut être reliée à un effet de confinement de la matrice de

collagène qui aurait limité la croissance des particules et diminué leur taille par rapport à une précipitation sans matrice. En effet, si les nanoparticules de la phase minérale dans l'échantillon Coll/CHA sont plus petites, leur surface spécifique est plus grande et la phase amorphe de la couche externe peut être proportionnellement plus importante.

Ainsi, l'impact de la matrice de collagène lors la précipitation de la phase minérale est mise en évidence par RMN. La matrice de collagène a bien un effet sur l'environnement chimique des phosphates du cœur apatitique et de la couche externe amorphe. De plus, ces hypothèses seront vérifiées par des observations par MET (Chapitre III, Partie III, 2.1)

1.3 Les phases minérales intermédiaires de l'apatite après co-précipitation

Sur les clichés de MEB (Fig. 11) des matrices de Coll/CHA, nous avons observé des particules sphériques dont le diamètre varie de 200 nm à 1 μ m, à la surface et à l'intérieur des matrices. Elles sont, soit regroupées en amas en général à la surface de la matrice (Fig. 11A,B,D&E), soit dispersées entre les fibrilles de collagène dans des domaines où l'espace interfibrillaire paraît large (Fig. 11C&F et Fig.12A) . Il est donc possible que ces particules se forment dans des espaces non confinés. Néanmoins, sachant que la technique de préparation des échantillons pour l'observation par MEB a nécessité des étapes de fixation chimique et un séchage au CO₂ supercritique, et que la phase minérale dans les matrices hybrides évolue en permanence, il est difficile de conclure si ces particules sphériques correspondent à des artefacts dus aux traitements des échantillons ou à une phase intermédiaire. Nous avons vérifié la composition de ces particules sphériques par EDX sans quantification. Les résultats montrent que ces particules sont, riches en phosphate et en calcium. Elles ont aussi été observées dans l'échantillon Coll/SBF (Fig. 12A) mais en moins grande quantité que dans la matrice Coll/CHA. Sachant que la quantité d'ions calcium et phosphate initialement ajoutés dans la solution acide de collagène pour la matrice hybride Coll/CHA est beaucoup plus importante que pour l'échantillon Coll/SBF (20 fois pour Ca ; 10x pour P ; 3x pour C), ces résultats semblent cohérents.

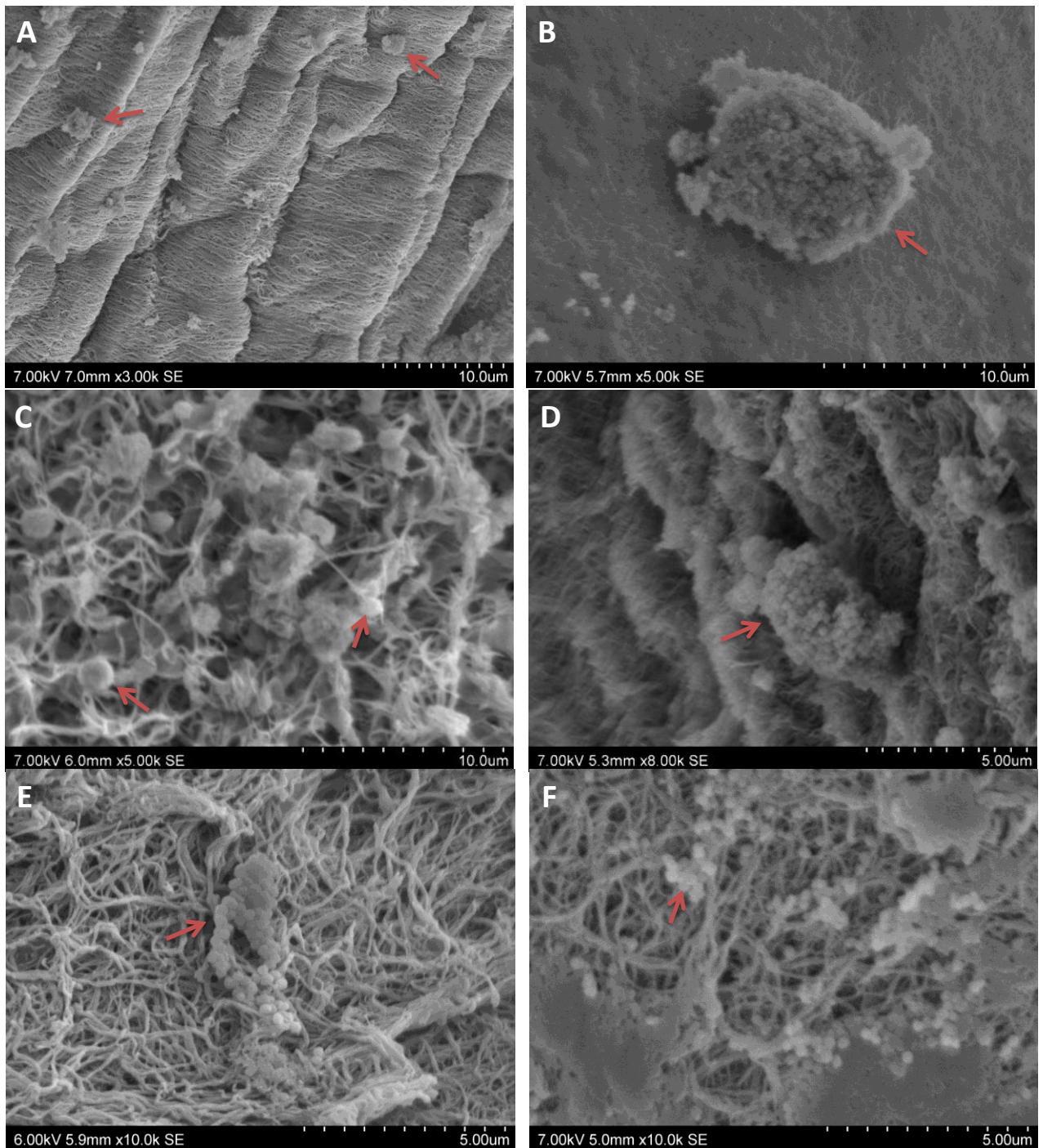


Figure 11 : Clichés de MEB de l'échantillon Coll/CHA après la co-précipitation, les sphères minérales sont indiquées par les flèches rouges.

La forme spécifique de ces particules nous rappelle celle décrite pour la phase amorphe (ACP, Amorphous Calcium Phosphate) qui est une des phases intermédiaires la plus souvent évoquée dans la littérature (Eanes, 1970 & Dorozhkin, 2010). Cette phase est souvent reportée sous forme de petites particules sphériques qui peuvent former des agrégats pouvant atteindre un diamètre de 200-500 nm (Mahamid, 2010). Ceci serait cohérent avec celui

observé ici (~300 nm). Néanmoins, la similitude morphologique entre la phase observée et la phase d'ACP n'est pas suffisante pour prouver la nature de la phase observée.

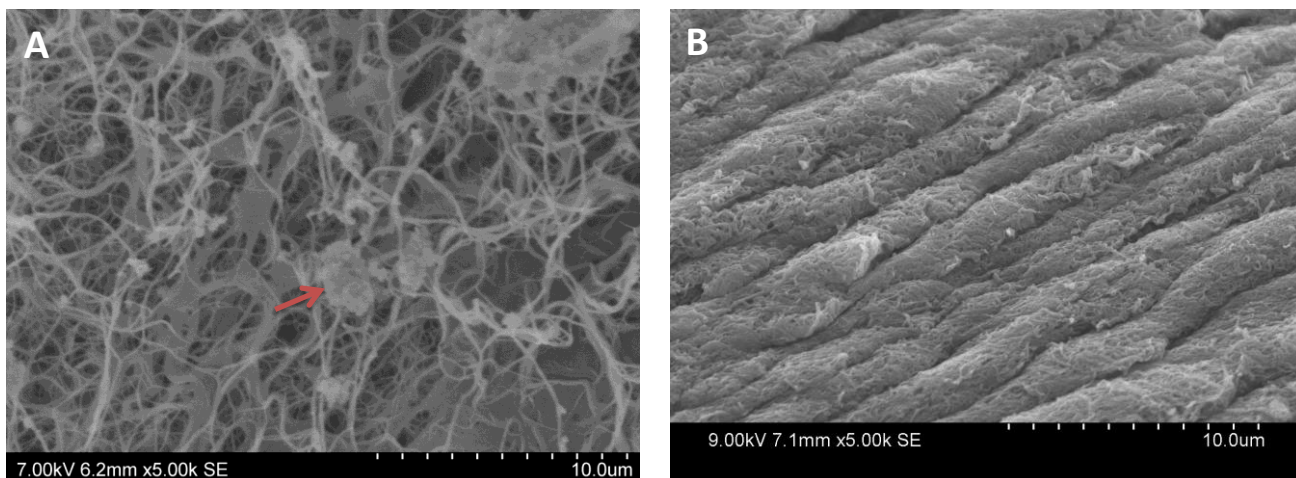


Figure 12 : Clichés de MEB de l'échantillon Coll/SBF

Il est possible qu'une étape de dissolution/recristallisation de la phase minérale dans les matrices hybrides Coll/CHA et Coll/SBF ait lieu pendant la préparation des échantillons pour la MEB. Donc il faut considérer les résultats de MEB et MET avec les précautions nécessaires.

1.4 Mise en évidence et quantification de la substitution en ions carbonates dans la phase minérale des matrices hybrides

Nous avons souligné précédemment le rôle important de l'os dans l'activité métabolique des organismes grâce aux substitutions présentes dans la phase minérale de l'os. L'importance de recréer les mêmes types de substitutions dans la phase d'apatite *in vitro* est indispensable dans l'élaboration d'une matrice dite « mimétique » du tissu osseux. La substitution la plus importante dans les apatites biologiques osseuses est la substitution par les ions carbonates, même si les autres substitutions (Mg^{2+} , F^- ...) jouent un rôle majeur pour le fonctionnement de l'organisme (métabolisme, stockage des ions). C'est la raison pour laquelle, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de la substitution par les ions carbonates.

Nous avons indiqué précédemment, dans le chapitre II, que dans l'os, la principale substitution en carbonate est de type B (Rey, 1989). Les autres substitutions à savoir les types

A et AB ainsi que les autres substitutions métastables en carbonates (les carbonates dans des sites « amorphe ») sont minoritaires dans l'os (Griffin 1990).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'échantillon Coll/CHA dans lequel la matrice de collagène a bien un effet sur la nature des cristaux d'apatite mis en évidence par la comparaison de la phase minérale de Coll/CHA et de l'apatite CHApD par l'étude RMN du ^{31}P . Nous avons à notre disposition deux méthodes d'analyse pour identifier la substitution par les ions carbonates : l'IR et la RMN à l'état solide. Néanmoins, la matrice hybride Coll/CHA contient environ 80% d'eau en masse et la bande IR due à l'absorption de l'eau dont l'intensité est trop importante recouvre des bandes assignées aux carbonates. En plus, à cause du faible taux de minéralisation (8% en masse) dans cette matrice et de la faible abondance naturelle du carbone-13, l'enregistrement d'un spectre RMN- ^{13}C avec un rapport signal/bruit correct est trop coûteux en temps d'expérience. Nous nous sommes donc dirigés vers une autre technique d'analyse proposée dans la littérature par Mkukuma *et al.* (Mkukuma, 2004) basée sur l'analyse thermogravimétrique. En effet, par traitement thermique jusqu'à 600°C, on réalise la déshydratation et la décomposition de la matière organique (Robinson, 1957). Par traitement au dessus de 600°C, nous pouvons nous affranchir de la phase organique et isoler la phase minérale. Ainsi nous avons traité thermiquement la matrice hybride Coll/CHA jusqu'à 600°C afin de récupérer la phase minérale. Cette phase minérale est comparée par IR à celle de l'os calciné à 600°C (Fig. 13).

En comparant les spectres IR de l'os avant et après calcination, un affinement des bandes d'absorption dues aux groupements PO_4 indique que la phase minérale est plus cristalline (Nawrot, 1976) après la calcination à 600°C (Fig. 13). Même si le traitement thermique reste modéré, il a bien un effet sur la phase minérale des échantillons. En supposant que la phase minérale des deux échantillons, l'os et Coll/CHA, évolue de la même manière pendant le traitement thermique, nous avons comparé leur spectre IR après calcination, et plus spécifiquement dans les domaines de vibration du mode ν_2 (900 à 850 cm^{-1}) et ν_3 (1600 à 1350 cm^{-1}) des groupements carbonates (Fig. 14).

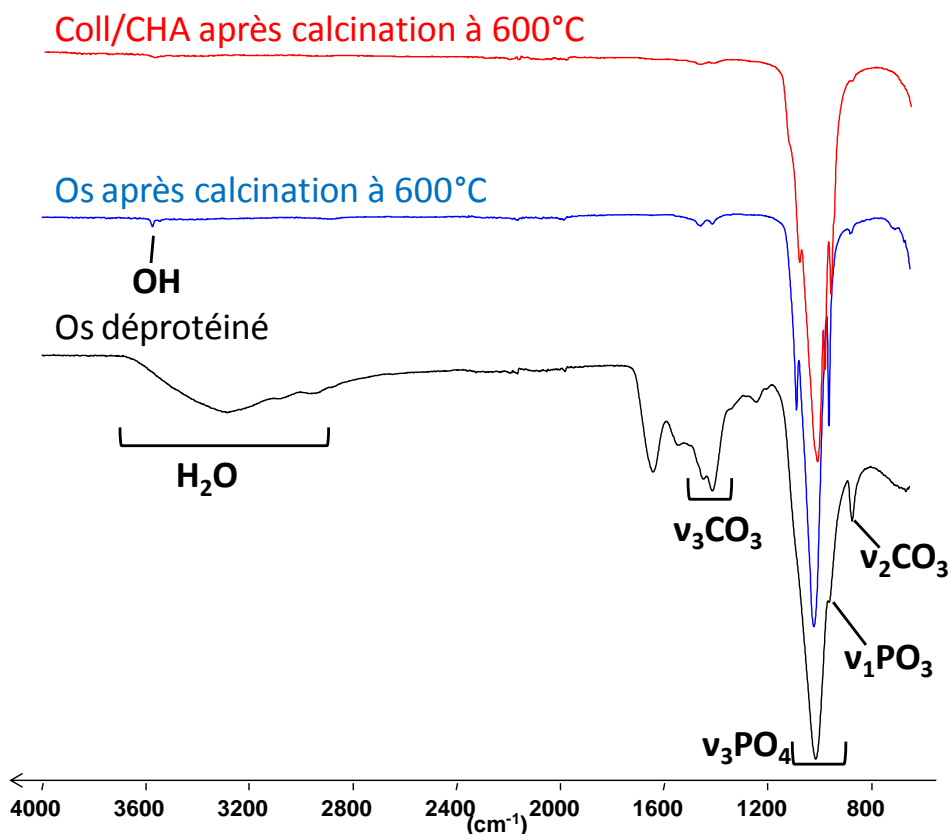


Figure 13 : Spectres IR de l'os et de l'échantillon Coll/CHA après calcination au-dessus de 600°C et de l'os déprotéiné

A cause de la faible quantité d'échantillon récupéré après calcination, la qualité des spectres IR n'est pas optimale, mais nous avons réussi à identifier les bandes de vibration des ions carbonates. Dans la région du mode v_3 des carbonates, les bandes correspondant aux substitutions de type B (1412 cm^{-1}) et AB (1452 cm^{-1}) ont été identifiées dans les deux échantillons, celles de l'os étant plus fines que celles de Coll/CHA. Ceci semble indiquer que les ions carbonates se trouvent dans des sites mieux définis dans l'os. Les bandes d'adsorption dues à la substitution de type A (879 cm^{-1}) et B (873 cm^{-1}) sont aussi présentes dans la région du mode v_2 . Toutes ces similarités dans la gamme de vibrations des bandes relatives aux carbonates entre l'os et Coll/CHA, suggèrent que la nature de la substitution par les ions carbonates est relativement similaire dans ces deux échantillons. Après imprégnation de l'échantillon Coll/CHA dans la solution SBF 1,5, nommé Coll/CHA(SBF), la phase minérale évolue vers une phase d'apatite plus proche de la phase minérale de l'os.

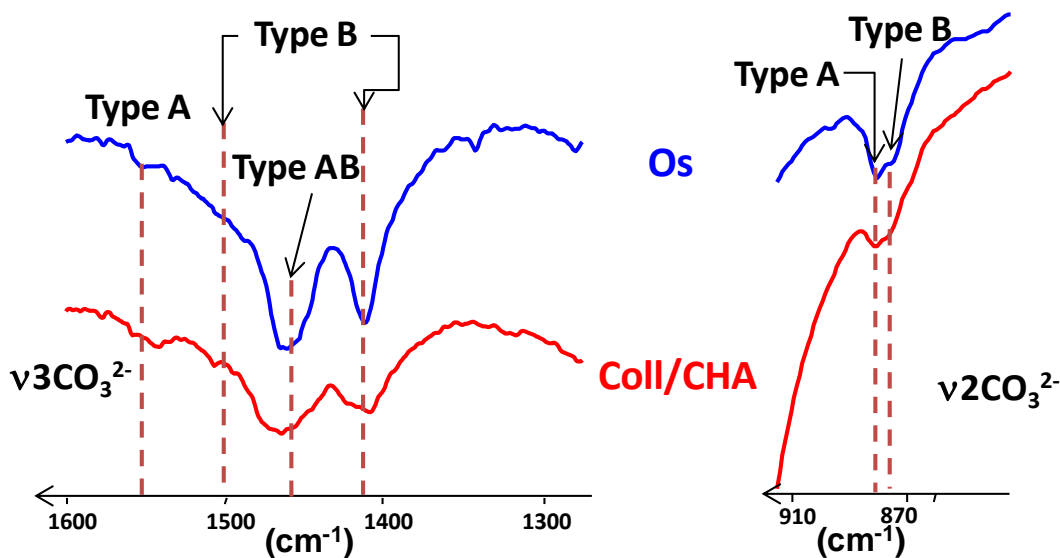


Figure 14: Spectres IR de l'os et de la matrice Coll/CHA après calcination à 600°C dans les domaines des modes de vibration des carbonates

2. Relations spatiales entre la matrice de collagène et la phase minérale

Après avoir caractérisé la phase minérale dans les matrices hybrides après la co-précipitation (Echantillons Coll/CHA et Coll/SBF) et après l'imprégnation dans la solution SBF 1,5 (Echantillons Coll(SBF), Coll/CHA(SBF) et Coll/SBF(SBF)), nous nous sommes intéressés aux relations spatiales entre phase minérale et organique notamment en étudiant l'influence des précurseurs ioniques sur la fibrillogénèse de collagène et la répartition des cristaux d'apatite dans la matrice du collagène.

2.1 Caractérisations des fibrilles de collagène et de la nucléation/croissance de l'apatite

Avant de caractériser à l'échelle nanométrique les matrices de collagène, nous avons comparé l'aspect de ces matrices à l'œil nu (Fig. 15) en prenant en compte que l'opacité d'une matrice de collagène augmente avec sa concentration en collagène, la force ionique de la solution (Gross, 1958) et la présence d'une phase minérale.

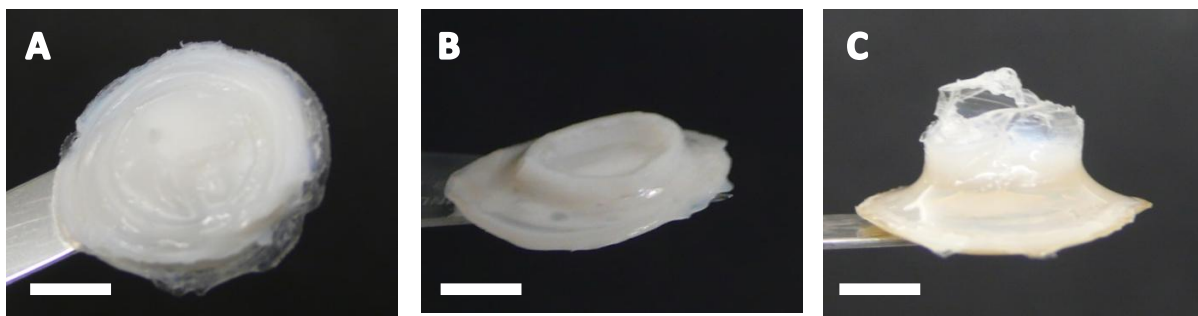


Figure 15 : Photos des matrices de Coll/CHA (A), de Coll/SBF (B) et Coll (C) après fibrillogénèse, barre d'échelle = 0,5 cm

Nous avons noté que pour la même quantité de collagène injecté (30 mL à 1mg/mL) et à même concentration finale (~ 250 mg/mL), les matrices de collagène n'ont pas le même volume, ni la même couleur après fibrillogénèse. Les matrices Coll/CHA (Fig. 15A) et Coll/SBF (Fig. 15B) sont moins translucides et volumineuses que la matrice Coll (Fig. 15C). Ceci doit être lié à la présence des ions dans les deux premières matrices, qui grâce aux interactions électrostatiques rapprochent les fibrilles de collagène (Gross, 1958). Nous avons aussi remarqué qu'à même force ionique, la matrice Coll/CHA nous paraît légèrement moins volumineuse que Coll/SBF. Cette différence est probablement due à la différence de nature des ions présents dans les matrices (Tab. 1), qui aurait un effet sur l'interaction entre les fibrilles de collagène, mais aussi sur la morphologie des fibrilles comme évoqué précédemment dans ce chapitre.

L'observation de coupes ultrafines (~ 80 nm ici) par microscopie électronique à transmission (MET) des matrices hybrides après co-précipitation nous donne un aperçu sur la nature de ces matrices, principalement en termes de morphologie et d'organisation des fibrilles. Certaines coupes n'ont pas été contrastées pour éviter la formation d'artefacts qui pourraient fausser notre interprétation notamment sur les échantillons les moins minéralisés.

Sur la coupe MET de l'échantillon de référence, qui est la matrice de collagène non minéralisée Coll (Fig. 16A), l'espace interfibrillaire est petit, les fibrilles de collagène sont contiguës. Les fibrilles sont striées ce qui démontre que la fibrillogénèse a été induite correctement. Ces striations correspondant à la périodicité axiale de 67 nm (la distance D) sont un bon indicateur d'orientation des fibrilles. Nous avons noté que les fibrilles dont le diamètre est d'environ 160 nm sont soit parallèles (indiqué par les barres), soit perpendiculaire au plan d'observation (indiqué par les points). Ceci correspond à une

organisation en « contre-plaqué » (à angle droit) des fibrilles de collagène. Cette organisation est observée sur une grande partie de l'échantillon (10 μm).

La matrice Coll/SBF (Fig. 16B) présente également des fibrilles striées de taille homogène (environ 160 nm de diamètre). L'orientation des fibrilles est cependant aléatoire et l'espace interfibrillaire est plus important. Dans la matrice Coll/CHA (Fig. 16C), les fibrilles sont contiguës, et les striations transversales des fibrilles montrent une orientation structurale uniaxiale de la matrice dans la région observée.

Nous avons constaté qu'à même force ionique, la morphologie, la distance interfibrillaire et donc l'organisation des fibrilles de collagène variaient en fonction de la nature des précurseurs ioniques présents dans la solution.

Gobeaux *et al.* (Gobeaux, 2008) ont observé qu'à une force ionique fixée avec du NaCl proche de notre valeur expérimentale, les fibrilles de collagène ont une longueur de 3~4 μm et un diamètre de 60~180 nm. La taille des fibrilles de collagène dans nos échantillons est plus homogène. Ceci est probablement lié aux conditions de préparation et la nature des précurseurs ioniques qui dans notre cas sont plus proches de ce qui est décrit *in vivo*. Nous avons observé aussi que dans la matrice Coll/SBF, l'espace interfibrillaire est plus important que dans la matrice Coll/CHA. Une étude complémentaire paraît utile afin d'étudier la porosité au sein de l'espace interfibrillaire des matrices hybrides, elle n'a pas pu être réalisée pendant le travail de thèse.

Aucune plaquette d'apatite n'est observée sur les clichés de MET de la matrice Coll/SBF (Fig. 16B). En revanche, nous avons observé des particules de très petite taille (diamètre < 10 nm) sur une coupe de la matrice Coll/CHA (Fig. 16c). Ces nanoparticules sont, soit concentrées localement dans des zones d'environ 200 nm de diamètre (flèche rouge) rappelant une distribution dans les zones de gap (Jackson 1957), soit alignées (flèche blanche) rappelant une distribution interfibrillaire. Notons que 200 nm est proche du diamètre d'une fibrille. De plus, la périodicité axiale de 67 nm des fibrilles de collagène est parfois visible, ce qui est aussi une preuve indirecte de la présence de la phase minérale dans les zones de gap (Glimcher 1960 & Traub 1989). Malencontreusement, aucun cliché n'a pu être pris de cette observation à cause de l'instabilité des coupes sous le faisceau.

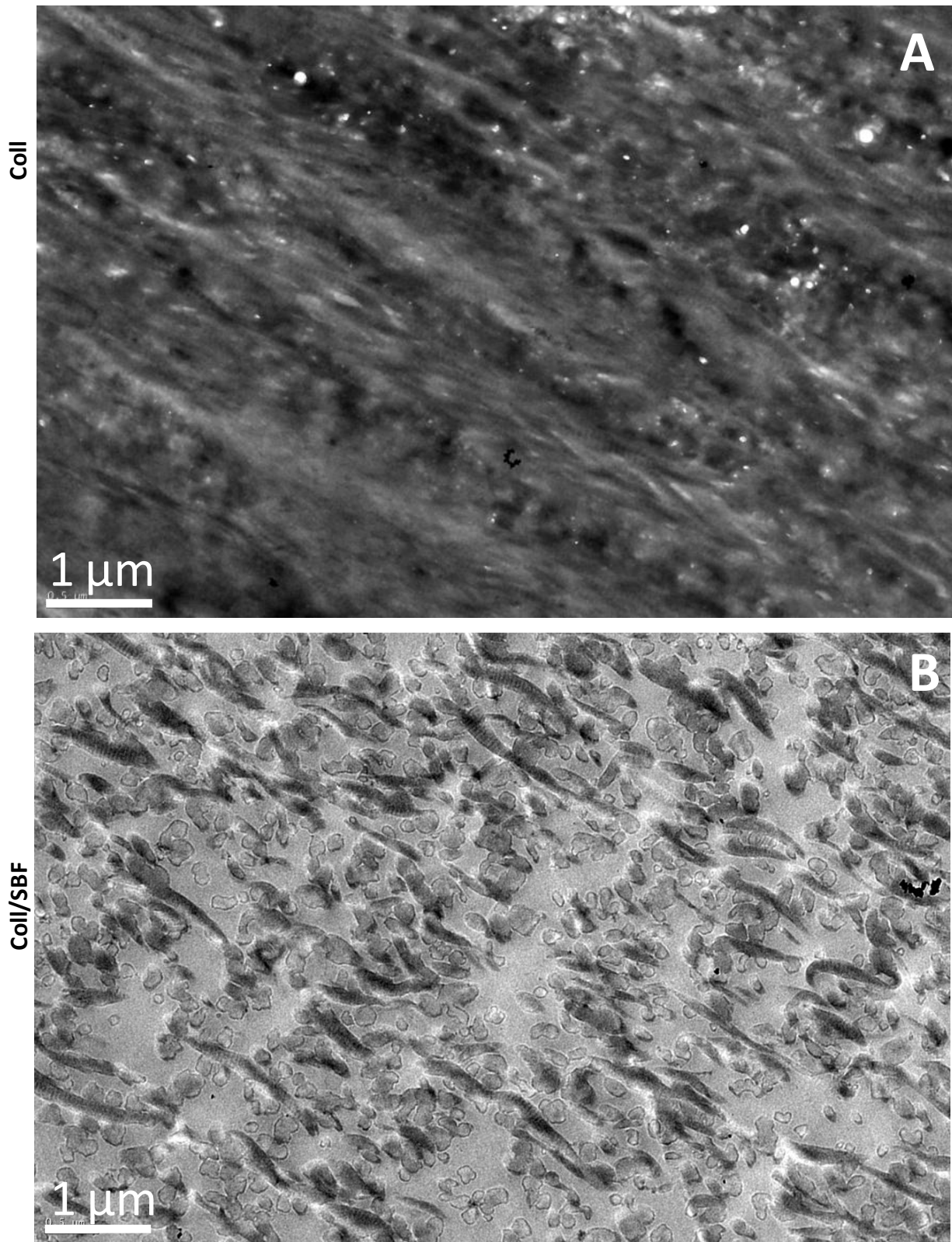


Figure 16 : Influence des ions sur la structure des matrices de collagène. Clichés de MET: A, Coll; B, Coll/SBF. A, B sont contrastées avec de l'acétate d'uranyle

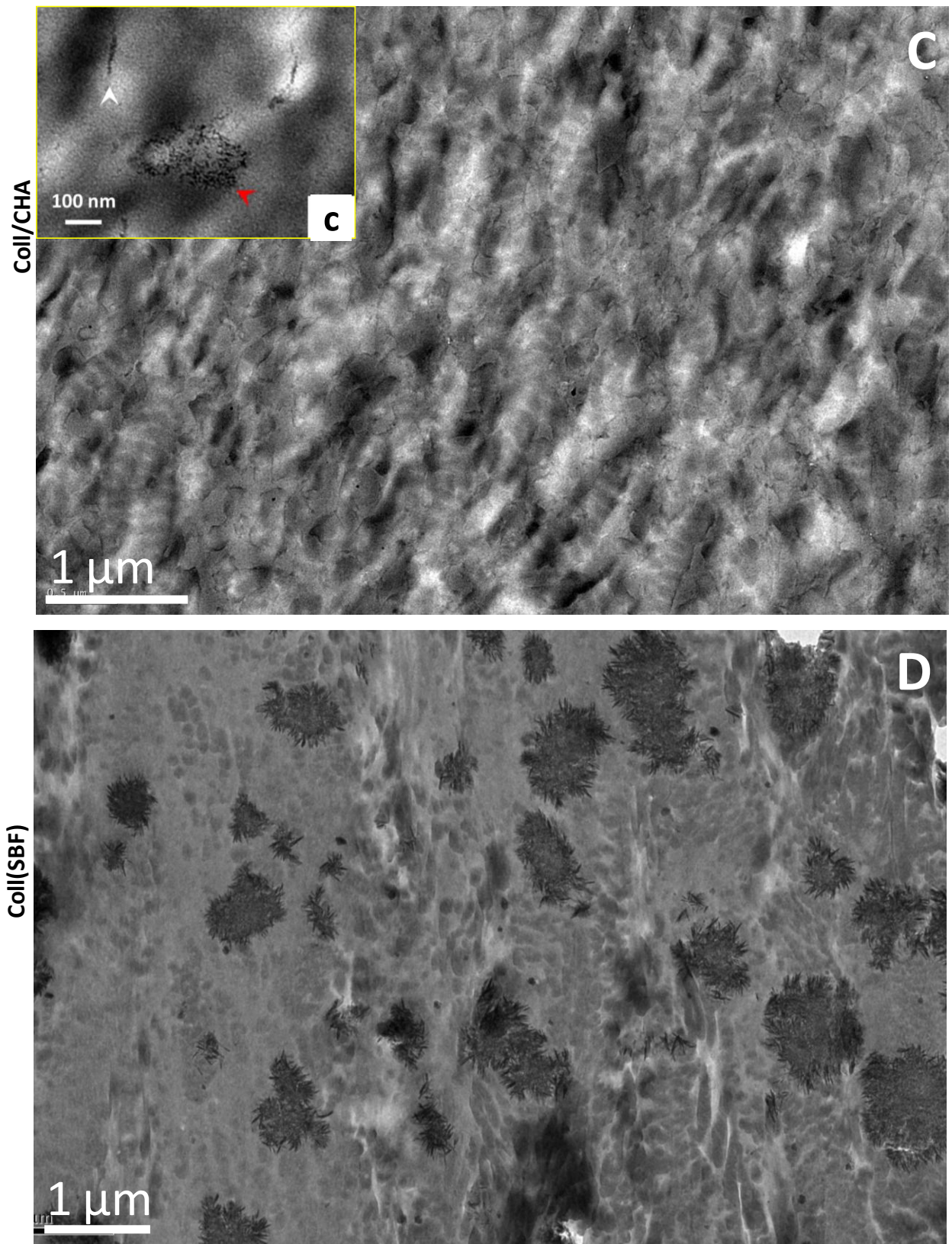


Figure 16 : Influence des ions sur la structure des matrices de collagène. Clichés de MET: C, Coll/CHA; c, Coll/CHA ; D, Coll(SBF). C est contrastée avec de l'acétate d'uranyle

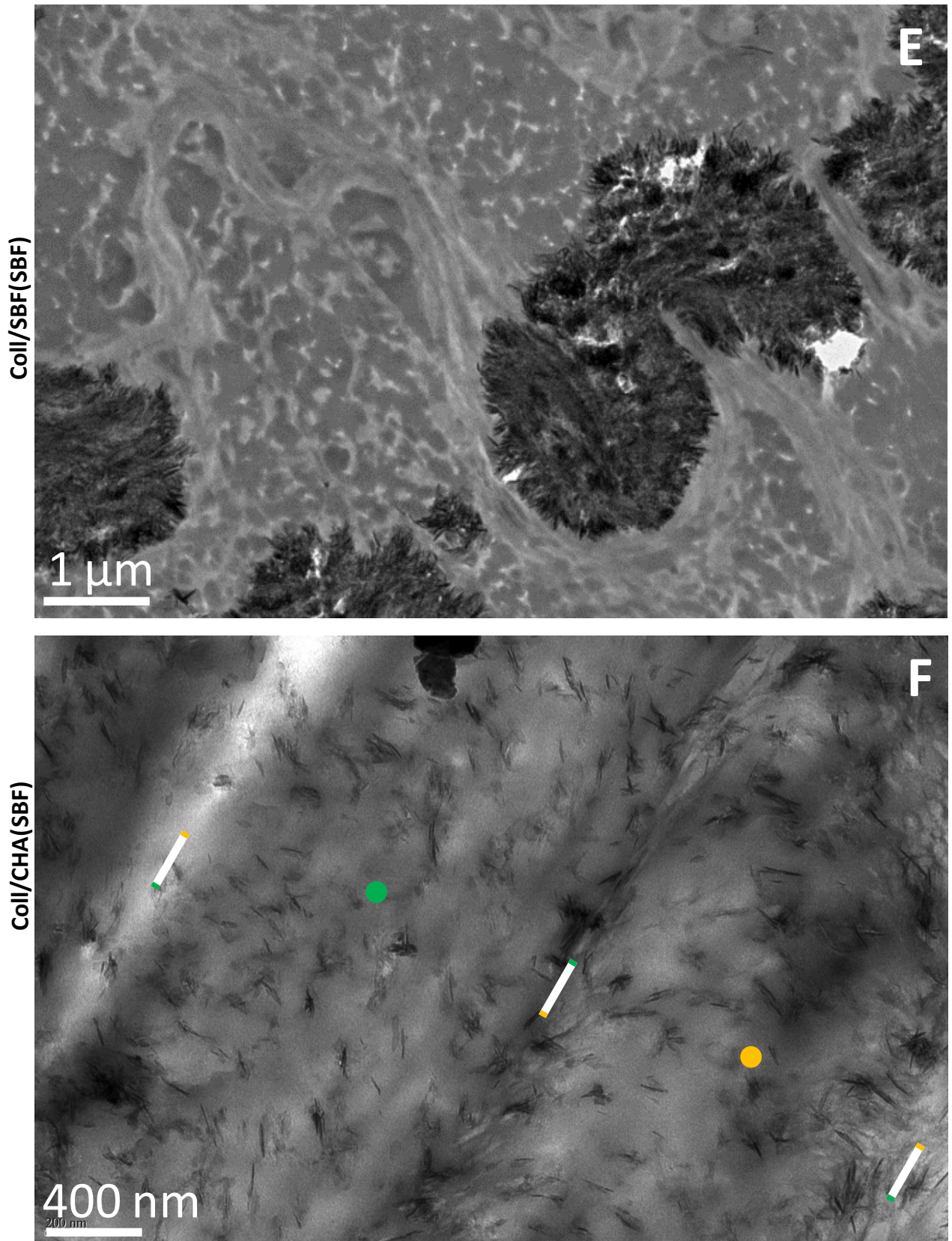
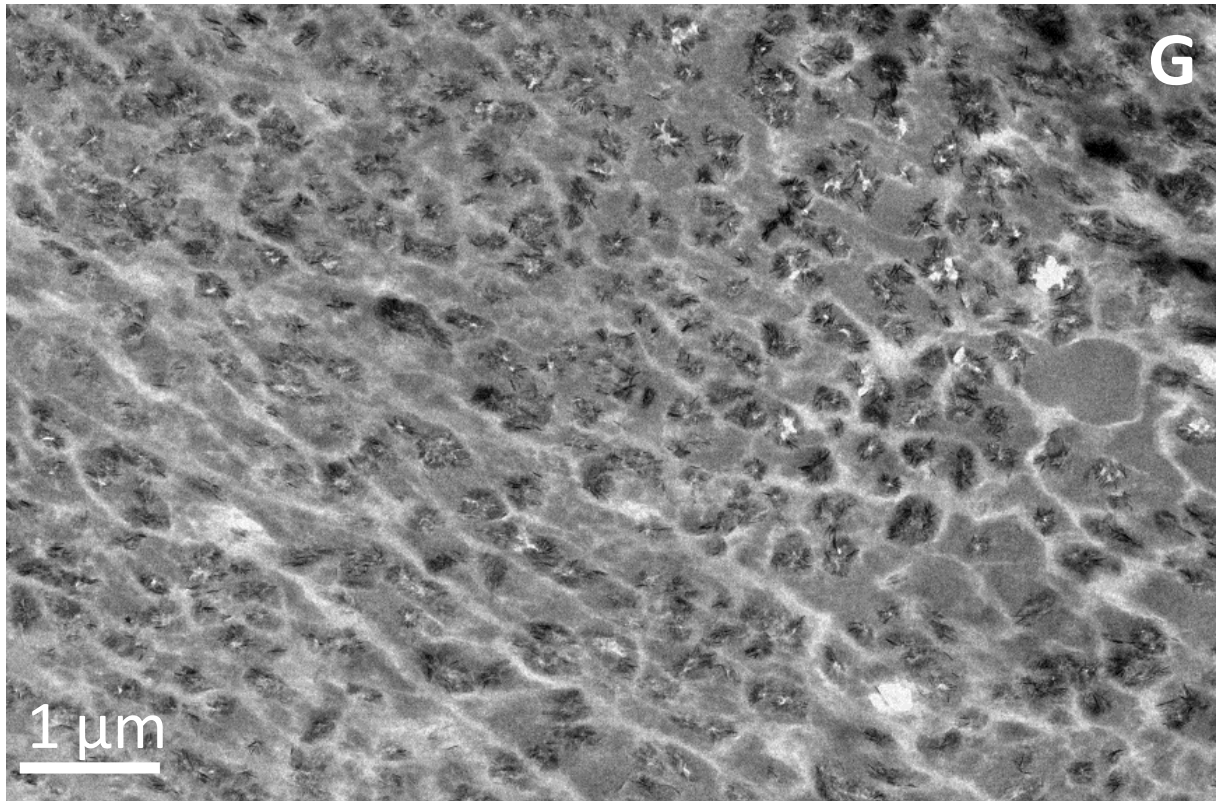


Figure 16 : Influence des ions sur la structure des matrices de collagène. Clichés de MET: E, Coll/SBF(SBF); F, Coll/CHA(SBF).

Coll/CHA(SBF)



Coll/CHA(SBF)

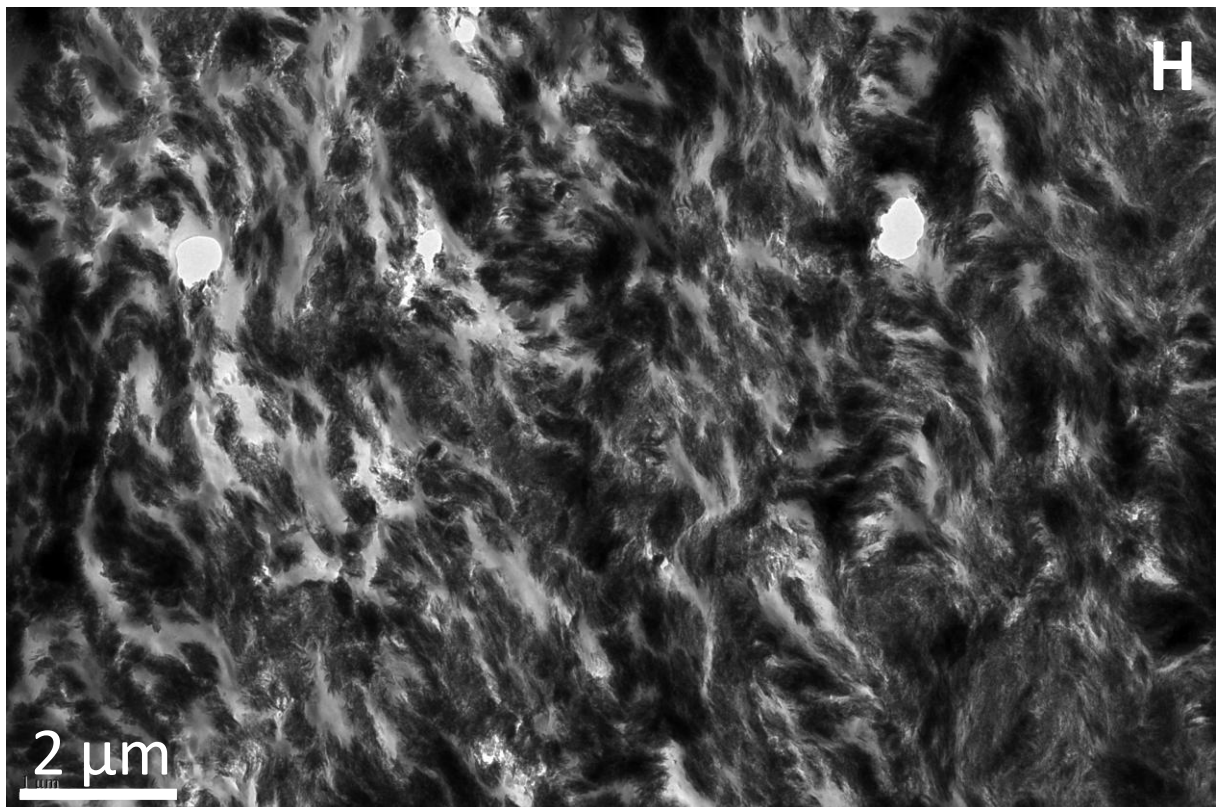


Figure 16: Influence des ions sur la structure des matrices de collagène. Clichés de MET: G, H, Coll/CHA(SBF).

Après imprégnation des matrices dans les solutions de SBF 1,5, des sphérolites d'apatite sont observés dans les matrices Coll(SBF) et Coll/SBF(SBF) (Fig. 16D&E) rappellent ceux formés par nucléation homogène en absence de matrice de collagène (Nassif 2010B). Ceci laisse supposer que le même mécanisme de précipitation de l'apatite a lieu dans ces matrices dans l'espace interfibrillaire. Il est intéressant de noter que la taille et la distribution des sphérolites sont différentes dans ces deux matrices malgré la même durée d'imprégnation. Les sphérolites dans Coll(SBF) sont plus petits et plus nombreux que dans Coll/SBF(SBF). Cette différence est peut-être due à la différence de charges de surface dans ces deux matrices qui entraînerait une vitesse de diffusion des ions différente entre les deux matrices.

Après l'imprégnation dans les bains SBF 1,5, la phase minérale est répartie différemment dans la matrice Coll/CHA(SBF) (Fig. 16F,G&H). On n'observe pas des sphérolites comme dans les deux échantillons précédents. De plus, une différence importante de la quantité de minéral est observée entre la périphérie (Fig. 16H) et le cœur de la matrice (Fig. 16F,G). Cette observation peut s'expliquer par le fait que la précipitation d'apatite à partir de la solution SBF 1,5 est plus rapide que la vitesse de diffusion des ions au sein de la matrice.

Sur la figure 16F de la matrice hybride Coll/CHA(SBF), les plaquettes d'apatite semblent former des arceaux indiquant que les plaquettes d'apatite pourraient suivre la trame organique formée par les fibrilles de collagène. Cette observation est confirmée en Fig. 17A. L'observation d'une coupe selon un plan transverse aux fibrilles de collagène (Fig. 16G), permet de distinguer plus clairement les espace inter et intrafibrillaires. Les plaquettes d'apatite sont localisées principalement au cœur des fibrilles indiquant une minéralisation intrafibrillaire bien que l'on soit en absence de NCPs. Ce cliché rappelle celui des travaux de Glimcher (Glimcher 1959) effectués sur la minéralisation d'arête de poisson (Annexe). Sur le cliché 16H, les fibrilles minéralisées semblent être parfois alignées localement. Néanmoins, des domaines isotropes y sont aussi observés. La coexistence de tels domaines rappellent l'hétérogénéité du tissu osseux (Glimcher 2006).

Nous avons démontré qu'à même force ionique, l'organisation 3D des fibrilles de collagène dans les matrices hybrides Coll/CHA (plus concentrée en ions calcium, phosphates et carbonates) et Coll/SBF varie en fonction de la nature des ions présents pendant la fibrillogénèse. Cette observation est cohérente avec les travaux de la littérature montrant que

les ions interagissent avec les fibrilles de collagène, notamment les ions calcium qui pourraient jouer le rôle de « ponts » entre fibrilles (Cohen-Solal 1981, Glimcher 1984 & Fantner 2005). De plus, les sites de nucléation formés après la co-précipitation dans ces deux matrices ne semblent pas identiques. La MET nous a surtout permis de mettre en évidence une répartition différente de la phase minérale dans ces deux matrices après l'imprégnation dans la solution SBF 1,5. Dans la matrice Coll/CHA(SBF), les cristaux d'apatite se répartissent sur l'ensemble de la matrice organique. Ceci semble lié à la présence des ions pendant la concentration de la solution mère de collagène. Les précurseurs ioniques pourraient être piégés et/ou concentrés dans les sites de nucléation de collagène. Ensuite ces premiers points de nucléation se forment pendant la fibrillogénèse dans l'espace intra et/ou interfibrillaire de la matrice de collagène. Cette première phase d'apatite (vérifié par RMN) continue à croître et à se développer grâce aux ions provenant de la solution SBF 1,5.

Les précurseurs ioniques sont également présents dans l'échantillon Coll/SBF pendant la co-précipitation de la matrice hybride, mais moins concentrés en calcium, phosphates et carbonates que dans Coll/CHA. Ainsi, nous pouvons supposer que la quantité de précurseurs de la phase apatitique dans Coll/SBF est moins importante dans les espaces décrits comme les premiers sites de nucléation, les zones de gap. Il est possible qu'il n'y ait qu'un nombre très faible de sites de nucléation où la concentration en ions soit supérieure à la concentration critique pour précipiter l'hydroxyapatite. Ainsi, la nucléation de l'apatite s'effectue lors de l'imprégnation dans la solution SBF 1,5 par nucléation homogène comme c'est le cas pour Coll. Notons qu'il serait alors cohérent d'observer partiellement des plaquettes précipitées par nucléation hétérogène au sein des échantillons Coll/SBF(SBF). Ceci est difficile à contrôler avec une technique aussi locale.

Ces résultats mettent en avant l'importance de la dynamique et de la force ionique lors de la mise en place de la matrice.

2.2 Orientation des plaquettes d'apatite avec les fibrilles de collagène

Une caractéristique importante de l'os est le co-alignement de l'axe *c* des cristaux d'apatite avec l'axe principal des fibrilles de collagène (Robinson 1952). Afin de vérifier ce co-alignement de la phase minérale avec les fibrilles de collagène, nous avons utilisé différentes méthodes de caractérisation telles que le MET, la diffraction électronique et la

DRX aux grands angles en transmission. Nous avons focalisé notre étude sur la matrice Coll/CHA(SBF), puisque l'organisation tridimensionnelle du réseau fibrillaire et la répartition du minéral semblent mimer au mieux l'organisation décrite dans le tissu osseux.

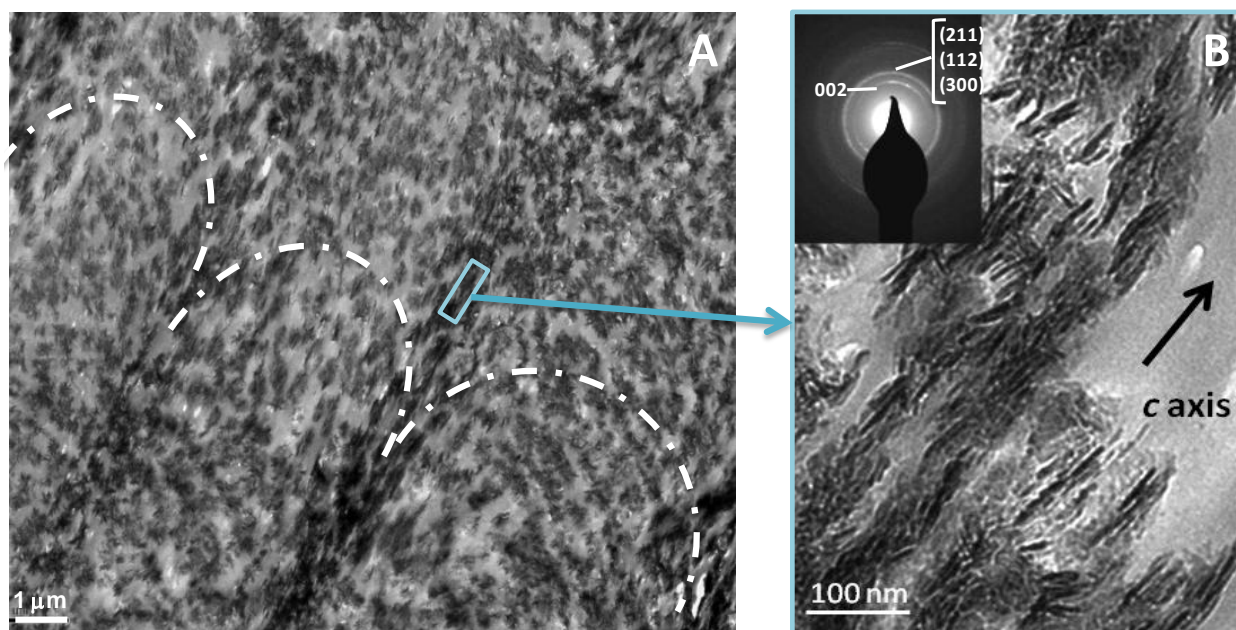


Figure 17: Clichés de MET de la matrice Coll/CHA(SBF) révélant une structure en arceaux (A) ainsi que le co-alignement des cristaux d'apatite vérifié par diffraction électronique (B)

Sur le cliché de MET (Fig. 17A), correspondant à une coupe oblique de la matrice Coll/CHA(SBF) sans contrastant, une association étroite entre le collagène et la phase minérale est observée. Les cristaux d'apatite sont présents à l'intérieur de la matrice. Une observation plus précise de la coupe (Fig. 17B) montre que les plaquettes d'apatite sont parallèles selon une seule orientation. Par diffraction électronique, nous avons observé une direction préférentielle de l'organisation des cristaux d'apatite selon l'axe c , qui est indiquée par le renforcement des signaux de diffraction correspondant au plan (002). Ceci nous permet de mettre en évidence l'impact des fibrilles de collagène sur la distribution et l'orientation des cristaux d'apatite.

Nous avons voulu aussi vérifier ce co-alignement entre cristaux d'apatite et la matrice de collagène dans l'échantillon Coll/CHA(SBF) à plus grande échelle par WAXD (Fig. 18). Nous avons pu mettre en évidence également sur une plage proche de 100 μm (taille du faisceau RX) une direction préférentielle d'organisation des cristaux d'apatite selon le plan (002) (marqué par les flèches rouges), par rapport à l'axe principale des fibrilles de collagène.

Nous avons pu également observer le pic correspond à la distance longitudinale des fibrilles de collagène. La distance latérale correspondant à la distance entre deux molécules de collagène dans une fibrille de collagène aurait pu nous indiquer l'organisation des fibrilles de collagène par rapport à la direction préférentielle d'organisation des cristaux d'apatite. Mais ce signal n'a pas été observé à cause de la présence du beam stop. Nous n'avons donc pas pu obtenir de preuve directe de l'association des fibrilles de collagène et des cristaux d'apatite. Il semble néanmoins cohérent que la direction préférentielle d'organisation des cristaux d'apatite qui, dans les synthèses en solution forment des sphérolites, soit due à l'association des cristaux d'apatite avec l'axe principal des fibrilles de collagène comme cela est décrit dans l'os.

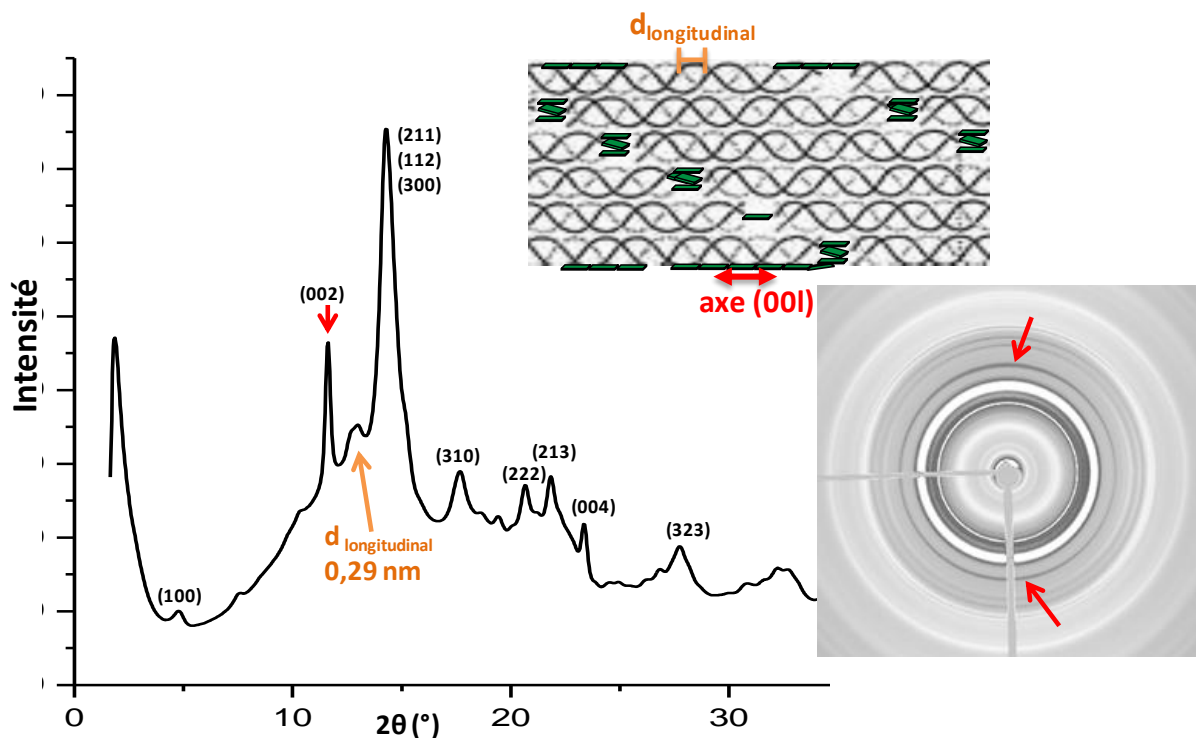


Figure 18: Schéma d'association des cristaux d'apatite avec les molécules de collagène ; signal de diffusion aux grands angles recueilli sur plaque photosensible et profil correspondant obtenu en sommant les intensités sur 360° de la matrice Coll/CHA(SBF) (Molybdène $\lambda=0,07093$ nm)

Selon différents travaux dans la littérature, l'orientation préférentielle de l'apatite est décrite comme étant le résultat de son interaction spécifique avec le collagène (Silver, 2011) ou avec des protéines non-collagéniques (He, 2004) présentes dans la matrice extracellulaire. Dans de nombreux modèles *in vitro* proposés dans la littérature, les protéines non-collagéniques ou des polymères acides synthétiques (PolyAsp (Bradt, 1999 & Gower, 2008),

PolyGlu (Chen, 2005)) sont utilisés afin de réaliser ce co-alignement entre le collagène et la phase minérale. Ici, la présence seule de la matrice de collagène est suffisante pour réaliser cette « distribution » du minéral au sein de la matrice de collagène.

2.3 Minéralisation intra et interfibrillaire

La relation entre phase organique et minérale de tissu osseux n'est toujours pas bien comprise en termes de composition chimique et aussi au niveau mécanistique. Il est suggéré par la plupart des chercheurs que la majorité des cristaux d'apatite se trouve dans les fibrilles de collagène puisque les nucléations ont lieu dans l'espace intrafibrillaire (Glimcher 1968, Traub 1989 & Landis 1993). Certains ont mis en évidence des sites de nucléation des cristaux d'apatite à la surface des fibrilles (Nylen 1960, Landis 1996 & Hellmich 2002). La compréhension de cette association unique entre les fibrilles de collagène et les plaquettes d'apatite dans le tissu osseux est indispensable pour les études de minéralisation. Nous avons démontré précédemment la similarité d'association de phases collagène/minérale entre le tissu osseux et notre matrice Coll/CHA(SBF) par les clichés de MET. Mais il est important d'indiquer que pendant la préparation des grilles pour la MET, même si aucun contrastant n'a été utilisé, la fixation et la déshydratation des échantillons peuvent modifier l'association entre phases organique et minérale des échantillons. Afin de vérifier que l'organisation de la phase minérale dans la matrice hybride n'est pas causée par la préparation des échantillons, il est plus pertinent d'utiliser des méthodes sans traitement. Les cryo-méthodes sont alors bien adaptées à nos besoins. Il existe diverses cryo-méthodes, comme la cryo-MET, la cryo-Fracture, la cryo-Substitution, etc (Leforestier, 1991). Il est aussi possible de réaliser des coupes avec la cryo-Ultramicrotomie. Notre matrice présente une nouvelle texture, donc le cryo-traitement reste à mettre au point. Comme la cryo-Ultramicrotomie n'est pas une technique courante et très demandeuse en temps compte tenu de nos types d'échantillons, nous avons choisi deux autres cryo-méthodes qui sont plus économes en temps de préparation : la cryo-Fracture et la cryo- MET.

La méthode de cryo-Fracture consiste à préparer des répliques en platine des faces fracturées au sein de l'échantillon. Les répliques peuvent ainsi donner des informations tridimensionnelles de la face fracturée. Nos coupes préparées par cryo-Fracture ont été réalisées à la Plate Forme de Microscopie Electronique de l'Institut Fédératif de Recherche de Biologie Intégrative à UPMC avec l'aide de Mme Ghislaine Frébourg. L'échantillon

Coll/CHA(SBF) est la seule matrice préparée par cette méthode. L'échantillon a été fracturé transversalement et verticalement afin de vérifier s'il y a une différence d'organisation selon la direction de la concentration (Fig. 19). Nous n'avons pas observé de différence entre les coupes transversales et longitudinales.

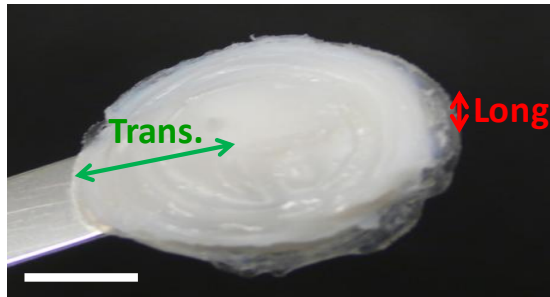


Figure 19 : Préparation de l'échantillon par cryo-Fracture selon deux directions (Barre d'échelle = 5 mm)

Les clichés de MET des répliques de l'échantillon (Fig. 20) sont très différentes des observations précédentes réalisées sur des coupes fines de l'échantillon. Ici, la phase minérale et les fibrilles de collagène se distinguent uniquement par leur forme spécifique : les cristaux en forme de plaquette nanométrique pour la phase minérale et des cylindres d'environ 170 nm de diamètre pour les fibrilles de collagène.

A faible grossissement (Fig. 20A), nous avons observé une organisation 3D des fibrilles de collagène ; à plus fort grossissement (Fig. 20C), des rainures sont observées le long des fibrilles de collagène pouvant correspondre à la tranche des plaquettes d'apatite. Ceci semble confirmer l'association étroite entre ces deux phases. Sur le cliché 20D, nous avons observé des surfaces lisses qui semblent être dues à un défaut de préparation et non à une absence de phase minérale au sein ou à la surface des fibrilles. Par contre, sur les clichés de la figure 20B, aucune fibrille n'est observée, ce qui correspond probablement à un dépôt de minéral à la surface des échantillons ce qui sera confirmé par les observations en MEB (Fig.22, 24).

Ces observations des répliques de l'échantillon Coll/CHA(SBF) apparaissent très complexes, néanmoins, elles semblent confirmer que l'organisation de la phase minérale est liée aux fibrilles de collagène. Aucune preuve ne peut confirmer la présence de la minéralisation intrafibrillaire dans cette matrice hybride. Nous n'avons pas pu estimer la taille d'un cristal d'apatite à partir de ces clichés de MET compte tenu de la difficulté d'interpréter de telles observations.

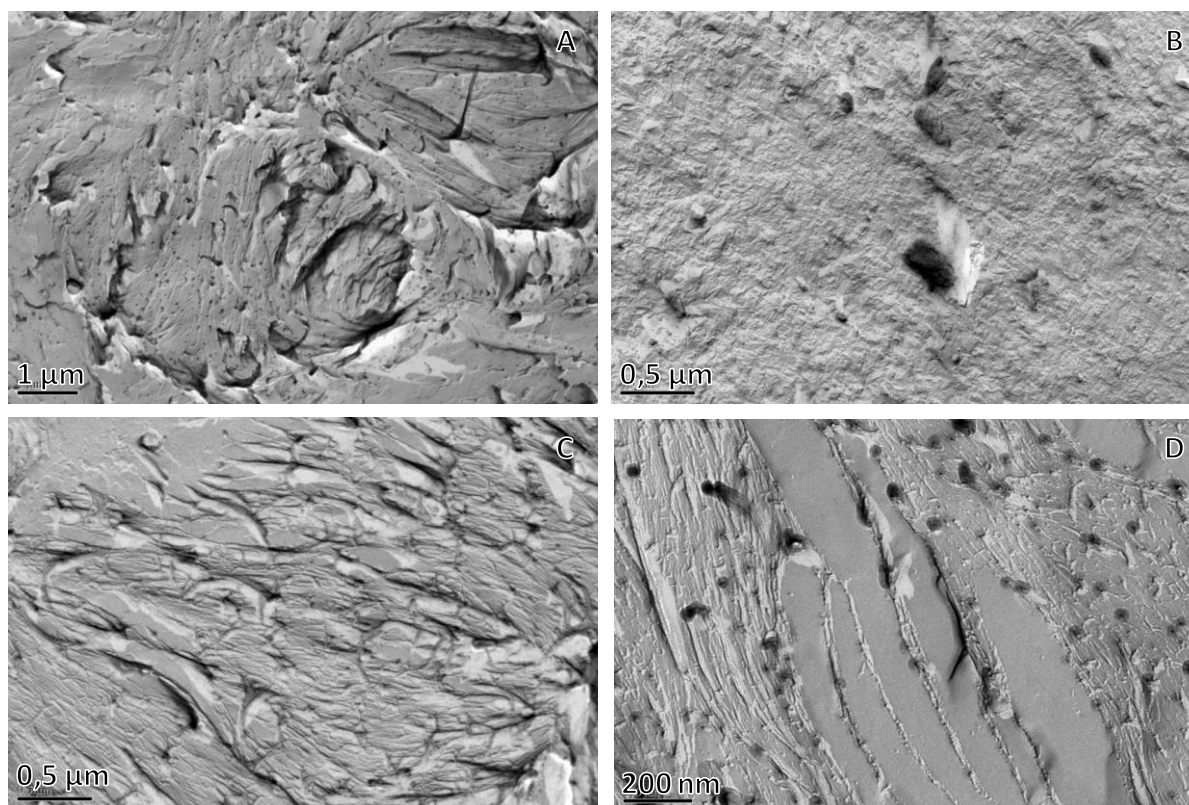


Figure 20 : Clichés des répliques de l'échantillon Coll/CHA(SBF) préparées par Cryo-Fracture

L'échantillon Coll/CHA(SBF) a aussi été observé par une méthode de cryo-MET (Fig. 21) à l'Institut Pasteur en collaboration avec M. Gérard Pehau Arnaudet.

L'échantillon a été ici cryo-broyé, puis mis en suspension dans une solution de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) avant d'être déposé sur les grilles de MET et congelé pour l'observation par Cryo-MET. Grâce au cryo-broyage, le réseau 3D des fibrilles de collagène a été détruit et celles-ci se dispersent dans la solution PBS ce qui permet d'en observer individuellement.

Les différents degrés de minéralisation ont été observés. Sur les fibrilles de collagène non-minéralisées (Fig. 21A), les striations transversales des fibrilles observées indiquent que les fibrilles de collagène n'ont pas été dénaturées pendant la préparation pour la cryo-MET. Le diamètre des fibrilles est d'environ 200 nm. Cette valeur est cohérente avec l'observation précédente par MET puisqu'ici rappelons-le l'échantillon est hydraté. Dans la même matrice hybride Coll/CHA(SBF), nous avons observé des fibrilles de collagène avec un taux de minéralisation plus élevé (Fig. 21C&D), sachant que la striation transversale des fibrilles disparaît avec l'augmentation de degré de minéralisation (Nudelman 2010). Ce résultat

montre que la minéralisation a bien eu lieu dans l'espace intrafibrillaire de collagène. Ces observations confirment aussi l'hétérogénéité du taux de minéralisation au sein de la même matrice.

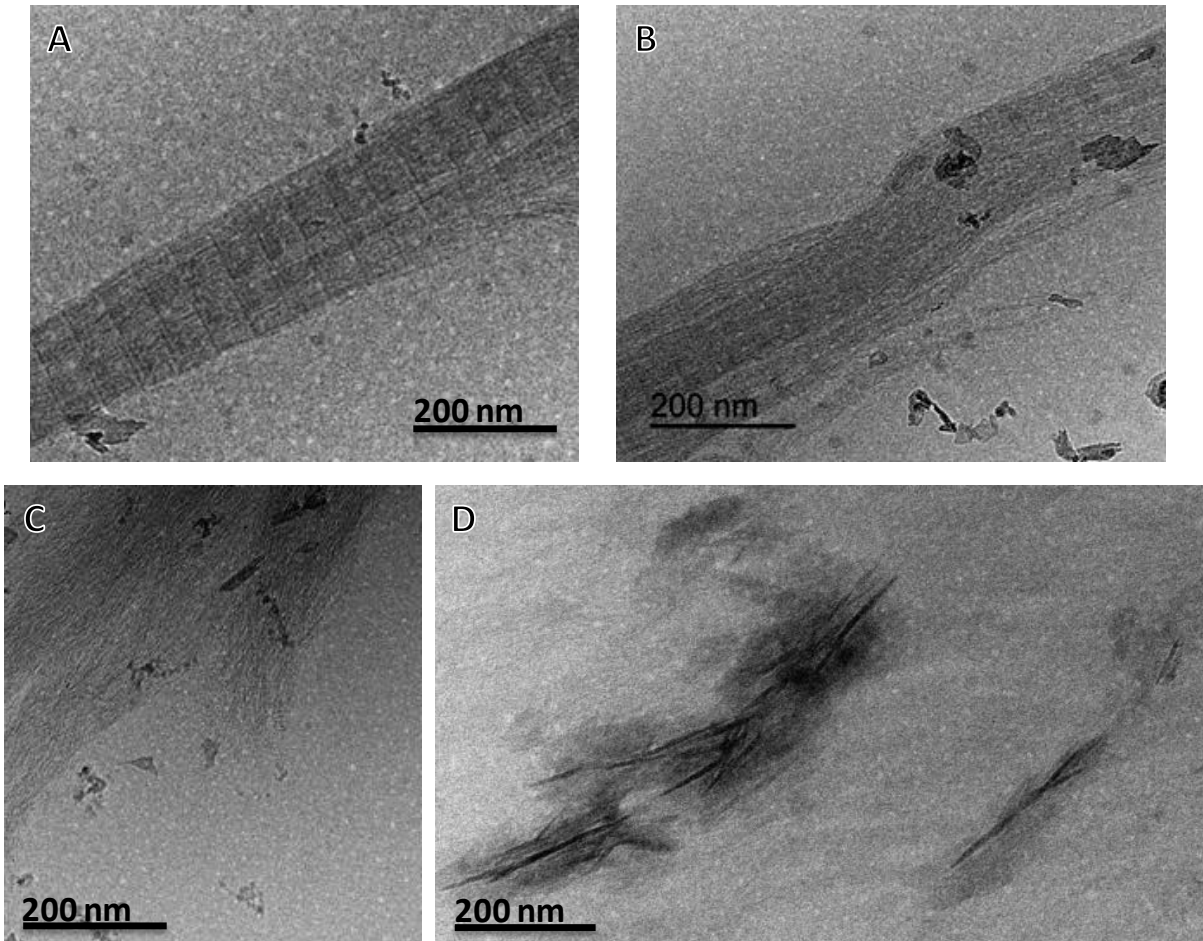


Figure 21 : Clichés de cryo-MET de la matrice Coll/CHA(SBF)

Pendant la préparation des échantillons pour la cryo-MET, certaines plaquettes d'apatite se sont désolidarisées du réseau organique, nous avons ainsi pu observer autour des fibrilles de collagène (Fig. 21A&B&C) des plaquettes de forme irrégulière avec une longueur d'environ 70 nm. Plus rarement, des plaquettes de taille plus importante (longueur ~ 150 nm) formant des agrégats (Fig. 21D) sont aussi observées. Leur taille est comparable aux échantillons en poudre CHApD obtenus par la méthode de diffusion. Ces deux types de cristaux se forment probablement dans des environnements très différents. Il apparaît cohérent que l'effet de confinement des fibrilles de collagène dans les espaces intra et/ou interfibrillaire soit à l'origine des petites plaquettes d'apatite. A l'inverse, les plaquettes de plus grandes

tailles se forment probablement dans un espace non confiné comme par exemple en solution à la surface des matrices.

L'existence de ces deux environnements pour l'apatite a été confirmée par l'observation de la matrice par MEB (Fig. 22).

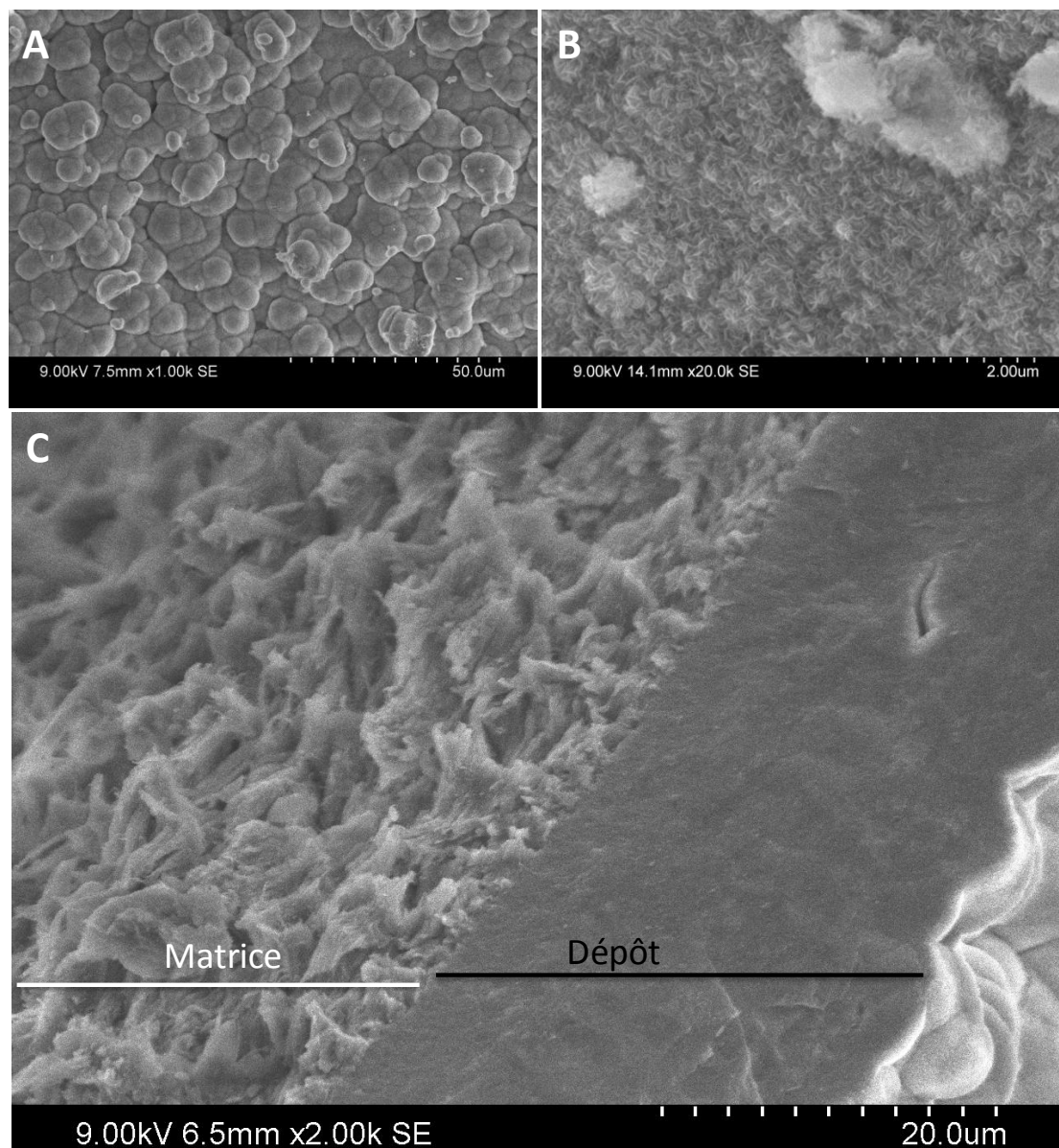


Figure 22 : Clichés de MEB de l'échantillon Coll/CHA(SBF) : A.B. Surface de la matrice ; C. Observation d'une coupe de la matrice

La surface de l'échantillon Coll/CHA(SBF) (Fig. 22AB) est recouvert de particules d'apatite de forme sphérolitique dont le diamètre peut aller jusqu'à $6\ \mu\text{m}$, sur une épaisseur allant jusqu'à environ $20\ \mu\text{m}$ (Fig. 22C). Les sphérolites d'apatite de même morphologie sont aussi observés dans la littérature pour des expériences d'impregnation de matériaux « bioactifs » par une solution de SBF (Pietak, 2007). En effet, la solution métastable de SBF

1,5 précipite spontanément en contact d'une surface. Ceci appuie l'hypothèse que la précipitation des cristaux d'apatite est plus rapide que la diffusion des précurseurs ioniques de la phase minérale au sein de la matrice hybride si ce dépôt n'est pas formé pendant l'étape de préparation des matrices. Rappelons que le SBF vise à mimer le fluide extracellulaire mais n'est pas parfaitement mimétique des conditions physiologiques (Bohner, 2009) ; la pression imposée par le fluide extracellulaire présente au sein du tissu osseux doit jouer un rôle majeur dans la diffusion des ions. Si ce dépôt n'est pas un artefact de préparation, nous pouvons proposer que l'un des rôles des molécules organiques du tissu osseux, absentes dans ce modèle, soit de favoriser la diffusion des précurseurs ioniques pour que les cristaux d'apatite se forment de façon homogène sur l'ensemble des matrices de collagène.

Comme indiqué précédemment, ces observations confirment les résultats de cryo-MET à savoir la coexistence de différentes tailles de plaquettes : l'un confiné dans l'espace intra et/ou interfibrillaire et l'autre en surface de la matrice hybride.

De façon cohérente, un dépôt important de minéral à la surface des matrices a aussi été observé dans les échantillons Coll/SBF(SBF) (Fig. 23A) et Coll(SBF) (Fig. 23A).

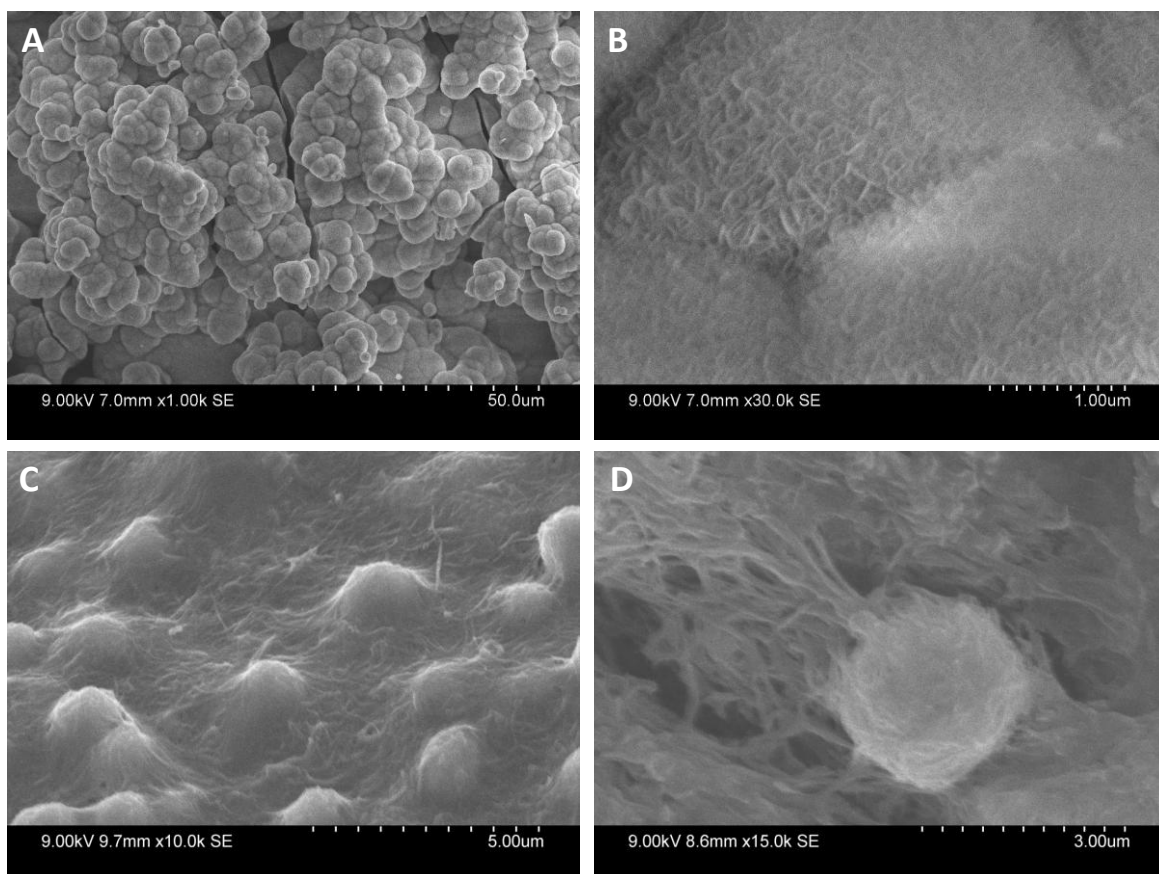


Figure 23 : Clichés de MEB de l'échantillon Coll/SBF(SBF) : A. B. Dépôt minéral à la surface de la matrice ; C. D. sphérolites au sein de la matrice

Sur les clichés de MEB des échantillons Coll/SBF(SBF) (Fig. 23C&D) et Coll(SBF) (fig. 24B), des sphérolites d'apatite sont également observés aléatoirement répartis au sein de la matrice de collagène. Ces résultats confirment les observations par MET.

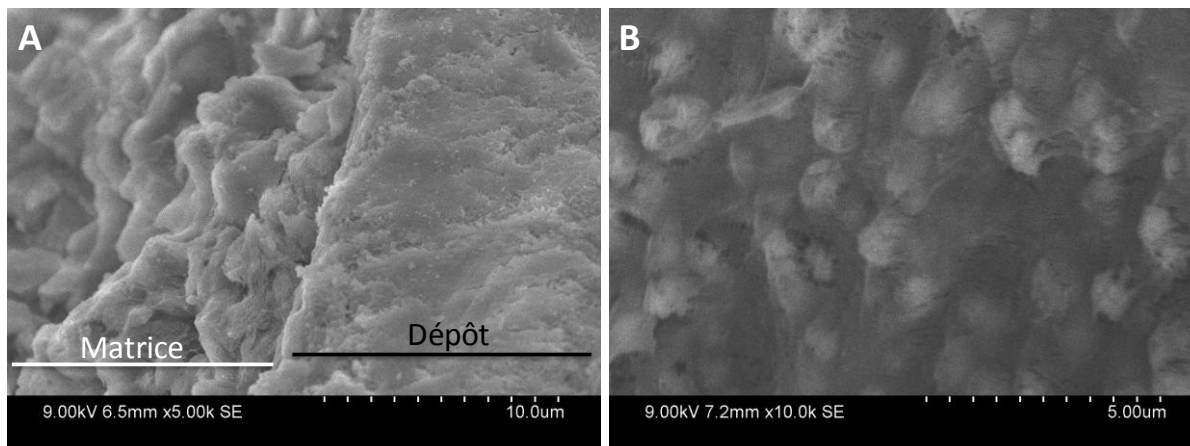


Figure 24 : Clichés de MEB de l'échantillon Coll(SBF) : A. Observation d'une section de la matrice; B. au sein de la matrice

En comparant les clichés de MEB des échantillons Coll/SBF(SBF) et Coll(SBF), nous avons trouvé beaucoup de similitudes entre les deux matrices hybrides ; en particulier concernant la présence et la répartition des sphérolites au sein de la matrice. Ceci est probablement lié à l'absence d'interaction spécifique entre l'apatite et les fibrilles de collagène dans ces deux échantillons.

3. Conclusion de la mise au point d'une matrice hybride mimétique du tissu osseux

Jusqu'à maintenant, nous avons réussi à obtenir une matrice mimétique de l'os Coll/CHA(SBF) dans laquelle la phase minérale de l'os a été recréée (par RMN), l'association des cristaux d'apatite et la matrice de collagène a été observés (par MET, diffraction électronique, DRX à grands angles), la minéralisation intra- et interfibrillaire (Cryo-MET) a été réalisée en absence de polymères acides ou de NCPs.

Nous avons bien observé un effet de confinement de la matrice de collagène sur la phase minérale de la matrice Coll/CHA en comparant nos résultats avec l'apatite CHApD. Il est intéressant de rappeler que nous avons observé une grande similitude par DRX ou RMN du ^{31}P entre les phases minérales dans les matrice hybrides Coll/CHA(SBF), Coll(SBF) et

Coll/SBF(SBF) indiquant que les résultats peuvent être dominés par le SBF précipité en surface. En revanche, les nanoparticules d'apatite sont réparties d'une façon complètement différente dans ces matrices hybrides. Nous avons observé le co-alignement entre l'axe *c* de la phase minérale et l'axe principal des fibrilles de collagène dans la matrice Coll/CHA(SBF). Les plaquettes d'apatite forment des sphérolites dans les matrices Coll(SBF) et Coll/SBF(SBF). Le rôle de la matrice de collagène lors de la formation de la phase minérale pendant l'étape d'imprégnation dans les bains SBF 1,5 semble montrer qu'elle permet de contrôler la croissance des plaquettes. En effet, la taille des plaquettes dans la matrice Coll/CHA(SBF) est plus petite qu'en solution (CHApD) et, dans la matrice Coll/CHA, elle est plus grande après imprégnation (Coll/CHA(SBF)).

Pour expliquer la différence de répartition des cristaux d'apatite entre les matrices hybrides Coll/CHA(SBF), Coll(SBF) et Coll/SBF(SBF), nous proposons le mécanisme suivant : Pendant la concentration des solutions acides de collagène, les ions calcium et phosphates se concentrent dans des espaces qui forment après précipitation des sites spécifiques de nucléation du collagène (zone de gap et d'overlap). Ainsi après la fibrillogénèse, les premiers points de nucléation se forment dans ces sites intra/interfibrillaires des matrices. Il est important de remarquer que nous ne pouvons pas exclure la présence de sites spécifiques de nucléation interfibrillaire.

Ensuite, pendant l'étape de l'imprégnation de la solution SBF 1,5, les germes de nucléation croissent grâce aux précurseurs ioniques (Ca, P, CO₃, etc) de la phase minérale présents dans la solution. L'apatite se forme également en surface, dès que la solution SBF 1,5 est au contact des fibrilles de collagène en raison de sa métastabilité. Avec une concentration initiale en ions calcium et phosphates moins élevée par rapport à la matrice Coll/CHA, la matrice hybride Coll/SBF possède moins de germes de nucléation. Nous nous aurions donc attendu à obtenir une matrice hybride Coll/SBF(SBF) avec une charge en minérale moins importante, mais avec la même répartition spatiale du minéral au sein de la matrice. En réalité, des sphérolites d'apatite sont observés dans cette matrice Coll/SBF(SBF).

Ceci montre que le fait d'ajouter les précurseurs ioniques de la phase minérale pendant la fibrillogénèse du collagène n'est pas le seul critère pour réaliser le co-alignement collagène/minéral. Les concentrations en ions calcium, phosphates et carbonates doivent aussi atteindre une valeur critique au sein des zones de gaps, qui doit être supérieure à leur valeur dans le fluide physiologique. Ceci laisse supposer que la présence des NCPs dans la matrice

extracellulaire pendant la minéralisation *in vivo* est indispensable pour concentrer localement les ions dans les zones de gap des fibrilles de collagène, sachant que ces NCPs se trouvent probablement déjà dans ces zones avant la fibrillogénèse du collagène (He, 2004).

Ces études ont donc montré l'importance de l'organisation tridimensionnelle de la matrice de collagène sur la distribution et la forme des cristaux d'apatite formés au sein de la matrice (Wang, 2012). Nous avons néanmoins observé une hétérogénéité de taille des cristaux d'apatite dans la matrice Coll/CHA(SBF). En effet, les plaquettes d'apatite localisées proches de la surface de l'échantillon sont plus grandes que celles situées au sein de la matrice. Les ions présents dans la solution SBF 1,5 qui précipitent dès leur contact avec les fibrilles de collagène, soit par nucléation homogène (dans la solution), soit par nucléation hétérogène (surface des fibrilles de collagène) pénètrent rarement jusqu'au cœur de la matrice. Dans le milieu biologique, des NCPs pourraient jouer un rôle majeur pour obtenir une minéralisation homogène sur l'ensemble du tissu osseux, tel que ralentir la formation d'apatite. Il est possible également que le flux du fluide extracellulaire y ait un rôle majeur.

4. Influence de polymères synthétiques acides, des NCPs et des ions sur la minéralisation *in vitro*

Nous avons réussi à synthétiser une matrice hybride apatite/collagène « mimétique » de l'os en utilisant seulement des composants majoritaires présents dans le tissu osseux : molécules de collagène et précurseurs ioniques de la phase d'apatite. Néanmoins, il est important de mettre en évidence le rôle indispensable des autres composants tels que les NCPs dans le processus de la minéralisation du tissu osseux.

4.1 Etude des polymères acides synthétiques et des NCPs

Dans la littérature, beaucoup de polymères synthétiques (PolyAsp, PolyGlu) (Gower, 2008) et naturels (DMP1) (He, 2004) ont été utilisés pour l'étude de la minéralisation *in vitro*. Nous avons choisi deux d'entre eux : l'héparine, un glycosaminoglycane (GAG) présent dans le tissu osseux et le polyaspartate, un polymère acide synthétique.

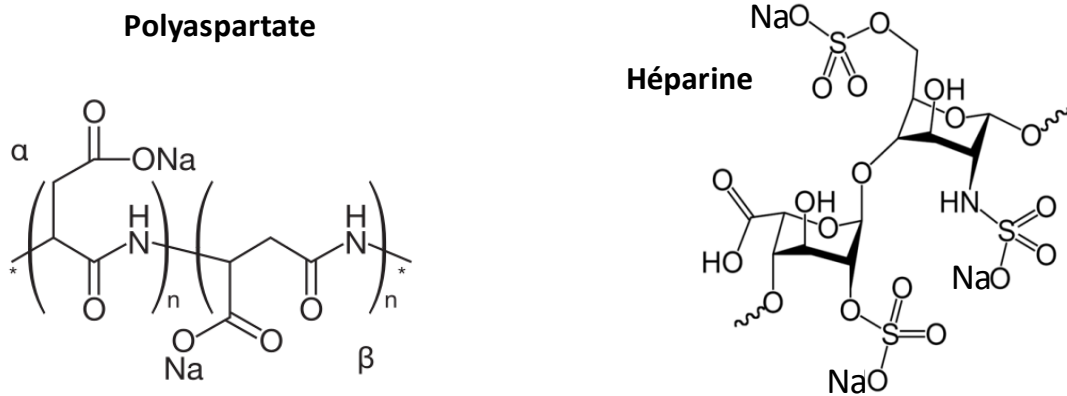


Figure 25 : Unités monomériques du polyaspartate ($pK_{a1} = 2,1$; $pK_{a2} = 3,9$ Weast, 1987) et de l'héparine.

Le polyaspartate, un polymère acide, est souvent utilisé pour « mimer » le rôle des protéines non-collagéniques acides dans la minéralisation grâce à ses fonctions COO^- à pH neutre. Ce polymère pourrait stabiliser une phase amorphe de phosphate de calcium et faciliter un transport plus important d'ions au sein de la matrice de collagène (Olszta 2007).

Les GAGs, polymères constitués d'unités disaccharidiques, sont des composants importants des matrices extracellulaires. En particulier, grâce à leurs fonctions $-\text{NHSO}_3^-$, ils ont un caractère très acide. Les GAGs pourraient interagir avec diverses protéines pour favoriser l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Jackson 1991). Un site spécifique de fixation de l'héparine a été identifié sur les fibrilles de collagène entre des zones de gap et d'overlap (San Antonio, 1994). Le rôle de l'héparine serait d'accélérer la résorption et de diminuer la formation de l'os grâce à son effet inhibiteur sur les gènes codant pour la synthèse de collagène (Hurley, 1990).

Dans notre modèle de minéralisation, l'ajout d'héparine a pour objectif de synthétiser une matrice dont la composition et la structure sont plus proches de celles décrites *in vivo*.

4.1.1 Préparation des matrices hybrides avec additifs

Pour influencer le réseau de la matrice de collagène, il faut ajouter ces additifs pendant l'étape de concentration du collagène. Les polymères, polyaspartate ($5,75\mu\text{g/mL}$, $M_w=1200$ Da) ou héparine ($8,3\mu\text{g/mL}$, $176,3\text{USP/mg}$, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés dans la solution acide initiale de collagène. La concentration en polymère est référencée par rapport à la concentration utilisée par le groupe de L. Gower ($0,15\sim 75\mu\text{g/mL}$, $M_w=6200\text{Da}$) qui a déjà réalisé la minéralisation de matrices de collagène peu concentrées ($\sim 5\text{mg/mL}$) avec le polyaspartate. Nous avons bien entendu pris en compte la longueur du polymère. La

dissolution du polyaspartate dans la solution acide de collagène est immédiate. Par contre, la solution devient trouble dès l'addition de l'héparine à la solution de collagène. Ceci est peut-être dû à la forte charge négative que porte l'héparine.

Les précurseurs ioniques de l'apatite sont également ajoutés dans la solution acide de collagène. Dans ce modèle, la concentration des ions fixée est celle du fluide extracellulaire physiologique, c'est-à-dire que la concentration des précurseurs ioniques de la phase minérale est la même que celle de la matrice Coll/SBF dans laquelle le co-alignement n'a pas été observée. En ajoutant les additifs, nous faisons l'hypothèse que ceux-ci puissent augmenter localement (dans les zones de gap) la concentration des précurseurs ioniques de l'apatite afin de permettre le co-alignement. Le mélange de collagène, ions et polymères en milieu acide est concentré par la méthode de dialyse inverse couplée à une injection continue puis précipité par vapeur de NH_3 comme décrit précédemment. Les deux matrices hybrides Coll/SBF/PolyAsp et Coll/SBF/Hép sont alors imprégnées dans une solution SBF 1,5 afin d'augmenter la charge en minéral. Elles seront nommées Coll/SBF/PolyAsp(SBF) et Coll/SBF/Hép(SBF) après deux bains SBF 1,5 d'une semaine. Les échantillons imprégnés dans quatre bains SBF 1,5 d'une semaine seront nommés Coll/SBF/PolyAsp(SBFx2) et Coll/SBF/Hép(SBFx2).

4.1.2 Caractérisation des matrices hybrides avec additifs

Limité par le temps, nous n'avons utilisé que la MET comme méthode de caractérisation afin d'observer directement la morphologie des fibrilles de collagène sous l'effet potentiel des polymères ainsi que la répartition des cristaux d'apatite sur l'ensemble de la matrice de collagène.

La matrice Coll/SBF/Hép présente des fibrilles de collagène plus fines avec un diamètre d'environ 200 nm (Fig. 26A) que dans la matrice Coll/SBF/PolyAsp avec un diamètre d'environ 400 nm (Fig. 26B). La taille des fibrilles de collagène dans la matrice Coll/SBF (170 nm de diamètre) est intermédiaire entre celle trouvée dans ces deux matrices hybrides.

Après les deux premiers bains SBF 1,5, le taux de minéralisation peut normalement atteindre 40% en masse dans le cas d'une matrice Coll/SBF(SBF) et où, pour rappel, nous avons observé des sphérolites d'apatite. En présence des polymères, le degré de minéralisation est nettement moins important, aucune particule de minéral n'est observé au

MET. Il y a très peu d'apatite observée sur les coupes de la matrice Coll/SBF/Hép(SBF) (Fig. 26C). Néanmoins, de nombreuses déchirures de petites tailles sont observées qui rappellent la forme sphérolitique des apatites. Il est donc probable que cela soit dû à la préparation des coupes qui conduiraient à la ségrégation des particules d'apatite. Nous avons pu faire les mêmes observations dans la matrice Coll/SBF/PolyAsp(SBF) (Fig. 26D). A plus fort grossissement (Fig. 26E), nous avons remarqué que le cœur de ces objets n'est pas vide et que des dépôts noirs s'y trouvent. Une analyse par EDX aurait pu nous aider à déterminer la composition de ces particules. Mais cette analyse conduit systématiquement à la destruction des coupes sous le faisceau d'électrons. Une étude complémentaire est nécessaire pour éclaircir la nature de ces particules et proposer un mécanisme de formation.

Ensuite, nous avons doublé le nombre de bains successifs de SBF 1,5. Après quatre bains successifs de SBF 1,5 d'une semaine chacun, nous avons observé des nanoparticules minérales dans les matrices. Dans la matrice Coll/SBF/Hép(SBFx2) (Fig. 26F,G), les sphérolites sont observés dans la matrice, dont le diamètre est environ 400 nm. Ils sont beaucoup plus petits que ceux observés dans la matrice Coll/SBF(SBF) dont le diamètre est environ 2 μ m. Ceci peut être dû à un rôle inhibiteur de croissance joué par l'héparine.

Des nanoparticules en forme de plaquettes sont observées dans la matrice Coll/SBF/PolyAsp(SBFx2) (Fig. 26H). Elles sont concentrées localement, mais cette organisation ne ressemble pas du tout à celle des sphérolites. Nous avons observé localement que les plaquettes suivent la trame organique de la matrice (Fig. 26I). Néanmoins la taille des plaquettes semblent nettement plus grande que dans Coll/CHA(SBF).

Ces études de minéralisation en présence de molécules organiques ont été réalisées une seule fois, il faut donc considérer ces résultats avec les précautions nécessaires. Mais nous pouvons proposer ici que le polymère acide synthétique, polyaspartate, semble bien avoir un effet sur la minéralisation de la matrice de collagène. De plus, une observation très importante pendant l'imprégnation dans les bains de SBF 1,5 est que les matrices hybrides co-précipitées avec les polymères présentent une texture totalement différente des matrices sans additifs. Les matrices se décomposent par simple agitation dans le bain de SBF 1,5 pendant deux semaines. Ce phénomène n'a jamais été observé dans les matrices hybrides sans polymère. La présence des polymères limite les interactions entre les fibrilles de collagène et donc la cohésion du réseau. Ce phénomène peut être intéressant dans le cas où on veut favoriser la dégradation de matériaux implantés.

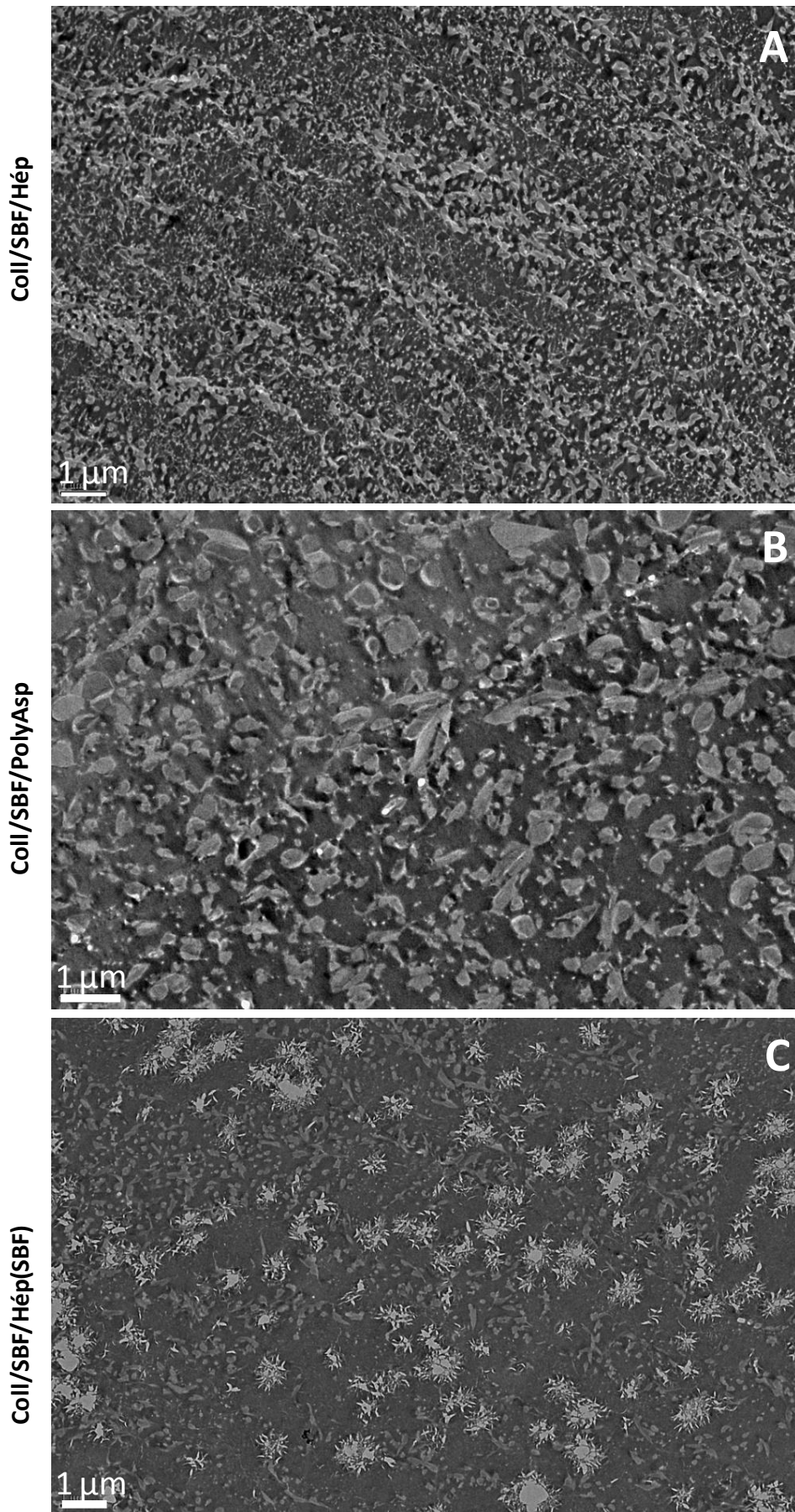
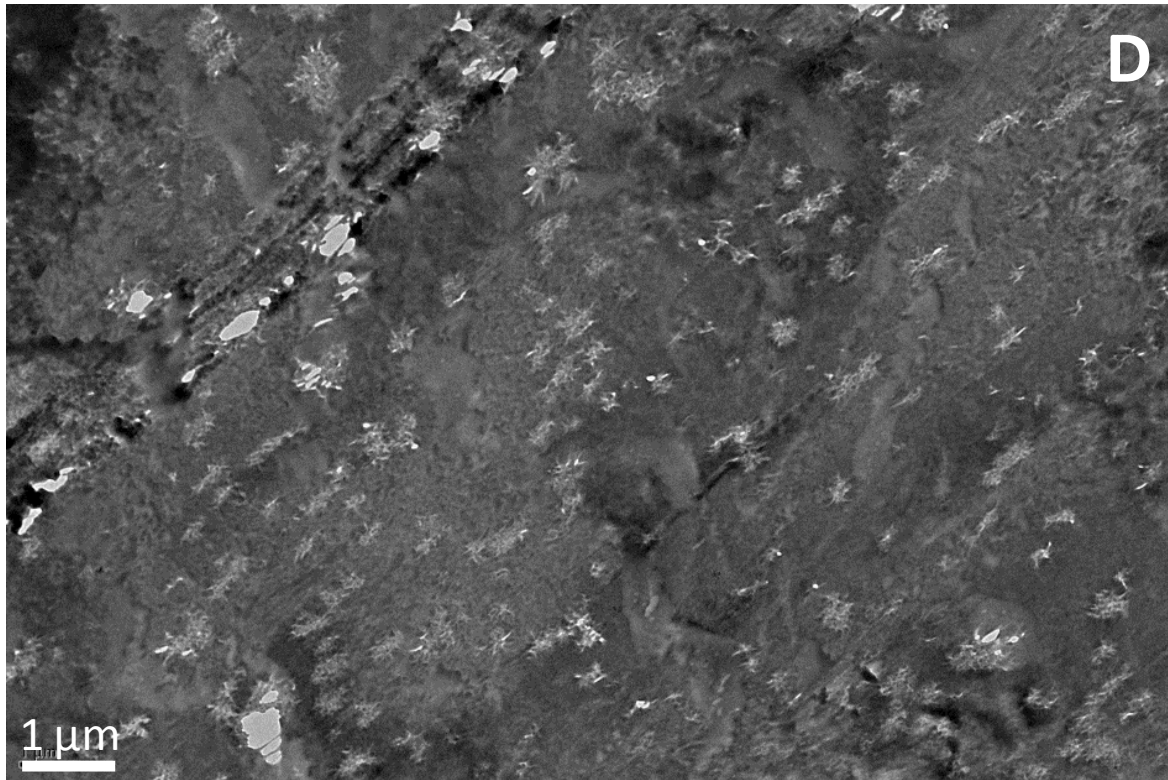


Figure 26 : Etude par MET de l'influence de l'introduction de polymères sur la minéralisation des matrices hybrides : A. Coll/SBF/Hép; B. Coll/SBF/PolyAsp; C. Coll/SBF/Hép(SBF).

Coll/SBF/PolyAsp(SBF)



Coll/SBF/PolyAsp(SBF)

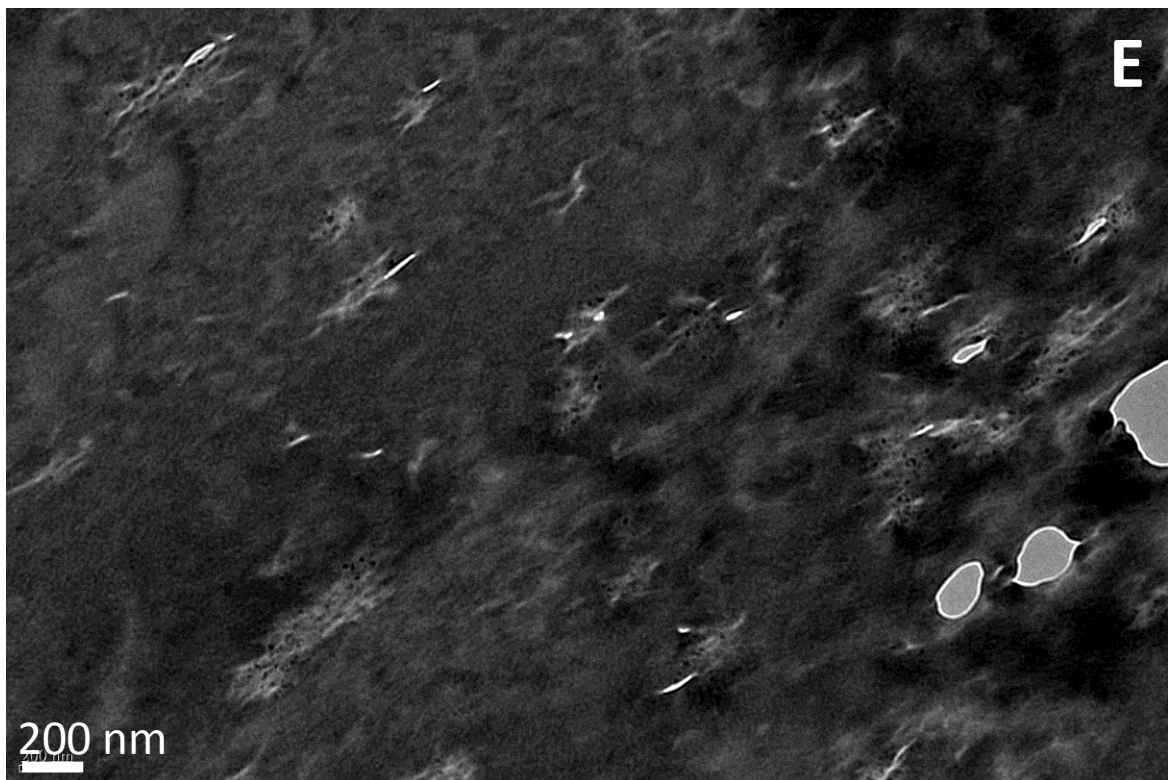


Figure 26 : Etude par MET de l'influence de l'introduction de polymères sur la minéralisation des matrices hybrides : D.E.
Coll/SBF/PolyAsp(SBF)

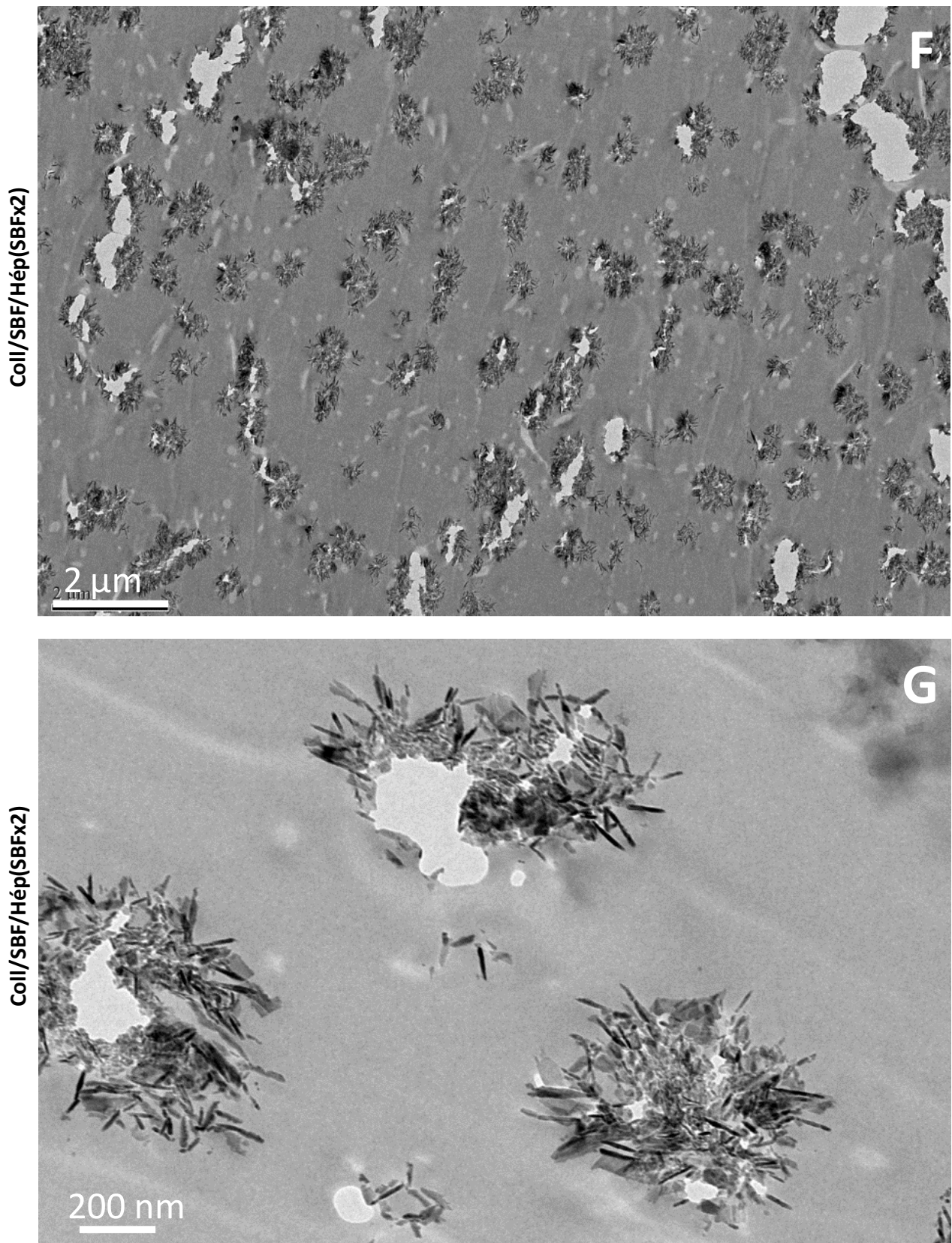
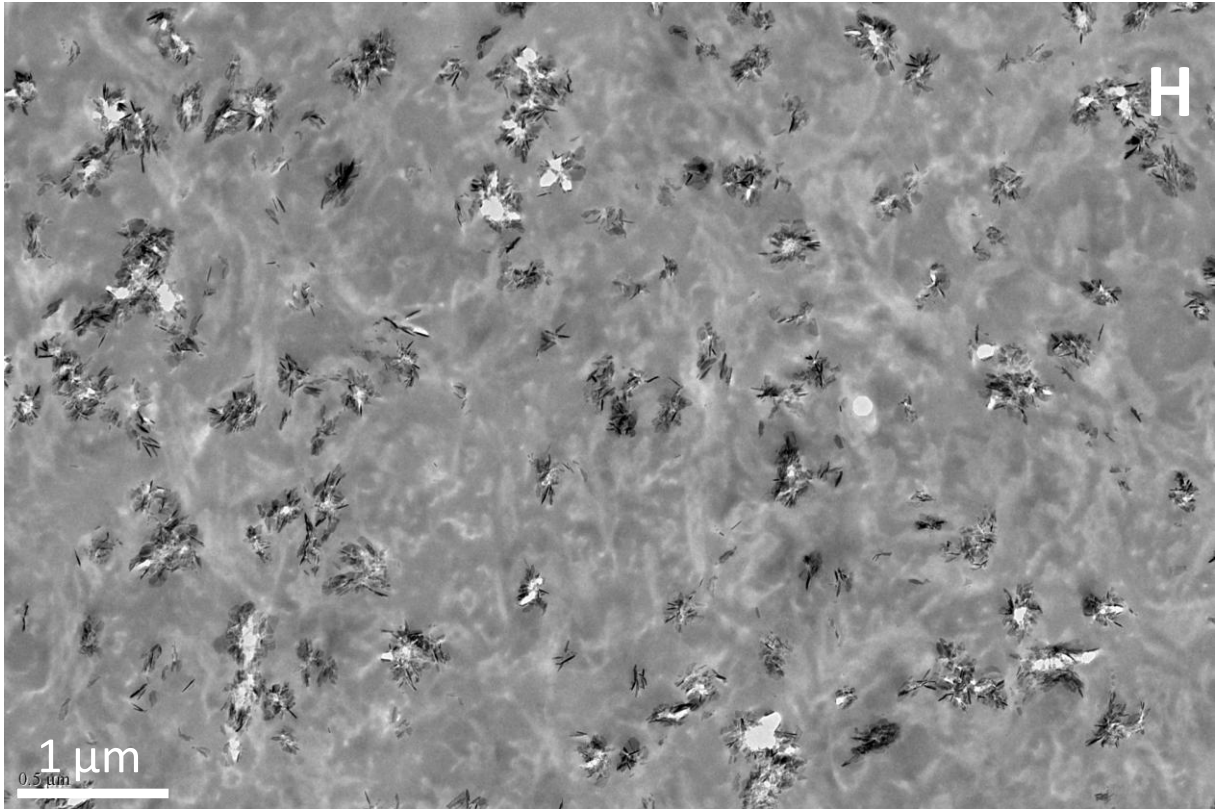


Figure 26 : Etude par MET de l'influence de l'introduction de polymères sur la minéralisation des matrices hybrides : F. G. Coll/SBF/Hép(SBFx2)

Coll/SBF/PolyAsp(SBFx2)



Coll/SBF/PolyAsp(SBFx2)

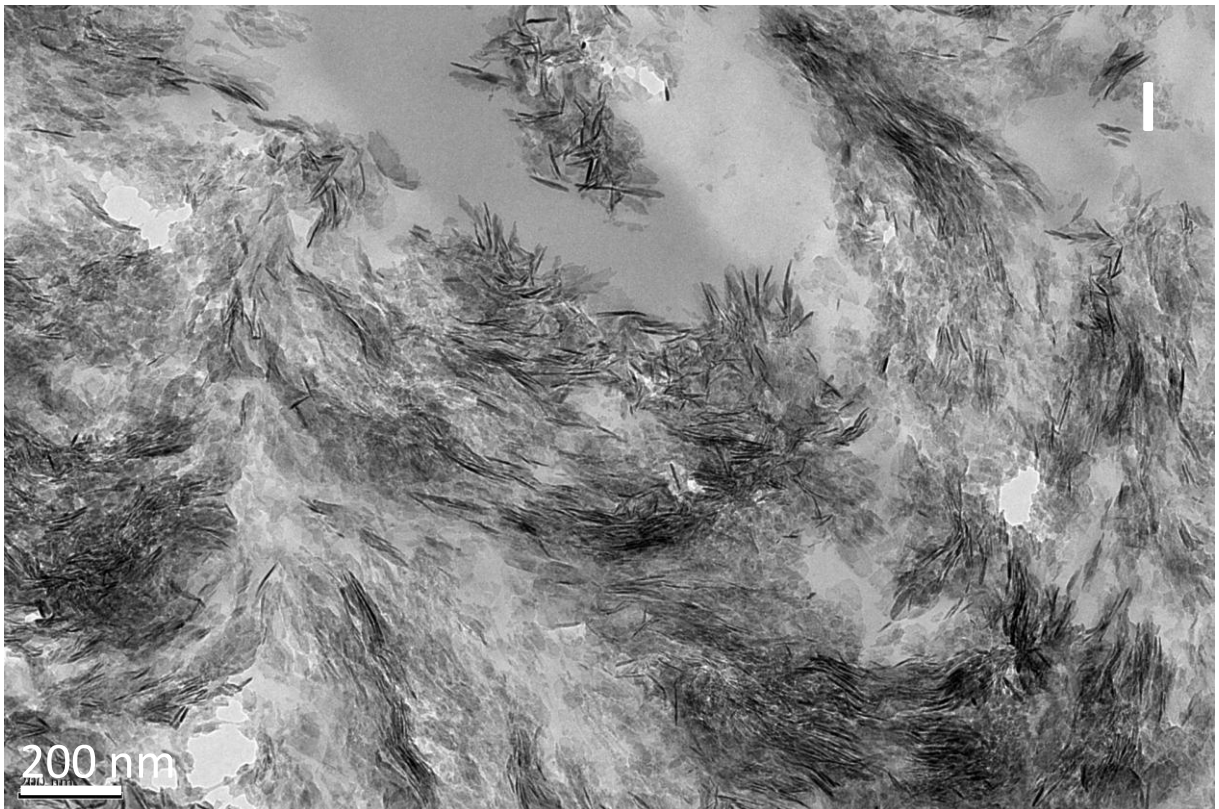


Figure 26 : Etude par MET de l'influence de l'introduction de polymères sur la minéralisation des matrices hybrides : H. I.
Coll/SBF/PolyAsp(SBFx2)

Une autre thèse est réalisée au laboratoire par Jérémie Silvent sur le rôle des NCPs, et en particulier sur la protéine dentine (DMP1) dont des séquences peuvent être phosphorylées (He, 2004). Des expériences ont été réalisées avec cette protéine selon le même modèle.

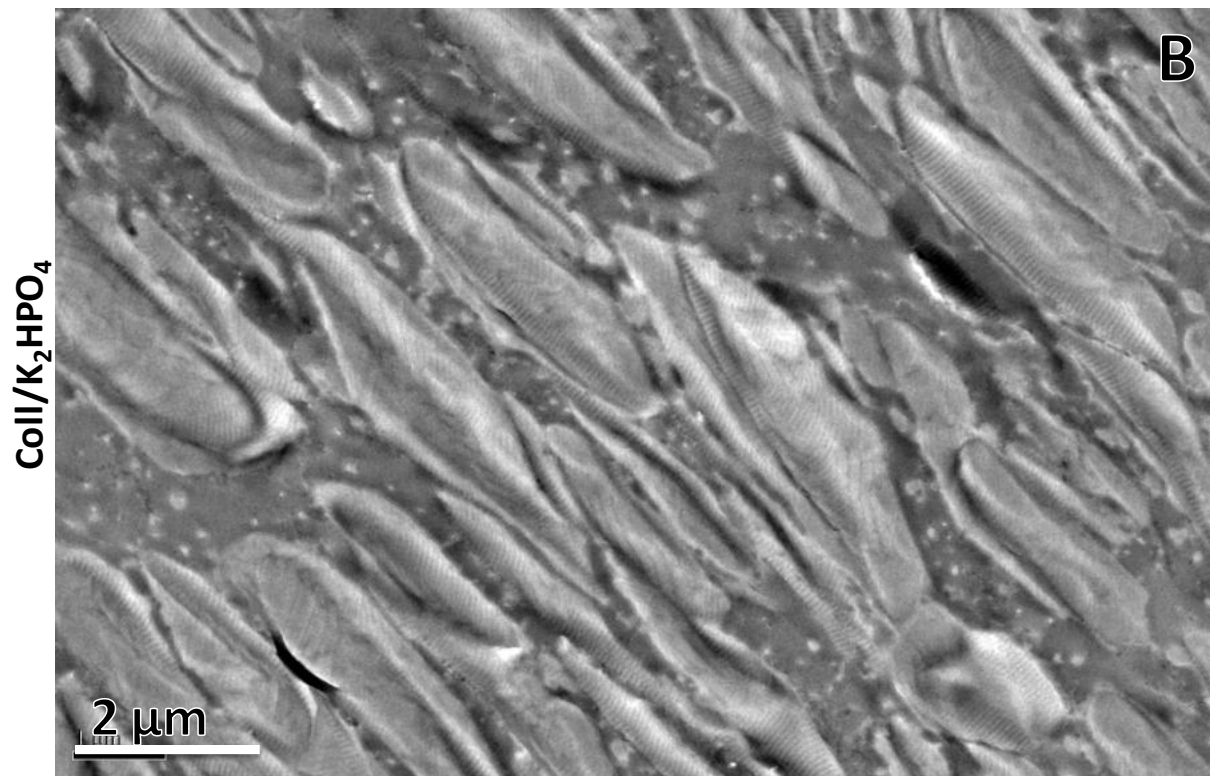
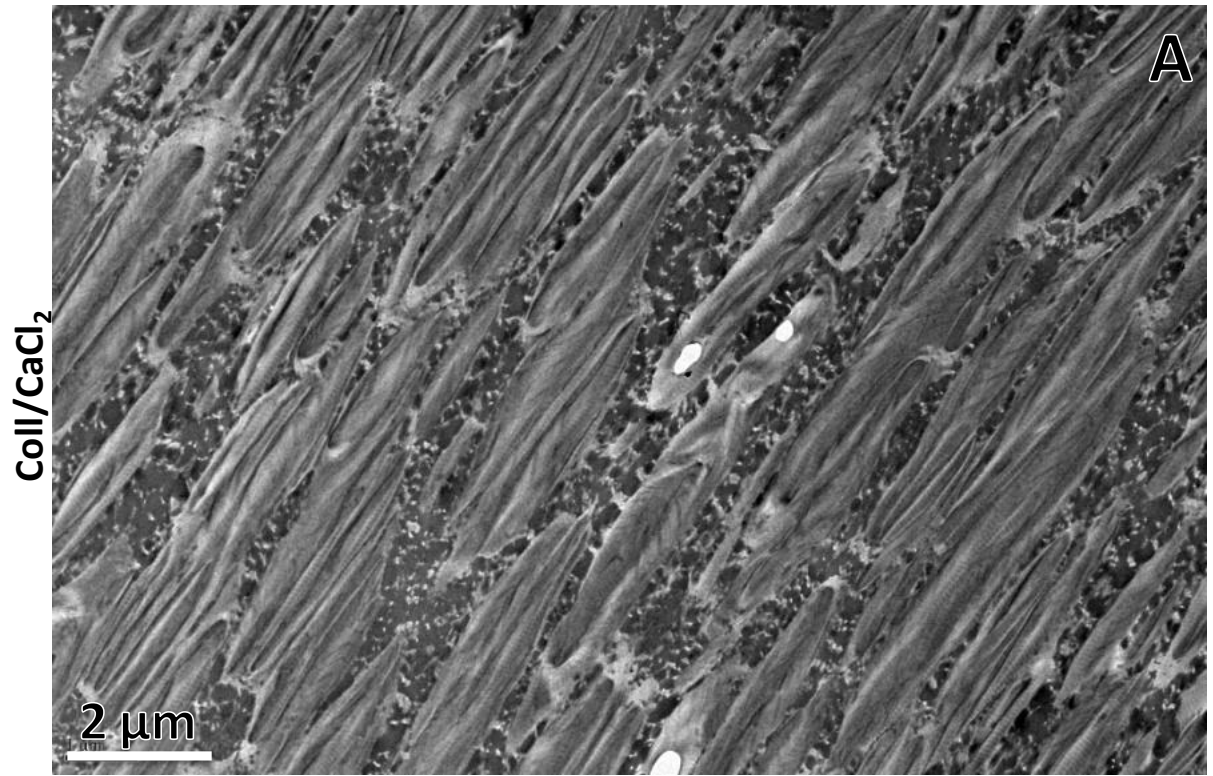
4.2 L'influence de la nature des ions dans le procédé de minéralisation

Dans les études précédentes, nous avons montré que des molécules organiques pouvaient avoir un rôle important pendant le processus de minéralisation. L'interaction des sites spécifiques du collagène avec les ions calcium est aussi considérée comme une étape fondamentale pour la nucléation de l'apatite. Mais comme l'a constaté Melvin Glimcher (Glimcher, 2006), les ions phosphates devraient avoir un rôle tout aussi important que les ions calcium pendant la minéralisation. En plus, en comparant la concentration des ions des solutions physiologiques avec celle du plasma sanguin humain (Chapitre II, Tab. 3), nous avons remarqué que la concentration en carbonate dans les solutions physiologiques est presque 7 fois inférieure à celle du plasma sanguin. En fait, *in vitro* il est impossible d'augmenter la concentration en ions carbonates sans précipiter la solution. Böhner et Lemaître (Böhner, 2009) ont déjà indiqué l'importance de la pression partielle en CO₂ pour recréer un vrai environnement mimétique.

Afin de progresser sur le type d'interactions entre les ions (calcium, phosphate ou carbonate) et les fibrilles de collagène, nous avons concentré les molécules de collagène en présence soit des ions Ca, PO₄ ou (Ca+CO₃). L'influence des ions sur la morphologie et l'organisation spatiale des fibrilles de collagène a été observée par MET. Ici aussi, pour cette étude préliminaire, nous n'avons caractérisé nos échantillons que par MET (Fig. 27).

Trois préparations différentes ont été réalisées contenant uniquement soit les sels de CaCl₂, soit de K₂HPO₄ ou enfin de CaCO₃ (tableau ci-dessous).

	Concentration en sel (mM)	Force ionique (mM)
Coll/CaCl ₂	66	165
Coll/K ₂ HPO ₄	66	165
Coll/CaCO ₃	41	165



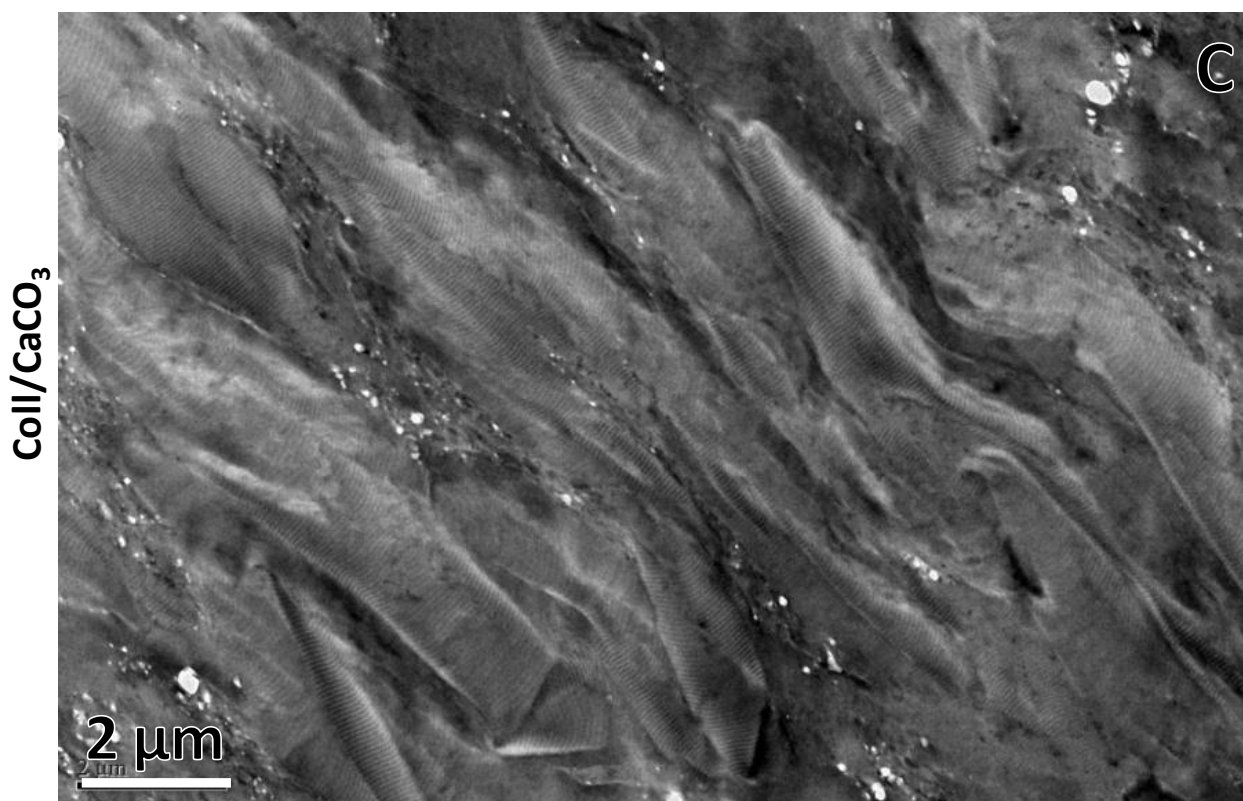


Figure 27 : Clichés de MET des matrices hybrides co-précipitées avec CaCl_2 (A), K_2HPO_4 (B) et CaCO_3 (C). Toutes les coupes sont contrastées avec de l'acétate d'uranyle.

Les trois matrices hybrides de collagène présentent une association de fibrilles (~ 200 nm de diamètre pour $\text{Coll}/\text{CaCl}_2$ et $\text{Coll}/\text{K}_2\text{HPO}_4$; ~ 300 nm pour $\text{Coll}/\text{CaCO}_3$) en fibres de collagène de taille homogène (Fig. 27) avec un diamètre de $1 \mu\text{m}$. Les fibres de la matrice $\text{Coll}/\text{CaCO}_3$ (Fig. 27C) apparaissent plus longues que dans les deux autres échantillons (longueur $\sim 4 \mu\text{m}$). Les coupes ne permettent pas de déterminer correctement la longueur des fibres. Nous avons été surpris par la similarité observée entre les fibres de collagène formées en présence de CaCl_2 et K_2HPO_4 . A l'inverse, on observe une différence notable entre les matrices $\text{Coll}/\text{CaCl}_2$ et $\text{Coll}/\text{CaCO}_3$. Etant donné que nous avons fixé la force ionique dans ces matrices, cette différence de morphologie des fibres entre $\text{Coll}/\text{CaCl}_2$ et $\text{Coll}/\text{CaCO}_3$ doit être due à la différence de concentration en ions calcium dans les deux solutions initiales. La présence d'ions calcium semble donc bien essentielle pour la minéralisation du tissu osseux. Ce travail nécessite une étude plus approfondie.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons synthétisé une matrice collagène/apatite « mimétique » du tissu osseux, en termes d'environnement chimique et de cristallinité de la phase minérale. De plus, les relations spatiales entre phases organique/minérale sont recrées sans NCPs. Les différentes matrices synthétisées nous ont permis d'affiner le rôle du collagène et indirectement celui des NCPs dans le processus de biominéralisation de l'os. L'étape suivante a été d'utiliser ces matrices comme référence afin d'étudier les interactions collagène-apatite, si elles existent, dans le tissu osseux. Ces résultats ont été confrontés à ceux obtenus pour des échantillons biologiques, des échantillons d'os prélevés chez la brebis.

Références bibliographiques

- A**
- B**
- Beniash **2011** Beniash, E.; Deshpande, A. S.; Fang, P. A.; Lieb, N. S.; Zhang, X.; Sfeir, C. S. *Journal of Structural Biology* 2011, 174, 100-106.
- Biltz **1969** Biltz, R.M.; Pellegrino, E.D. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1969, 51, 456-466.
- Boedtker **1956** Boedtker, H.; Doty, P. *Journal of the American Chemical Society* 1956, 78, 4267-4280.
- Bohner **2009** Bohner, M.; Lemaître, J. *Biomaterials* 2009, 30, 2175-9.
- Boskey **1989** Boskey, A. L. *Bone and Mineral* 1989, 6, 111
- Boskey **1995** Boskey, A. L. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995, 760, 249.
- Boskey **1996** Boskey, A. L. *Connective Tissue Research* 1996 35, 357-363
- Boskey **1998** Boskey, A. L. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* 1998, 30-31, 83-91.
- Bradt **1999** Bradt, J.-H.; Mertig, M.; Teresiak, A.; Pompe, W. *Chemistry of Materials* 1999, 11, 2694-2701.
- Brown **1966** Brown, W.E. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1966, 44, 205-220.
- Brown **1976** Brown, W. E.; Chow, L. C. *Annual Review of Materials Science* 1976, 6, 213-236.
- Brown **1979** Brown, W. ; Schroeder, L. ; Ferris, J. *Journal of Physical Chemistry* 1979, 83, 1385-1388.
- Burwell **2012** Burwell, A. K.; Thula-Mata, T.; Gower, L. B.; Habeliz, S.; Kurylo, M.; Ho, S. P.; Chien, Y.-C.; Cheng, J.; Cheng, N. F.; Gansky, S. a; Marshall, S. J.; Marshall, G. W. *PloS one* 2012, 7, e38852.
- Butler **1995** Butler, W. T., Ritchie, H. *International Journal of Developmental biology* 1995 39, 169-179
- C**
- Chen **2005** Chen, J.; Burger, C.; Krishnan, C. V.; Chu, B.; Hsiao, B. S.; Glimcher, M. J. *Macromolecular Chemistry and Physics* 2005, 206, 43-51.
- Christiansen **1992** Christiansen, D. L.; Silver, F. H. *Biomimetics* 1992, 1, 265-291.
- Cohen-Solal **1981** Cohen-Solal, L., Maroteaux, P., Glimcher, M.J. *Proceedings of the First International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues, Chicago, IL. 1981, 7-11*
- D**
- Deshpande **2008** Deshpande, A. S.; Beniash, E. *Crystal Growth & Design* 2008, 8, 3084-3090
- Dorozhkin **2010** Dorozhkin, S. V. *Acta biomaterialia* 2010, 6, 4457-75.
- E**
- Eanes **1970** Eanes, E. D. *Calcified tissue research* 1970, 5, 133-45.
- F**
- Fantner **2005** Fantner, G. E.; Hassenkam, T; Kindt, J. H.; Weaver, J.C.; Birkedal, H.; Pechenik, L; Cutroni, J. A.; Cidade, G. A.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Hansma, P. K. *Nature Materials* 2005, 4, 612-616.
- Fell **1934** Fell, H. ; Robison, R. *Biochemical Journal* 1934, 28:2243-2253
- Fratzl **2007** Fratzl, P.; Weinkamer, R. *Progress in Materials Science* 2007, 52, 1263-1334.
- G**
- Gilbert **2006** Gilbert, T. W.; Sellaro, T. L.; Badylak, S. F. *Biomaterials* **2006**, 27, 3675-83.

- Giraud-Guille **1992** Giraud-Guille, M.-M. *Journal of Molecular Biology* 1992, 224, 861-873.
- Glimcher **1957** Glimcher, M. J.; Hodge, A. J.; Schmitt, F. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1957, 43, 860-867.
- Glimcher **1959** Glimcher, M. J. *Reviews of Modern Physics* 1959, 31, 359-393
- Glimcher **1960** Glimcher M. J., *Calcification in Biological Systems*. Sognaes RF (ed) American Association for the Advancement of Science, 1960 421-487
- Glimcher **1968** Glimcher, M. J.; Krane, S. M. The organization and structure of bone, and the mechanism of calcification, in Ramachandran, G. N., and Gould, B. S. (Eds.), *A Treatise on Collagen. Biology of Collagen*, (1968) Vol. IIB, pp. 68–251, Academic Press, New York.
- Glimcher **1984** Glimcher, M.J.; Muir, H., *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1984, 304, 479-508.
- Glimcher **2006** Glimcher, M. J. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 2006, 64, 223-282.
- George **1993** George, A.; Sabsay, B.; Simonian, P. A.; Veis, A. *Journal of Biological Chemistry* 1993, 268, 12624–12630
- George **2008** George, A.; Veis, A. *Chemical reviews* 2008, 108, 4670-93.
- Gobeaux **2008** Gobeaux, F.; Mosser, G.; Anglo, a; Panine, P.; Davidson, P.; Giraud-Guille, M.-M.; Belamie, E. *Journal of molecular biology* 2008, 376, 1509-22.
- Gower **2008** Gower, L. B. *Chemical reviews* 2008, 108, 4551-627.
- Griffin **1990** Griffin, R. G.; Schimizu, M.; Beshah, K.; Rey, C.; Glimcher, M. J. *Journal of Solid State Chemistry* 1990, 84, 71-81.
- Gross **1958** Gorss, J.; Kirk, D. *Journal of biological chemistry* 1958, 233, 355-360.

H

- Harper **1966** Harper, R. A.; Posner, A. S. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1966, 122, 137.
- He **2003** He, G.; Dahl, T.; Veis, A.; George, A. *Nature materials* 2003, 2, 552-8.
- He **2004** He, G.; George, A. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279, 11649-56.
- Hellmich **2002** Hellmich, C.; Ulm, F.-J. *Journal of biomechanics* 2002, 35, 1199-1212.
- Hodge **1963** Hodge, A. J. & Petruska, J. A. in *Aspects of Protein Structure* (ed. Ramachandran, G. N.) 289–300 (Academic, New York, 1963).
- Hunter **1993** Hunter, G. K.; Goldberg, H. a *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90, 8562-5.
- Hunter **1996** Hunter, G.K.; Hauschka, P.V.; Poole, A.R.; Rosenberg, L.C.; Goldberg, H.A. *Biochemical Journal* 1996, 317, 59–64.
- Hurley **1990** Hurley, M. M.; Gronowicz, G.; Kream, B. E.; Raisz, L. G. *Calcified tissue international* 1990, 46, 183-8.

I

J

- Jackson **1957** Jackson, S. F. *Proceedings of the Royal Society of London. B, Biological sciences* 1957, 146, 270-280.
- Jackson **1991** Jackson, R.I.; Busch, S.J.; Cardin, A.D. *Physiological Reviews* 1991, 71:481-539.
- Jäger **2006** Jäger, C.; Welzel, T.; Meyer-zaika, W.; Epple, M. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2006, 44, 573-580.

K

- Kikuchi **2001** Kikuchi, M.; Itoh, S.; Ichinose, S.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. *Biomaterials* 2001, 22, 1705-11.
- Kokubo **1987** Kokubo, T; Ito, S; Shigematsu, M; Sakka, S; Yamamuro, T. *Journal of Materials Science* 1987;22:4067–4070.

L	
Landis 1993	Landis, W.J. ; Song, M.J. ; Leith, A. ; McEwen, L. ; McEwen, B. <i>Journal of Structural Biology</i> 1993, 110, 39–54.
Landis 1996	Landis, W. .; Hodgens, K. J.; Song, M. J.; Arena, J.; Kiyonaga, S.; Marko, M.; Owen, C.; McEwen, B. F. <i>Journal of structural biology</i> 1996, 117, 24-35.
Landis 2006	Landis, W. J.; Silver, F. H.; Freeman, J. W. <i>Journal of Materials Chemistry</i> 2006, 16, 1495.
Lee 1991	Lee, D.; Glimcher, M. <i>Journal of Molecular Biology</i> 1991, 217, 487-501
Leforestier 1991	Leforestier, A.; Livolant, F. <i>Biology of the Cell</i> 1991, 71, 115–122.
Lopez 1978	Lopez, E.; Baud, C. A.; Goivin, G.; Lallier, F. <i>Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.</i> 1978 , 1, 105-117.
M	
Mahamid 2008	Mahamid, J.; Sharir, A.; Addadi, L.; Weiner, S. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> 2008 , 105, 12748-53.
Mahamid 2010	Mahamid, J.; Aichmayer, B.; Shimoni, E.; Ziblat, R.; Li, C.; Siegel, S.; Paris, O.; Fratzl, P.; Weiner, S.; Addadi, L. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> 2010, 107, 6316-21.
Mann 1983	Mann, S. <i>Struct. Bonding (Berlin)</i> 1983, 54, 125
Mkukuma 2004	Mkukuma, L. D.; Skakle, J. M. S.; Gibson, I. R.; Imrie, C. T.; Aspden, R. M.; Hukins, D. W. L. <i>Calcified tissue international</i> 2004, 75, 321-328.
Mosser 2006	Mosser, G.; Anglo, A.; Helary, C.; Bouligand, Y.; Giraud-Guille, M.-M. <i>Matrix biology</i> 2006, 25, 3-13.
Murshed 2005	Murshed, M.; Harmey, D.; Millán, J. L.; McKee, M. D.; Karsenty, G. <i>Genes & development</i> 2005, 19, 1093-104.
N	
Nassif 2010	Nassif, N.; Gobeaux, F.; Seto, J.; Belamie, E.; Davidson, P.; Panine, P.; Mosser, G.; Fratzl, P.; Giraud Guille, M.-M. <i>Chemistry of Materials</i> 2010 , 22, 3307-3309.
Nassif 2010B	Nassif, N.; Martineau, F.; Syzgantseva, O.; Gobeaux, F.; Willinger, M.; Coradin, T.; Cassaignon, S.; Azaïs, T.; Giraud-Guille, M. M. <i>Chemistry of Materials</i> 2010 , 22, 3653-3663.
Nawrot 1976	Nawrot, C. F.; Campbell, D. J.; Schroeder, J. K.; Van Valkenburg, M. <i>Biochemistry</i> 1976, 15, 3445–3449.
Nelimarkka 1997	Nelimarkka, L.; Kainulainen, V.; Schönherr, E.; Moisander, S.; Jortikka, M.; Lammi, M.; Elenius, K.; Jalkanen, M.; Järveläinen, H. <i>The Journal of biological chemistry</i> 1997, 272, 12730-7.
Nudelman 2010	Nudelman, F.; Pieterse, K.; George, A.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. A. J.; With, G. D.; Sommerdijk, N. A. J. M. <i>Nature Materials</i> 2010, 9, 9-14.
Nylen 1960	Nylen, M. J., Scott, D. B., and Mosley, V. M. (1960) Mineralization of turkey leg tendon. II. Collagen-mineral relations as revealed by electron and x-ray microscopy, in Sognaes, R. F. (Ed.), <i>Calcification in Biological Systems</i> , pp. 129–142, Am. Acad. for the Advancement of Sci., Washington, DC.
O	
Olszta 2007	Olszta, M. J.; Cheng, X.; Jee, S. S.; Kumar, R.; Kim, Y.-Y.; Kaufman, M. J.; Douglas, E. P.; Gower, L. B. <i>Materials Science and Engineering: R: Reports</i> 2007, 58, 77-116.
P	

- Pasteris **2004** Pasteris, J.D.; Wopenka, B.; Freeman, J.J.; Rogers, K.; Valsami-Jones, E.; van der Houwen, J.A.M.; Silva, M.J. *Biomaterials* 25, 229-238.
- Phleger **1976** Phleger, C.F.; Patton, J.; Grimes, P.; Lee, R.F. *Marine Biology* 1976, 35, 85-89.
- Pietak **2007** Pietak, A. M.; Reid, J. W.; Stott, M. J.; Sayer, M. *Biomaterials* 2007, 28, 4023-32.

Q

R

- Rey **1989** Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T.; Dickson, I. R.; Glimcher, M. J. *Calcified tissue international* 1989, 45, 157-164.
- Rhee **2000** Rhee, S. H.; Tanaka, J. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2000, 11, 449-52.
- Robey **1996** Robey PG, Boskey AL Mineral and matrix. In Feldman D, Jowsey J (eds): "Osteoporosis." San Diego: Academic Press, 1996, pp 95–184.
- Robinson **1952** Robinson, R. A.; Rochester, M. D. *JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY* 1952, 34, 389-434.
- Robinson **1957** Robinson, R. A.; Elliott, S. R. *JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY-AMERICAN VOLUME* 1957, 39, 167-188.
- Robison **1923** Robison, R. *Biochemical Journal* 1923, 17, 286-293.
- Roufosse **1984** Roufosse, a H.; Aue, W. P.; Roberts, J. E.; Glimcher, M. J.; Griffin, R. G. *Biochemistry* 1984, 23, 6115-20.

S

- Saito **1997** Saito, T.; Arsenault, A.L.; Yamauchi, M.; Kuboki, Y.; Crenshaw, M.A. *Bone* 1997, 21, 305-311.
- San Antonio **1994** San Antonio, J. D.; Lander, a D.; Karnovsky, M. J.; Slayter, H. S. *The Journal of cell biology* 1994, 125, 1179-88.
- Shaw **2008** Shaw, W. J.; Ferris, K. *Journal of Physical Chemistry B* 2008, 112, 16975
- Silver **2011** Silver, F. H.; Landis, W. J. *Connective tissue research* 2011, 52, 242-54.

T

- Tampieri **2003** Tampieri, A.; Celotti, G.; Landi, E.; Sandri, M.; Roveri, N.; Falini, G. *Journal of biomedical materials research. Part A* 2003, 67, 618-25.
- Termine **1966** Termine, J. D.; Posner, A. S. *Science* 1966, 153, 1523-1525.
- Traub **1989** Traub, W.; Arad, T.; Weiner, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86, 9822-9826.

U

V

W

- Wang **2011** Wang, Y.; Silvent, J.; Robin, M.; Babonneau, F.; Meddahi-Pellé, A.; Nassif, N.; Giraud Guille, M. M. *Soft Matter* 2011, 7, 9659.
- Wang **2012** Wang, Y.; Azaïs, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriel, P.; Pehau-Arnaudet, G.; Babonneau, F.; Giraud-Guille, M.-M.; Nassif, N. *Nature materials* **2012**, 11, 1-10.
- Weast **1987** Weast, R. C., M. J. Astle, and W. H. Beyer. 1987. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, Fla, p. C-699.
- Weiner **1998** Weiner, S.; Wagner, H. D. *Annual Review of Materials Science* 1998, 28, 271-298.
- Weiner **1999** Weiner, S.; Traub, W.; Wagner, H. D. *Journal of Structural Biology* 1999, 126, 241-255.

Woodhead-
Galloway **1982**

Woodhead-Galloway, J. The anatomy of a protein 1982 London : Edward Arnold

X
Y
Z

Chapitre IV. L'interface collagène/apatite

I. Etude Bibliographique	145
1. Les phases précurseurs de l'apatite biologique	145
2. Phases précurseurs et hydrogénophosphates	150
3. Le rôle de l'eau dans les apatites biologiques et synthétiques	152
II. Caractérisation de la couche amorphe hydratée.....	154
1. Etude des différents environnements des noyaux ^1H et ^{31}P par RMN	155
1.1 Etude de la dynamique CP	155
1.2 Etude par la séquence de double polarisation croisée $^1\text{H}\rightarrow^{31}\text{P}\rightarrow^1\text{H}$	159
III. Etude par RMN de l'interface collagène/apatite	164
1. Séquences RMN pour l'étude d'interfaces.....	164
2. Etudes bibliographique sur l'utilisation de la séquence REDOR.....	166
3. Etude par RMN à l'état solide de l'interface collagène-apatite	170
3.1 Séquence double CP	171
3.2 Séquence REDOR.....	172
IV. Conclusions	178
Références bibliographiques	179

L'interface collagène/apatite

La nucléation, la croissance et la morphologie des particules d'apatite dans l'os sont régulées par la présence d'une interface entre les biomolécules et la phase inorganique. Comme le rôle exact de ces biomolécules pendant la minéralisation reste un sujet de débat, une étude fine des interfaces pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de biominéralisation, en particulier le rôle que joue la matrice de collagène pendant ce procédé. Dans ce chapitre, nous avons d'abord essayé de caractériser la surface des particules d'apatites synthétiques et biologiques. Ensuite nous avons étudié l'interaction entre la surface apatitique et des molécules en contact avec cette phase *in vivo* que sont l'eau et le collagène. Pour ceci nous avons utilisé le modèle mimétique de l'os, Coll/CHA(SBF) décrit au chapitre III.

I. Etude Bibliographique

1. Les phases précurseurs de l'apatite biologique

En raison de la variation permanente de la composition de l'os au cours du vieillissement, la formation de phases minérales intermédiaires moins cristallines que l'hydroxyapatite ont été proposées. Ces phases précurseurs seraient formées dans un premier temps pendant la calcification des tissus osseux. Ensuite ces précurseurs seraient transformés ou remplacés par l'apatite pendant l'étape de maturation.

Trois phases précurseurs potentielles sont souvent proposées dans la littérature depuis une cinquantaine d'années :

- La brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Neuman, 1975B),
- Le phosphate d'octacalcium (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Brown, 1966)
- Une phase de phosphate de calcium amorphe (ACP) (Termine, 1967).

A noter que l'ion hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) est présent dans la structure de ces trois potentiels précurseurs d'apatite biologique.

Nous avons d'abord comparé les paramètres structuraux de ces trois phases de phosphate de calcium :

La brushite a une structure monoclinique de groupe d'espace $I2/a$ ($a=5,812\pm 0,002\text{\AA}$ $b=15,180\pm 0,003\text{\AA}$ $c=6,239\pm 0,002\text{\AA}$ $\beta=116^\circ 25' \pm 2'$) (Fig. 1), constituée de deux couches parallèles à l'axe y : la 1^{ère} couche contient les ions calcium et phosphate. La 2^{ème} est formée par l'eau de structure. Les ions Ca^{2+} sont entourés de six anions O^{2-} et de deux oxygènes de molécules d'eau (Curry, 1971).

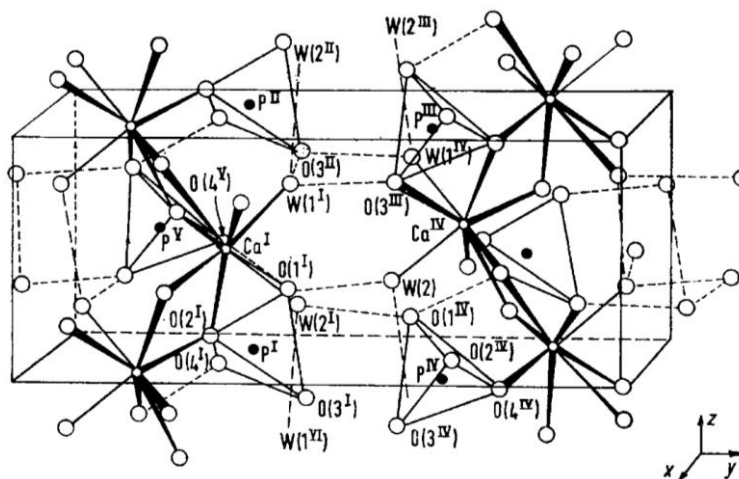


Figure 1 : Maille de brushite (D'après de Curry, 1971)

Dans ce réseau cristallin, les molécules d'eau se trouvent sur deux sites différents, ce qui explique l'apparition de deux signaux pour cette eau de structure à 4,1 ppm et 6,4 ppm sur le spectre RMN ^1H (Fig. 2). La liaison P-OH dans les HPO_4^{2-} étant très forte, le proton dans le groupe hydrogénophosphate présente un signal RMN déblindé à 10,4 ppm (Yesinowski, 1987). En raison de l'interaction dipolaire homonoléaire $^1\text{H}-^1\text{H}$ forte dans ce matériau qui conduit à un élargissement des signaux ^1H , l'interprétation exacte des spectres est difficile. En utilisant les outils de modélisation basés sur l'approche GIPAW (Gauge Included Projector Augmented Wave, Pickard 2001), Pourpoint *et al.* ont rendu possible l'interprétation des spectres (Pourpoint, 2008) (Fig. 2), grâce à la corrélation établie entre le déplacement chimique ^1H et la distance $\text{OH}\cdots\text{O}$; la valeur de déplacement chimique augmentant à mesure que la liaison H devient plus forte.

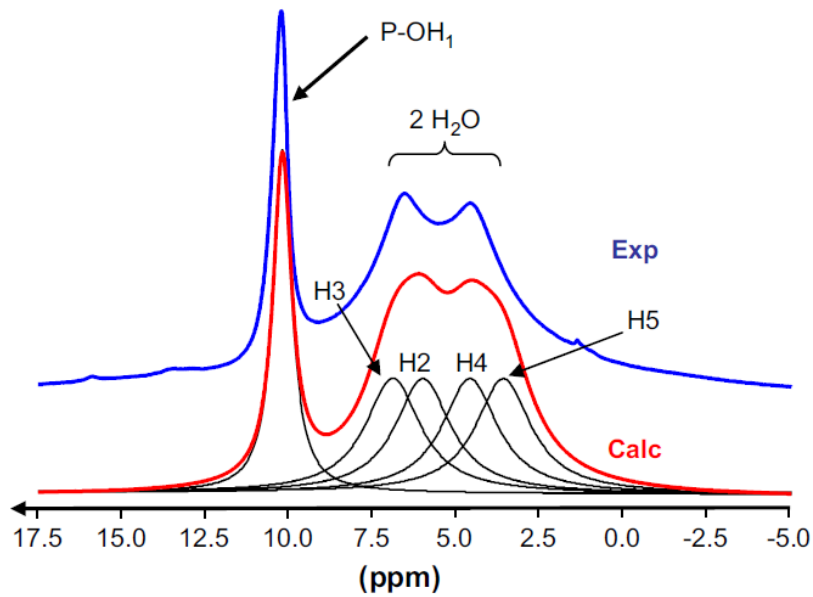


Figure 2 : Spectres ^1H RMN MAS (expérimental et calculé) de la brushite ($B_0 = 17,6 \text{ T}$, $\gamma_{\text{MAS}} = 34 \text{ kHz}$) (D'après Pourpoint, 2008)

La structure de l'OCP ($\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) est de symétrie triclinique ($a=19,7\text{\AA}$; $b=9,6\text{\AA}$; $c=6,9\text{\AA}$; $\alpha=\beta=90,7^\circ$ et $\gamma=71,8^\circ$), et donc différente de la structure hexagonale de l'HAP. Néanmoins, Brown et al. (Brown, 1966 & 1976 & 1979) ont relevé de nombreuses analogies structurales entre ces deux phases (Fig. 3). La structure de l'OCP peut être décrite comme une alternance de couches « apatitiques » et de couches « hydratées », ces deux couches de structure différente étant juxtaposées selon le plan c . Ainsi Brown et al. (Brown, 1979) ont proposé que la formation de la phase apatitique corresponde à la perte de l'eau structurale de la couche « hydratée » dans la phase OCP.

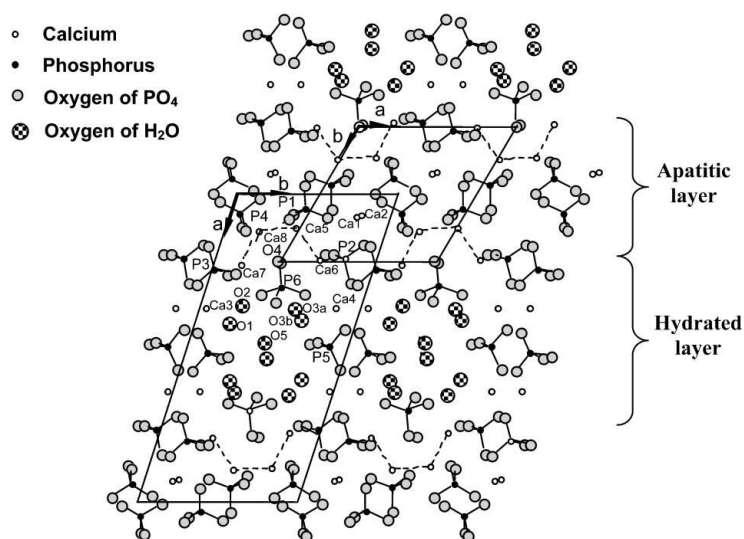


Figure 3: Projection de la structure de l'OCP dans le plan (001) - Le losange supérieur est analogue à la structure apatitique ; le quadrilatère inférieur délimite la maille de la structure de l'OCP. Les molécules d'eau sont présentes uniquement dans la couche « hydratée » (Cazalbou, 2004).

La phase OCP est thermodynamiquement moins stable que l'hydroxyapatite. Elle a été identifiée comme une phase intermédiaire avant la formation de l'hydroxyapatite dans des études *in vitro* (Nancollas, 1974 & Eanes, 1977). Tseng *et al.* ont observé une évolution de la nature et de la morphologie des particules de phosphate de calcium en chauffant une solution saline à 100°C avec un temps de réaction varié (Tseng, 2006), les plaquettes d'OCP se transformant en bâtonnets hexagonaux d'HAp après 12 h de réaction (Fig. 4).

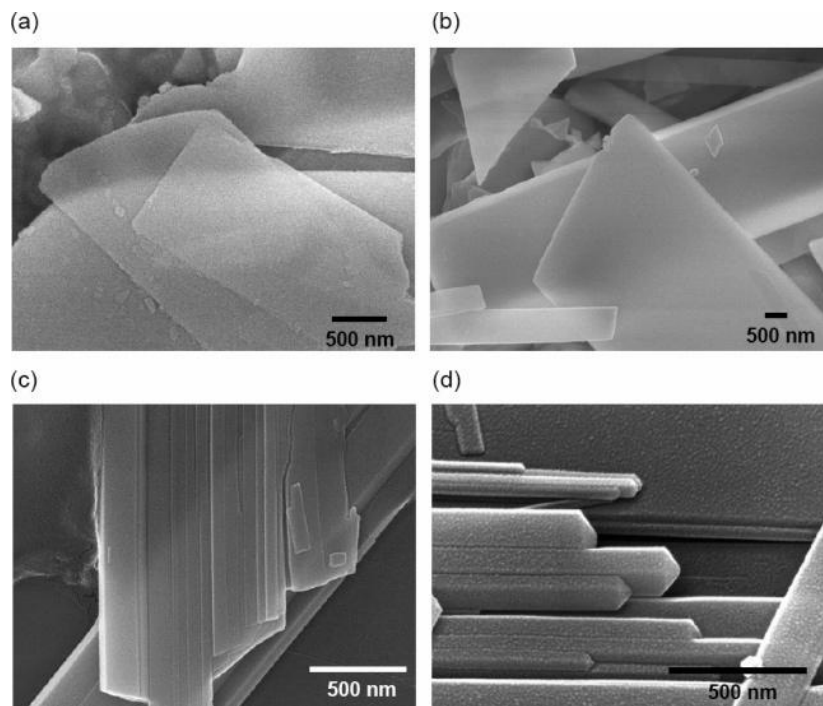


Figure 4 : Clichés de MEB de particules d'OCP se transformant en HAp : a) 1,5 h, b) 3 h, c) 4 h et d) 12 h de réaction (D'après Tseng, 2006)

L'ACP (Amorphous Calcium Phosphate) correspond à une phase amorphe dont la composition chimique est variable : $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($x/y_{\text{molaire}} = 1,0\sim 2,2$ et $n = 3\sim 4,5$). La présence de cette phase est souvent définie par (i) l'observation d'un pic de diffraction large à 30° (Raie K- α du Cuivre) par DRX ; (ii) une unique bande d'absorption IR large à 600 cm^{-1} ; (iii) l'observation par MET de sphères creuses d'environ 200 Å de diamètre ; (iv) un signal RMN ^{31}P large à 3,0 ppm (Harper, 1966 ; Termine, 1966 ; Eanes, 1970 & Termine, 1972).

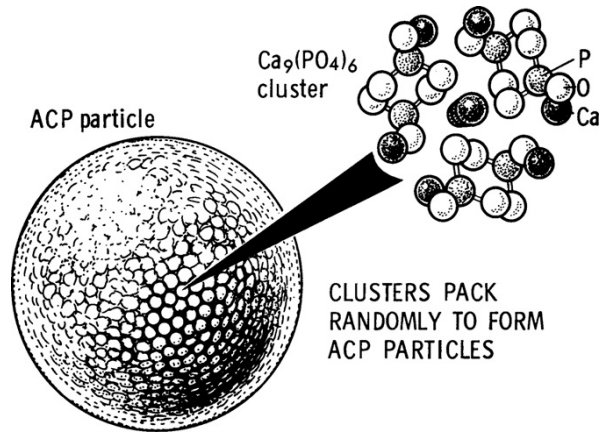


Figure 5 : Modèle de particules d'ACP construit à partir de clusters de Posner (D'après Betts, 1975)

Malgré l'absence de structure cristalline dans cette phase d'ACP, la présence d'unités structurales ont été proposés par Betts *et al.* (Betts, 1975), dans lesquelles un ion calcium central est coordonné aux oxygènes des six orthophosphates (PO_4^{3-}) qui l'entourent. Ces ions orthophosphates sont à leur tour stabilisés par huit ions calcium qui se trouvent eux sur la couche externe de cette sous-unité (Fig. 5). Cette structure neutre $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ d'un diamètre d'environ $9,5 \text{ \AA}$, appelée cluster de Posner, a un axe de symétrie S_6 (Treboux, 2000 & Onuma, 2006). Les interactions électrostatiques, les interactions hydrophobes et la présence de l'eau inter-clusters, assurent la cohésion entre clusters de Posner qui forment les particules d'ACP (Georgalis, 2000). La structure du cluster de Posner est en fait similaire à celle de motifs trouvés dans hydroxyapatite, l'OCP et le β -TCP (Tri-Phosphate de calcium). Ainsi la figure 6 montre la relation entre le cluster de Posner et la structure d'hydroxyapatite (Combes, 2010).

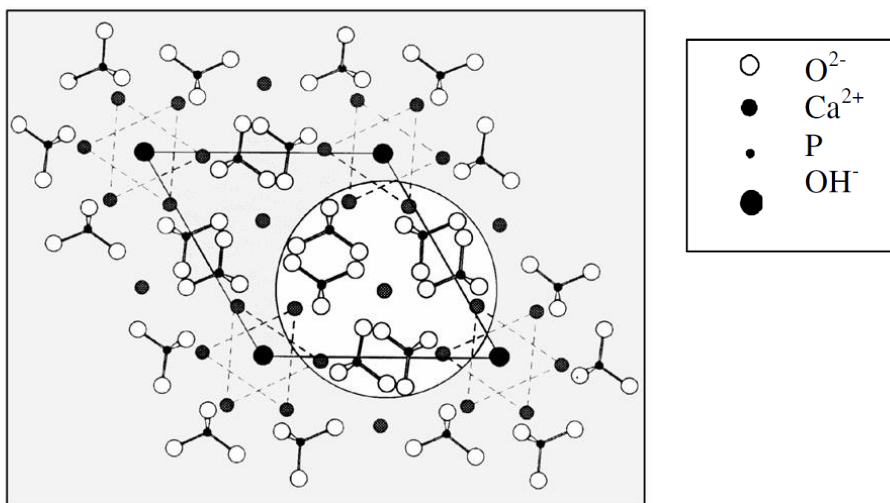


Figure 6 : Maille de l'hydroxyapatite selon le plan (001) sur laquelle le cluster de Posner est isolé par un cercle noir (D'après de Combes, 2010)

La transformation d'une phase d'ACP en HAp (Fig. 7) lors d'une synthèse d'apatite par lyophilisation d'une solution a été observé par Kim (Kim, 2005) : les nanoparticules initialement de forme sphérique avec un diamètre de 200 Å à 1000 Å, se transforment ensuite en solution en une phase cristallisée apatitique, sous forme de bâtonnets allongés.

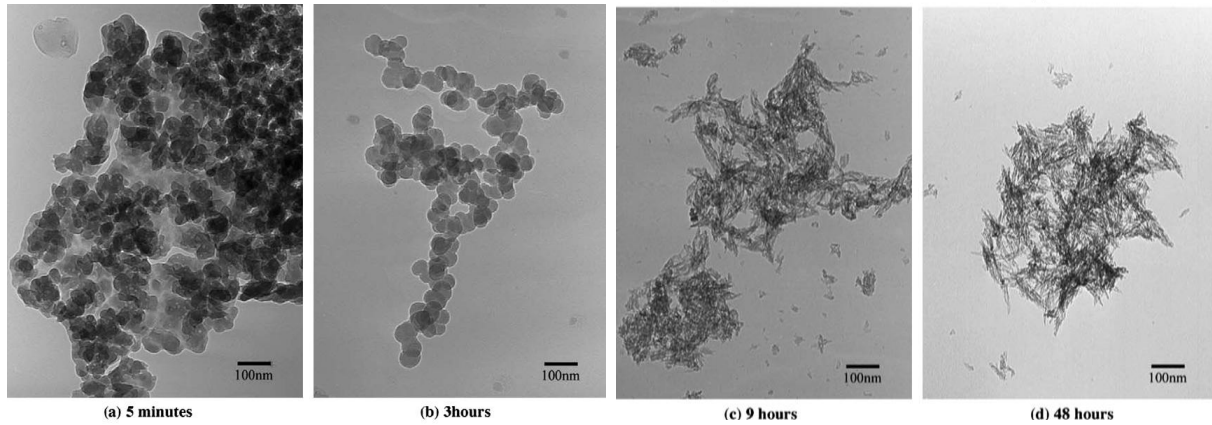


Figure 7: Clichés de MET montrant la transformation des particules d'ACP en HAp à 5 min, 3h, 9h et 48h de réaction. a), b) Sphères d'ACP, c), d) particules de HAp. (D'après Kim, 2005)

Il est important de rappeler qu'une phase précurseur d'HAp biologique n'a jamais été observée dans le tissu osseux *in vivo*. Les techniques actuelles ne nous permettent pas d'observation directe à cause de la complexité de ces matériaux composites, ce qui laisse ouverte la question sur la présence ou non de cette phase précurseur *in vivo*.

L'environnement chimique du phosphore-31 dans ces trois phases de phosphate de calcium est caractéristique, ce qui se traduit par les valeurs de déplacement chimique résumées dans le tableau 1.

Echantillon	δ (^{31}P) ppm
Hydroxyapatite cristallisée	2,8
Brushite	1,4
OCP	de 3,8 à -1,9
ACP	3,0

Tableau 1 : Déplacements chimiques ^{31}P des différentes phases de phosphate de calcium

2. Phases précurseurs et hydrogénophosphates

La proposition de l'existence de phases précurseurs de l'hydroxyapatite *in vivo* est basée sur des résultats expérimentaux qui ont mis en évidence la présence de groupes hydrogénophosphates HPO_4^{2-} dans l'apatite biologique.

Les premiers travaux réalisés par l'équipe de Glimcher (Roufosse, 1984 & Wu, 1994) sur l'os de poule lyophilisé et broyé, ont mis en évidence par RMN ^{31}P une proportion significative de groupes hydrogénophosphates HPO_4^{2-} dans la bioapatite. Le comportement du signal enregistré par la séquence de polarisation croisée, des hydrogénophosphates dans cette phase est similaire à celui des HPO_4^{2-} dans la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Les auteurs ont alors proposé que ces groupes HPO_4^{2-} se trouvent soit à la surface, soit au sein de la bioapatite. Néanmoins ces sites se différencient par leur anisotropie de déplacement chimique (Kolodziejski, 2005). La présence de brushite a aussi été remise en question par Roberts *et al.* (Roberts, 1992), qui n'ont pas détecté par DRX d'autres phases cristallines que l'apatite dans les échantillons d'os.

Les études de fémur de rats menées par Posner *et al.* (Harper, 1966 & Termine, 1966) ont montré la présence d'ACP dans les bioapatites à l'aide de la DRX et de la spectroscopie IR. Cette phase d'ACP a aussi été mise en évidence dans la dentine de rat par des études de RMN (Huang, 2009). Il est proposé qu'une phase d'ACP entoure les particules de bioapatite de la dentine. De plus, des études de relaxation du noyau ^{31}P ont montré que l'apatite d'os et d'émail dentaire de bovin possédait une grande proportion de HPO_4^{2-} (Wu, 2002). Ces auteurs proposent que ces ions soient concentrés à la surface des particules d'apatite biologique ; leur concentration étant plus importante lorsque le tissu est jeune.

En plus, dans le tissu osseux, la quantité d'hydrogénophosphates contenue dans la phase minérale diminue pendant la maturation avec l'augmentation concomitante des groupements phosphates (Termine, 1966). En effet, il est proposé que la maturation des apatites corresponde à la transformation thermodynamique lente de la couche hydratée amorphe en structure apatitique stable. La diminution du déficit en calcium des bioapatites est aussi observée pendant la maturation du tissu osseux, le ratio Ca/P s'approche de la valeur stœchiométrique 1,67 (Termine, 1966 & Rey, 1995), et s'accompagne d'une augmentation du taux des carbonates (Rey, 1989).

D'autre part, Jäger *et al.* (Jäger, 2006) ont proposé par des études de RMN à l'état solide qu'une couche, appelée « non-apatitique » par les auteurs, contenant beaucoup d'hydrogénophosphates enveloppe les nanoparticules d'une apatite synthétique. Ils ont alors proposé un modèle (Fig. 8) pour décrire la structuration des nanoparticules d'apatite. D'après ces auteurs, la couche non-apatitique serait fortement hydratée et aurait une composition chimique proche de celle de l'OCP.

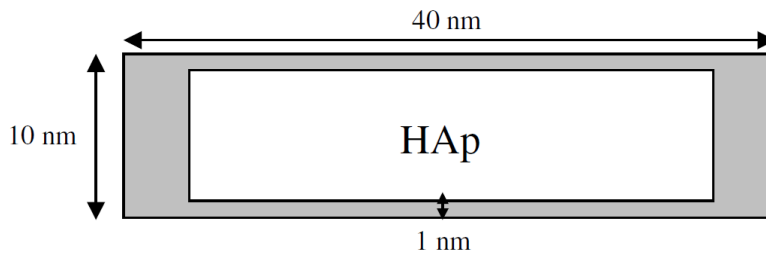


Figure 8: Modèle structural de nanoparticules d'apatite synthétiques consistant en un cœur apatitique cristallisé et une couche hydratée amorphe à la surface (épaisseur ~1nm) (D'après Jäger, 2006)

Un modèle structural similaire à celui-ci a été également proposé par l'équipe de Rey (Cazalbou, 2004 & Rey, 2007), dans lequel les nanoparticules d'apatite carbonatée synthétiques sont composées d'un cœur d'apatite cristalline et d'une couche non-apatitique fortement hydratée, les ions composant cette couche étant particulièrement labiles en solution.

Des ions hydrogénophosphates (HPO_4^{2-}) ont ainsi été identifiés dans les apatites biologiques et certaines apatites synthétiques. Certains auteurs ont proposé que ces ions soient issus d'une phase précurseur de l'apatite, telle que la brushite, l'OCP et l'ACP. Néanmoins, cette transformation n'a jamais été observée *in vivo*. Enfin, la majorité des auteurs proposent que ces ions HPO_4^{2-} soient situés en surface des particules, en formant une phase distincte de la phase apatitique avec une composition chimique proche de l'OCP.

3. Le rôle de l'eau dans les apatites biologiques et synthétiques

L'eau qui est le troisième composant le plus important de l'os après la phase minérale et le collagène, représente jusqu'à 20% de la masse osseuse (Mueller, 1966). La quantité d'eau présente dans le tissu osseux diminue avec l'âge ; ceci entraîne une diminution de ses propriétés mécaniques (Zioupou, 1998). Donc le rôle de l'eau ne peut pas être négligé dans l'étude de l'interface organo-minérale.

La plus grande part de l'eau comprise dans l'os y circule dans des pores macroscopiques (les canalicules : 100-600 nm en diamètre) ; elle est appelée « eau libre » et son rôle est de diffuser les éléments nutritifs. Les études d'échange de H_2O par D_2O *in vivo* menées par Edelman *et al.* ont montré que 95% de l'eau contenue dans l'os de chien est échangeable (Edelman, 1954). Fernández-Seara *et al.* ont découvert qu'il existe deux vitesses d'échange pour l'eau dans l'os (Fernández-Seara, 2002). Si la majorité de l'eau s'échange rapidement, une fraction significative possède un coefficient de diffusion de quatre ordres de grandeur plus lents que l'eau « libre ». Cette fraction est fortement liée à la phase minérale et

à la matrice organique. Les auteurs proposent que cette eau « interstitielle », se situe dans des espaces mésoscopiques existant entre les phases minérale et organique qui sont beaucoup plus petits que les canalicules du tissu osseux.

Ces deux catégories d'eau ont aussi été identifiées par ATG : au dessous de 200 °C, la perte de masse correspond à la perte d'eau « libre ». L'eau « interstitielle » quant à elle, part entre 200°C et 400°C, et cette perte est irréversible (Legeros, 1978).

Cette eau « interstitielle » joue un rôle important dans la stabilité des phases organique et minérale. Son rôle structural dans le tissu osseux a été démontré par Ramamoorthy *et al.* (Zhu, 2009 & Zhu, 2010) par comparaison entre des spectres RMN du ^{13}C de l'os frais et séché. Le spectre de l'os frais présente une résolution spectrale meilleure que celui de l'os séché ; ceci met en évidence l'importance de l'eau pour maintenir la structure du tissu osseux. Sa présence est aussi fondamentale pour maintenir l'organisation spatiale des fibrilles de collagène. En effet, dans les années 90, ce rôle a été démontré par RMN ^{13}C par Saitô *et al.* par comparaison de spectres RMN ^{13}C de tendons de bovin hydratés et déshydratés (Saitô, 1992). Ils ont suggéré que le séchage d'une matrice de collagène correspondait à une réorganisation locale de la conformation, ce qui se traduit par l'élargissement des signaux ^{13}C du collagène après séchage.

Sur la base de la co-existence de l'eau « interstitielle » et de l'eau « libre », Wilson *et al.* ont proposé un modèle (Fig. 9) pour rendre compte du rôle de l'eau dans le tissu osseux (Wilson, 2005). L'eau « interstitielle » stabiliserait la surface de la phase minérale, confinée entre cette dernière et le collagène, elle assurerait ainsi l'association du minéral avec la matrice organique afin de conférer à l'os sa résistance mécanique unique.

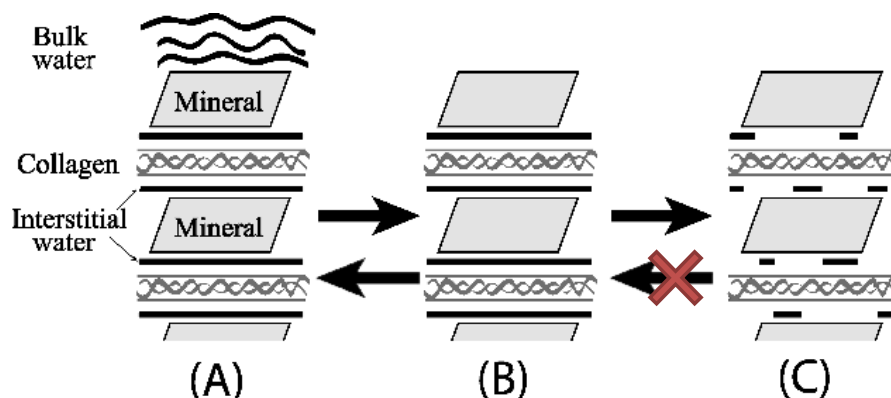


Figure 9: Deux types d'eau, « libre » et « interstitielle » existent dans l'os. L'eau « interstitielle » se trouve entre la phase minérale et la phase organique (A). L'eau « libre » peut s'évaporer rapidement de l'os et cette étape est réversible (B). Par contre, la perte de l'eau « interstitielle » est irréversible (C) (D'après Wilson, 2005)

Enfin, Neuman *et al.* ont observé qu'une quantité notable de l'eau se trouverait dans la structure des nanoapatites de l'os (Neuman, 1956 ; Neuman, 1958 ; Neuman, 1975 ; Cazalbou, 2004); cette eau dite « de structure » joue aussi un rôle fondamental dans les propriétés mécaniques de l'os (Wilson, 2005 ; Wilson, 2006). Elle pourrait être localisée dans un site lacunaire du calcium, mais aussi dans le canal des ions d'hydroxydes, afin de stabiliser le réseau cristallin des apatites carbonatées instable, à cause de sa quantité importante de défauts cristallins.

Au moins trois types d'eau ont donc été identifiés dans l'os, le réseau des molécules d'eau n'est sans doute pas figé et les réactions d'échange possible entre ces molécules n'est sans doute pas négligeable. En raison de leur nature relativement rigide, les molécules d'eau « interstitielle » et « de structure » peuvent être étudiées par RMN à l'état solide afin de confirmer leur présence à la surface des particules d'apatite et leur rôle au niveau des interfaces minéral/organique et minéral/minéral.

II. Caractérisation de la couche amorphe hydratée

En accord avec ce qui a été reporté dans la littérature, nous avons aussi mis en évidence dans le chapitre II, la présence d'une couche amorphe à la surface des particules de bioapatite et des apatites synthétiques carbonatées. Avant de mieux caractériser l'interface organo-minérale dans ces échantillons, il est important d'essayer de mieux connaître les caractéristiques physicochimiques de cette couche hydratée.

Nous avons dans ce chapitre, étudié plus en détails par RMN ^{31}P et ^1H la couche amorphe de l'apatite CHApD obtenue par la méthode de diffusion de vapeur d'ammoniac et chauffées au maximum à 37°C . Cette apatite a déjà été caractérisée dans le chapitre II : elle est sous forme de plaquettes avec un état de cristallinité caractérisée par DRX proche de celui de la bioapatite. Les études par RMN ont mises en évidence la présence significative d'une phase amorphe dans cette apatite, en particulier grâce à l'expérience d'HETCOR $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ qui est rappelé sur la figure 10.

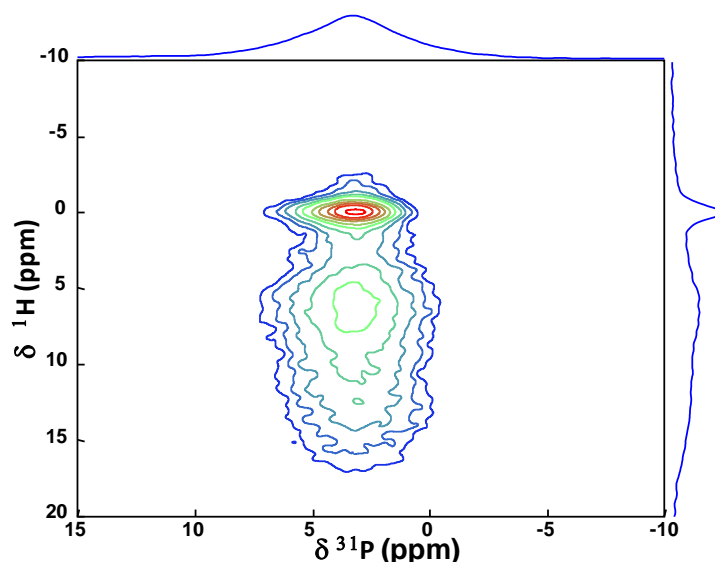


Figure 10: Cartes ^1H - ^{31}P HETCOR de l'échantillon CHApD ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp}} = 1 \text{ ms}$)

Les sites phosphates présents dans cette phase corrélient avec une distribution assez large de protons, dont les résonances sont majoritairement centrées vers 5 ppm (protons de molécules d'eau), mais avec des valeurs s'étalant jusque vers 15 ppm, valeur caractéristique de sites P-OH. Afin de mieux caractériser l'environnement protonné de ces phosphates, une étude par polarisation croisée ^1H - ^{31}P a tout d'abord été réalisée.

1. Etude des différents environnements des noyaux ^1H et ^{31}P par RMN

1.1 Etude de la dynamique CP

La figure 11 montre deux spectres ^{31}P MAS enregistrés sur CHApD avec un temps de contact court, 100 μs et un long, 10 ms. Nous constatons une apparente diminution de la largeur de raie en augmentant le temps de contact, t_{cp} , ce qui laisse supposer que les intensités des pics de résonance ^{31}P qui composent ce signal n'ont pas les mêmes comportements en fonction du temps de contact. Nous avons simulé les spectres (Fig. 11) en utilisant les deux formes de raie extraites de la carte ^1H - ^{31}P HETCOR (Tab. 2) comme cela a été fait dans le chapitre II : le signal ^{31}P de la phase apatitique ($\delta_{31\text{P}}=2,9 \text{ ppm}$; FWHM=140 Hz) est quasiment le seul détecté à fort temps de contact, alors que celui de la phase amorphe hydratée ($\delta_{31\text{P}}=2,9 \text{ ppm}$; FWHM=430 Hz) est facilement détectée à faible temps de contact.

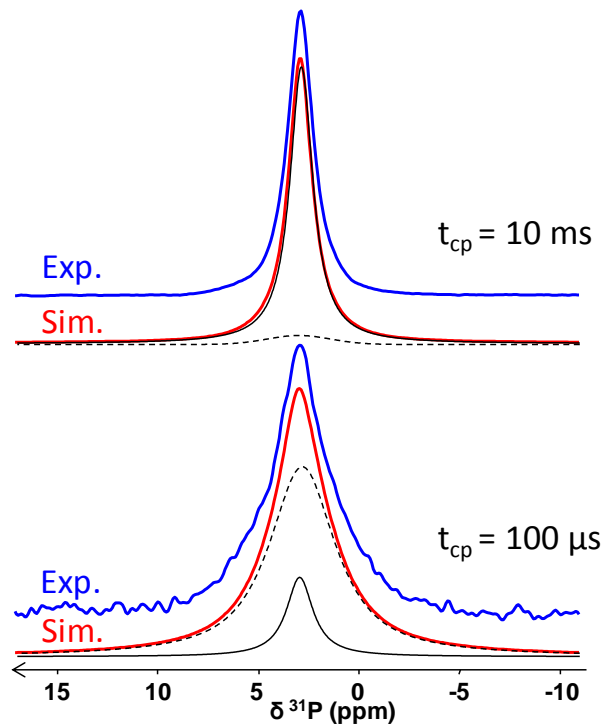


Figure 11 : Spectres RMN CP MAS $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ expérimentaux (bleu) et simulés (rouge) à l'aide des signaux de l'apatite cristalline (noir) et de la phase amorphe hydratée (noir pointillé) ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\gamma_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$)

L'intensité des pics est ensuite tracée en fonction du temps de contact t_{cp} pour des valeurs comprises entre $100 \mu\text{s}$ et 10 ms (Fig. 12), et les courbes obtenues confirment une dynamique de transfert de polarisation très différente pour les signaux ^{31}P des deux phases.

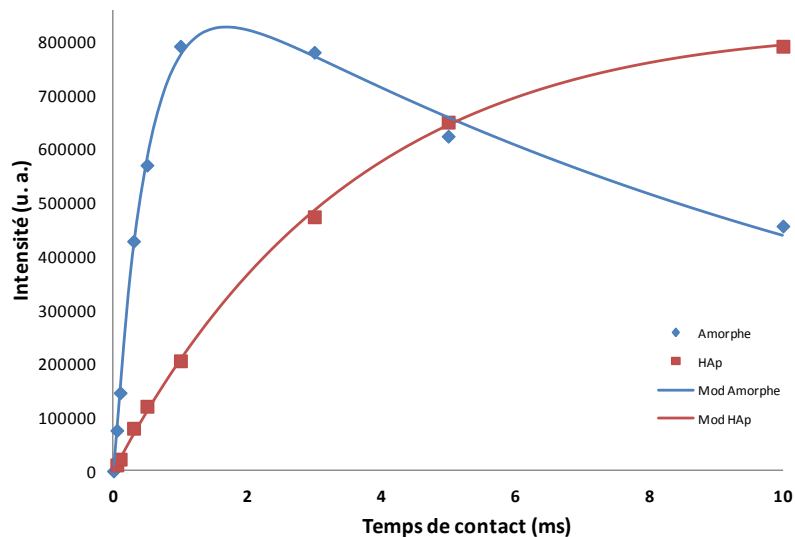


Figure 12: Comparaison des courbes d'évolution de l'aimantation du signal ^{31}P de la phase apatitique (rouge) et de celui de la phase amorphe hydratée (bleu) lors d'expériences de RMN CPMAS $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ ($\gamma_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$) enregistrée sur CHApD.

Ces courbes peuvent être analysées pour extraire les temps caractéristiques qui gèrent ce transfert d'aimantation. La force motrice de ce transfert étant le couplage dipolaire hétéronucléaire, ici $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$, cette dynamique dépend fortement de l'environnement protonné local du spin étudié (ici ^{31}P). Plusieurs modèles pour rendre compte du transfert de

polarisation pendant une séquence CP ont été proposés (Müller, 1974 ; Hester, 1975 ; Naito, 1986 & Levitt, 1986), le plus simple étant le modèle dit « I-S ». Dans ce cas, on considère que les interactions dipolaires I-I entre spins abondants ($I = {}^1\text{H}$) sont plus grandes que les interactions hétéronucléaires I-S ($S = {}^{31}\text{P}$). Une approche thermodynamique, en considérant le système de spin I comme un bain thermique caractérisé par une grande capacité calorifique, peut alors être développée. L'équilibre entre les spins I s'établit rapidement à travers un phénomène de diffusion de spins qui correspond à des flips-flops simultanés de paires I-I. L'évolution de l'aimantation en fonction du temps de contact t_{cp} peut être alors modélisée de la manière suivante (éq. 1) :

$$M_S(t_{cp}) = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} M_S^{eq} \frac{1}{1 - T_{IS}^1 / T_{1\rho}^I} \left[\exp\left(-\frac{t_{cp}}{T_{1\rho}^I}\right) - \exp\left(-\frac{t_{cp}}{T_{IS}^1}\right) \right] \quad (1)$$

avec M_S^{eq} l'aimantation à l'équilibre des spins S dans le champ magnétique statique B_0 , M_S l'intensité du signal, T_{IS}^1 le temps de relaxation croisée lié au couplage dipolaire I-S, t_{cp} le temps de contact et $T_{1\rho}^I$ le temps de relaxation des spins abondants dans le repère tournant qui peut entraîner une perte d'aimantation pour de longs temps de contact.

Un autre modèle dit I-I*-S peut être utilisé lorsque le spin S, parmi le bain de spins I, a un couplage dipolaire fort avec un (ou des) spins particulier(s) I^* , comme par exemple un groupement ${}^{13}\text{C}-{}^1\text{H}$ au sein d'un composé organique. Cela se reflète sur la courbe de variation de l'aimantation en fonction du temps de contact par une variation rapide à faible temps de contact pilotée par le couplage dipolaire fort I*-S, suivie d'une variation plus lente s'apparentant à celle du modèle I-S.

Afin d'interpréter nos courbes expérimentales, nous avons utilisé le modèle classique I-S puisque nous n'observons pas nettement deux régimes dans la montée de polarisation.

La valeur des paramètres trouvés est résumée dans le tableau 2 :

	M_S^{eq} (u. a.)	T_{HP} (ms)	$T_{1\rho}^{1H}$ (ms)
Phase d'apatite	$365 * 10^3$	3,9	∞
Phase amorphe	$383 * 10^3$	0,5	12

Tableau 2 : Paramètres CP obtenus par modélisation des courbes de montée de polarisation pour CHApD

Ce qu'il faut immédiatement noter, ce sont les valeurs de $T_{1\rho}^{1H}$ très différentes pour les deux types de protons, tendant vers l'infini (à l'échelle expérimentale) pour les hydroxydes de la phase d'apatite et de seulement une dizaine de millisecondes pour les protons de la phase hydratée. Cette différence montre que ces deux familles de protons sont bien dans deux phases distinctes. Quant au temps de relaxation croisée T_{HP} , il est plus long dans la phase d'apatite que dans la phase amorphe, ceci est dû à une différence de distance H-P, ce qui entraîne une variation de couplage dipolaire. Dans la phase apatitique, les deux protons les plus proches du phosphore sont à une distance de 0,4 nm, suivis de quatre autres protons à 0,6 nm. Dans la phase amorphe, les protons ont été identifiés à des molécules d'eau et à des groupes hydrogénophosphates. Pour ces derniers, il est clair que la distance H-P est plus courte (0,21 nm). La faible valeur de T_{IS} suggère que les molécules d'eau sont aussi très proches spatialement des sites phosphates.

A partir de ces simulations, nous avons aussi déduit le rapport molaire de sites phosphates dans ces deux phases grâce aux valeurs de M_s^{eq} et trouvé des quantités équivalentes pour les deux phases, en cohérence avec la déconvolution directe du spectre RMN MAS $\{^1H\}^{31P}$.

Le même type d'expérience a été réalisé pour l'os sec (bioapatite) dans lequel les deux mêmes phases sont observées pour la phase minérale (Fig. 13).

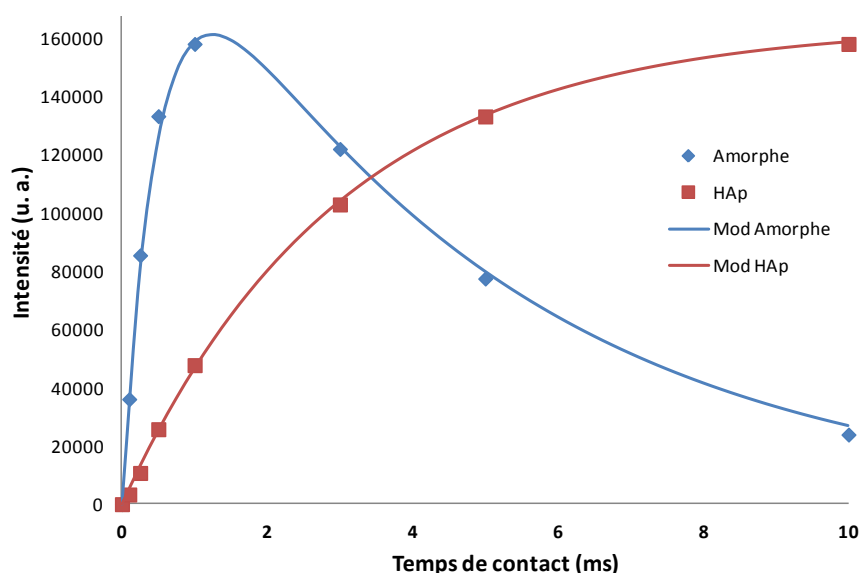


Figure 13 : Comparaison des courbes d'évolution de l'aimantation de phase apatitique (rouge) et de la phase hydratée (bleu) dans l'os sec obtenue par RMN CPMAS 31P à 8 kHz.

Les résultats des simulations de ces courbes par le modèle I-S sont regroupés dans le tableau 3. Ils sont très similaires à ceux trouvés pour l'échantillon CHApD et montrent bien que les deux familles de phosphates dans la phase d'apatite et dans la phase amorphe ont des environnements protonnés très différents, avec sans doute une part importante, même si non quantifiable actuellement de groupements hydrogénophosphates dans la phase amorphe hydratée.

	M_s^{eq}	T_{HP} (ms)	$T_{1\rho}^{1H}$ (ms)
Phase d'apatite	$70 * 10^3$	3,0	∞
Phase amorphe	$86 * 10^3$	0,5	4,6

Tableau 3 : Paramètres CP obtenus par modélisation des courbes de montée de polarisation enregistrées pour un échantillon d'os sec

Nos résultats sont en accord avec une étude analogue déjà publiée dans la littérature et portant sur des apatites de synthèse (Jäger, 2006). Les deux signaux ^{31}P , correspondant à une relaxation du proton dans le repère tournant rapide et lente respectivement, ont été observés et attribués respectivement à la phase de surface et la phase du cœur cristallin des particules d'apatite.

Grâce à ces études de dynamique de CP $^1\text{H}-^{31}\text{P}$, nous avons mis en évidence une grande similarité de comportement pour les signaux associées aux phases cristalline et amorphe présentes dans les échantillons CHApD et d'apatite biologique. Ceci montre une forte analogie à l'échelle locale des environnements protonnés des sites phosphates dans ces deux types d'échantillons, et confirme encore, le fait que l'échantillon CHApD puisse être considéré comme un bon modèle de la partie minérale du tissu osseux.

1.2 Etude par la séquence de double polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$

Les études RMN précédentes (HETCOR $^1\text{H}-^{31}\text{P}$, dynamique de polarisation croisée $^1\text{H}-^{31}\text{P}$..), nous ont fortement suggéré la présence de groupes hydrogénophosphates dans la couche amorphe hydratée présente dans l'échantillon CHApD et dans la bioapatite. Nous avons donc essayé pour CHApD, de mettre directement en évidence ces groupes P-OH à partir du spectre RMN ^1H .

Sur le spectre RMN ^1H obtenu en acquisition directe (Fig. 14 noir), le signal de l'eau adsorbée (5 ppm) est trop intense pour observer clairement les autres signaux. Par contre, la projection du spectre RMN HETCOR ^1H - ^{31}P selon la dimension ^1H (Fig. 14 bleu) permet de s'affranchir du signal de l'eau physisorbée, mobile et donc non détectée par polarisation croisée, et de n'observer que les protons qui ont participé au transfert de polarisation et qui sont à proximité des ions phosphates. Nous avons choisi un temps de contact de 1 ms afin de privilégier des distances ^1H - ^{31}P plutôt courtes. Le signal des OH^- apatitiques à 0 ppm est très net. Les signaux s'étalant entre 3 et 17 correspondent à la couche externe des particules d'apatite qui présente une grande distribution d'environnements chimiques au niveau des protons (Jäger, 2006).

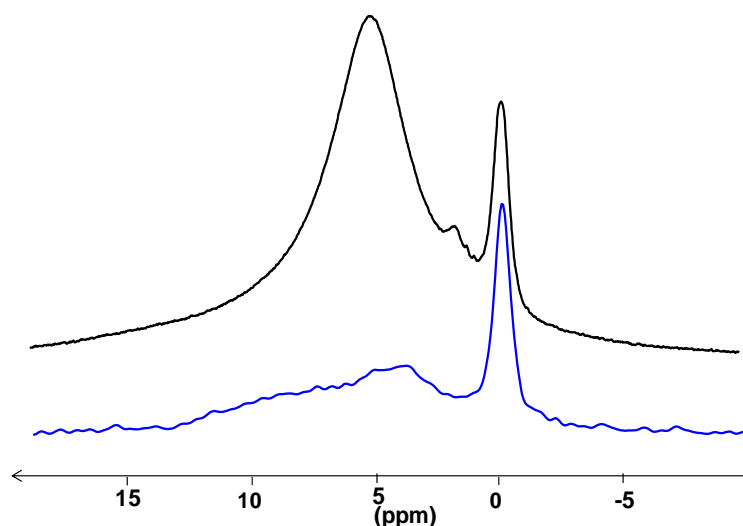


Figure 14: Spectre RMN MAS ^1H (noir) ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$) et projection de l'expérience d'HETCOR selon la dimension ^1H ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 14 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp}} = 1 \text{ ms}$) (bleu) pour CHApD.

Afin de mieux identifier ces différents sites ^1H , il faudrait enregistrer des cartes HETCOR en variant le temps de contact et en particulier en utilisant de très faibles temps de l'ordre de $100 \mu\text{s}$ afin d'être très sensible aux courtes distances $^1\text{H}\dots^{31}\text{P}$. Or à ces faibles temps, le transfert de polarisation est peu efficace et l'enregistrement d'une expérience HETCOR à deux dimensions est très coûteux en temps d'expérience. A titre d'exemple, il faut une dizaine d'heures déjà avec un temps de contact de 1 ms dans les conditions expérimentales que nous avons employées.

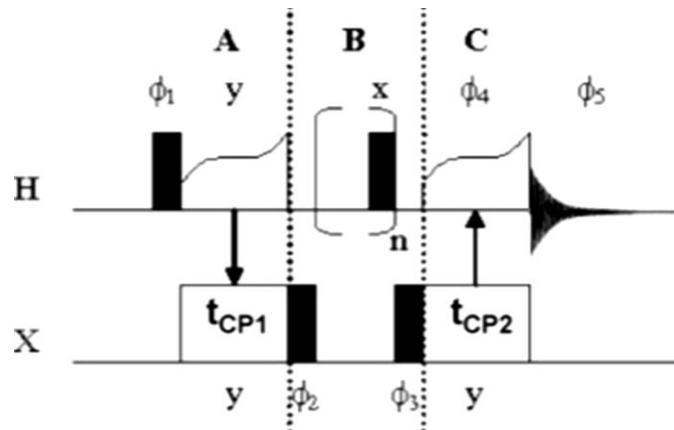


Figure 15 : Séquence de double polarisation croisée $^1\text{H-X-}^1\text{H}$ (D'après Baccil, 2007)

Nous nous sommes donc orientés vers une expérience à une dimension permettant de récupérer le même type d'information que la projection selon la dimension ^1H d'une carte HETCOR. Pour cela, nous avons utilisé une séquence RMN de double polarisation croisée « aller et retour » $^1\text{H-}^{31}\text{P-}^1\text{H}$ adaptée à notre système (Baccile, 2007) (Fig. 15). En effet, le transfert de polarisation peut avoir lieu selon les deux directions $\text{I} \rightarrow \text{S}$ ou $\text{S} \rightarrow \text{I}$. Dans cette séquence, un premier transfert d'aimantation $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ est réalisé avec un temps de contact t_{CP1} de 1 ms afin de polariser l'ensemble des sites de phosphore (et surtout ceux de la phase amorphe d'après l'étude de CP précédente). Ensuite, un deuxième transfert de polarisation depuis ces sites de phosphore vers les protons est réalisé avec un deuxième temps de contact t_{CP2} que l'on peut varier ce qui nous permet de sonder les protons en fonction de leur distance par rapport aux phosphores, et ceci par enregistrement d'une expérience à une dimension.

La figure 16 montre les spectres de double CP $^1\text{H-}^{31}\text{P-}^1\text{H}$ enregistrés avec un temps de contact t_{CP2} variable sur l'apatite CHApD. Ces spectres présentent un très bon rapport signal-sur-bruit par rapport à la projection extraite de l'expérience HETCOR $^1\text{H-}^{31}\text{P}$ enregistré à même temps de contact, et surtout une meilleure résolution spectrale car ici la détection du spectre se fait selon la voie ^1H . La durée d'acquisition d'un spectre est d'un peu moins de 6 h.

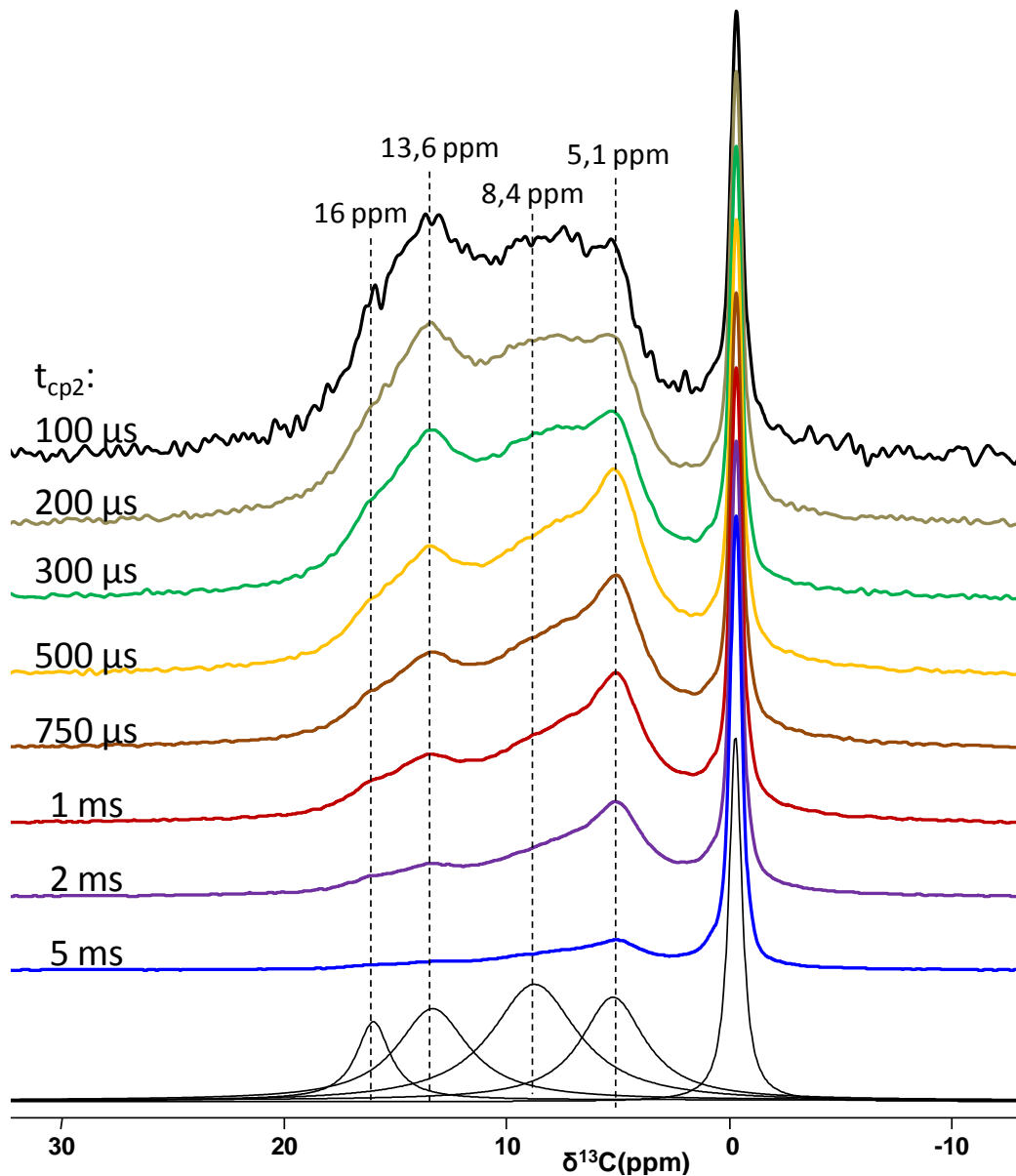
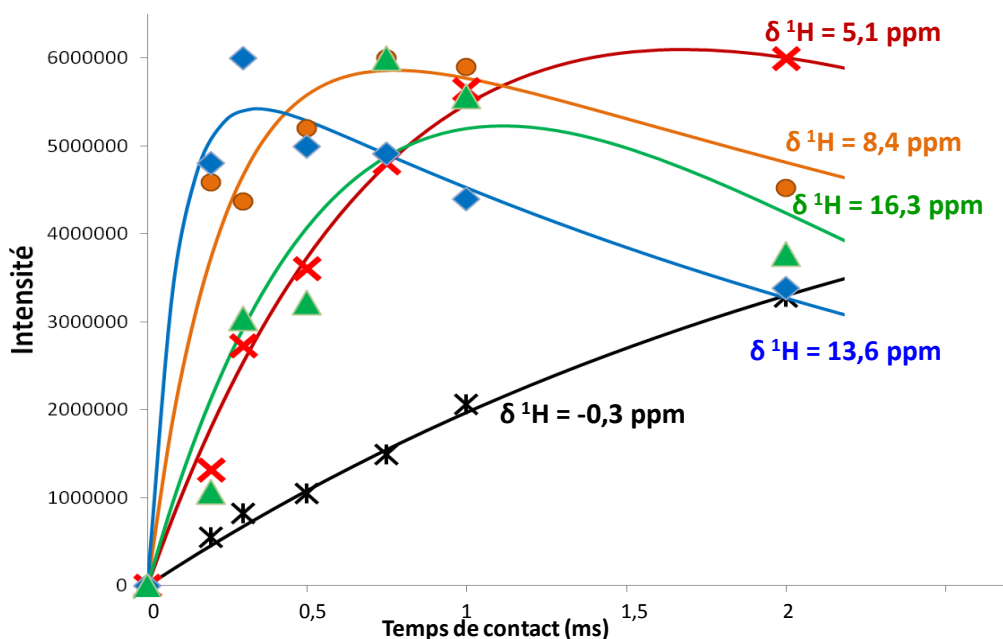


Figure 16 : Spectres RMN MAS de double CP ^1H - ^{31}P - ^1H ($B_0=7\text{T}$, $\nu_{\text{MAS}}=14\text{kHz}$, $d_1=1,5\text{s}$, $t_{\text{cp}1}=1\text{ms}$, $t_{\text{cp}2}$ est indiqué sur la figure). La simulation des spectres est représentée en ligne rouge pointillée.

A faible temps de contact (100 μs), nous pouvons clairement distinguer plusieurs signaux ^1H dans la gamme 3-20 ppm, dont les intensités relatives varient en fonction du temps de contact. Nous avons essayé de simuler ces spectres avec un jeu unique de pics, en ne faisant varier que leurs intensités, ce qui a conduit à la mise en évidence de 4 signaux ^1H à 5,1, 8,4, 13,6 et 16,3 ppm, en plus du pic du aux hydroxydes de l'apatite à 0 ppm (Tab. 4). Néanmoins, le fort recouvrement des pics laisse penser que cette solution n'est pas unique.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	FWHM (Hz)
0	180
5,1	1000
8,4	1411
13,6	1100
16	550

Tableau 4 : Paramètres des pics de résonance ^1H utilisés pour la simulation des spectres de double CP de la figure 16Figure 17 : Variation, en fonction du temps de contact t_{cp2} , de l'intensité des pics de résonance ^1H issus de la simulation des spectres RMN CP ^1H - ^{31}P - ^1H .

La variation de l'intensité de ces signaux en fonction du temps de contact t_{cp2} est reportée sur la figure 17. On retrouve la même différence de comportement entre les signaux ^1H associés à la phase d'apatite et ceux associées à la phase hydratée, que ce qui avait déjà été observé pour les signaux ^{31}P lors d'une expérience de CP $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$: l'intensité du signal à 0 ppm croît lentement sans perte de signal à plus long temps de contact, alors que tous les autres croissent plus rapidement avant de décroître.

D'après son déplacement chimique, le pic à 5 ppm peut être attribué à des molécules d'eau. On pourrait penser à de l'eau de structure, occupant des lacunes dans la structure cristalline de l'apatite, pour ainsi stabiliser la structure. Néanmoins, dans la carte HETCOR ^{31}P - ^1H , on n'a pas observé de corrélation entre ce signal ^1H à 5 ppm et le signal ^{31}P fin

(FWHM = 140 ppm) de l'hydroxyapatite (Fig. 10). Ce pic corrèle uniquement avec la composante large du spectre ^{31}P attribué à la phase amorphe. Les molécules d'eau associées sont donc présentes uniquement dans cette phase amorphe hydratée.

Les courbes associées aux signaux à 8,4, 13,6 et 16,3 ppm ont des allures similaires à celle associée au signal à 5 ppm, en particulier quant à leur décroissance à plus longs temps de contact due au temps de relaxation $T_{1\rho}^{1\text{H}}$. Elles présentent par contre une croissance plus rapide à faible temps de contact suggérant la présence de distances plus courtes P...H. Ceci est en accord avec les valeurs de déplacement chimique que l'on peut attribuer à des protons de type POH dans des ions hydrogénophosphates HPO_4^{2-} . Rappelons que les hydrogénophosphates dans la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et la monétite (CaHPO_4) ont des résonances ^1H à 10,4 ppm, et à 13,6 et 16,3 ppm respectivement (Yesinowski, 1987). La présence des signaux à 13,6 et 16,3 ppm pourraient laisser penser à la présence de monétite mais la carte HETCOR ne présente aucune des résonances attendues pour ce composé à -1,1 et 0,1 ppm (Fig. 10).

L'utilisation de la séquence double polarisation ^1H - ^{31}P - ^1H a permis d'identifier clairement à côté de molécules d'eau présentes dans la couche amorphe hydratée, plusieurs types de groupes hydrogénophosphates, sans doute impliqués dans des liaisons hydrogène de force variable ce qui explique la distribution de résonances ^1H sur une large gamme de déplacement chimique (Pourpoint, 2007).

III. Etude par RMN de l'interface collagène/apatite

La spectroscopie RMN du solide est une des méthodes d'analyse les plus adaptées aux études d'interface dans les composés organominéraux, en exploitant plus particulièrement les couplages dipolaires hétéronucléaires. Elle peut fournir des informations structurales jusqu'à une distance d'une dizaine d'angströms autour du noyau étudié. Dans le cas du tissu osseux, l'interface collagène-apatite peut être étudiée en utilisant le couplage hétéronucléaire ^{13}C - ^{31}P .

1. Séquences RMN pour l'étude d'interfaces

La séquence de corrélation hétéronucléaire, **HETCOR** (HETeronuclear CORrelation) est souvent utilisée pour l'étude d'interfaces dans des matériaux complexes. En

variant le temps de contact, nous pouvons sonder les proximités spatiales entre les noyaux ^{13}C et ^{31}P jusqu'à une distance de 10 Å.

Compte tenu de la faible abondance naturelle du ^{13}C (1,1%) et des rapports gyromagnétiques ($\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}} = 4$ et $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{P}} = 2,5$), l'enregistrement d'un spectre HETCOR $\{^1\text{H}\}^{31}\text{P}$ - ^{13}C est difficilement envisageable en un temps raisonnable, surtout si l'on considère que le nombre de spins présents au niveau de l'interface peut être réduit. Cette séquence n'est donc pas adaptée pour l'étude d'un composé comme l'os.

Afin de diminuer le temps d'expérience, on peut utiliser une séquence de double polarisation croisée ^1H - ^{31}P - ^{13}C , version à une dimension de la séquence d'HETCOR (Fig. 21) (Schaefer, 1979 ; Seidel, 2005). Le premier transfert d'aimantation $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ permet de renforcer l'intensité du signal de ^{31}P . Puis un deuxième transfert est optimisé depuis ces phosphates vers les carbones qui peuvent être présents dans la phase organique (collagène, sucre, NCP...) ou dans la phase minérale (substitution par les ions carbonates). Par rapport à l'expérience d'HETCOR, on perd néanmoins l'information concernant la nature des phosphates en interaction dipolaire avec les carbones qui sont détectés.

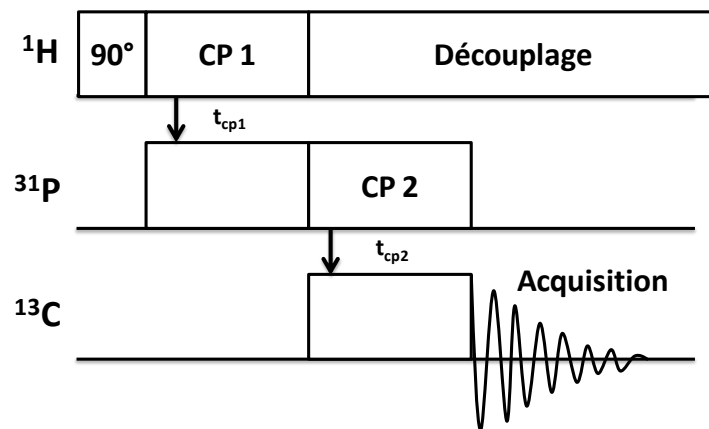


Figure 18: Schéma de la séquence de double CP ^1H - ^{31}P - ^{13}C

La séquence d'impulsions **REDOR** (Rotational Echo Double Resonance) est aussi souvent utilisée dans les études d'interface. Elle a été introduite en 1989 par Guillion et Schaefer (Guillion, 1989), et c'est une méthode de recouplage hétéronucléaire très utilisée (Hing, 1993 ; Wooley, 1997). Dans la séquence $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR, il s'agit de réintroduire le couplage dipolaire entre ^{13}C et ^{31}P qui est moyenné par la rotation à l'angle magique (MAS) grâce à une série d'impulsions π sur la voie ^{31}P , synchronisées sur la période de rotation du rotor qui affecte uniquement l'interaction dipolaire hétéronucléaire.

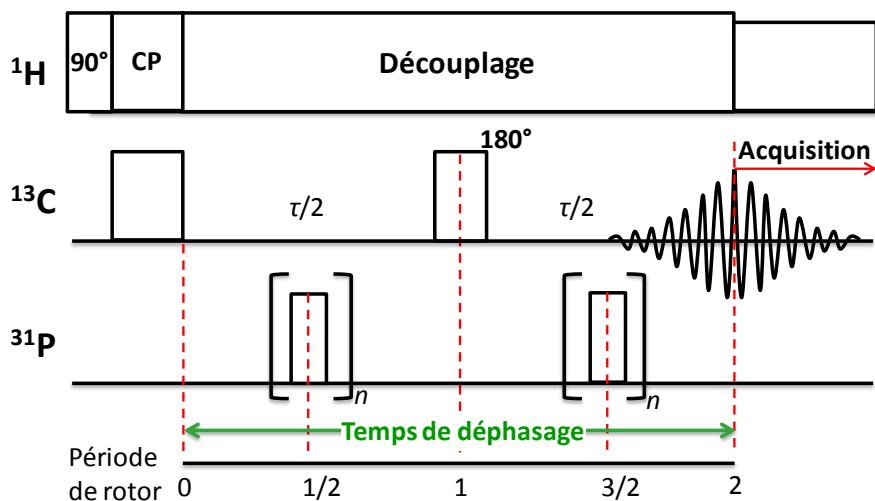


Figure 19: Séquence REDOR utilisée (les impulsions π sont appliquées toutes les demi-périodes de rotor).

Les spectres sont enregistrés en deux temps : on enregistre d'abord sur la voie ^{13}C l'écho complet en l'absence d'impulsions π sur la voie ^{31}P , puis on répète une deuxième fois la même expérience avec les impulsions π sur la voie ^{31}P (Fig. 19). Le temps de déphasage correspond au temps d'écho. On compare ensuite les spectres avec et sans déphasage afin de déterminer les signaux ^{13}C déphasés, qui correspondent à des noyaux ^{13}C en interaction avec les spins ^{31}P .

2. Etudes bibliographique sur l'utilisation de la séquence REDOR

Avant d'étudier l'effet de couplage dipolaire hétéronucléaire sur l'intensité des signaux ^{13}C par séquence REDOR, nous pouvons observer qu'un spectre RMN MAS ^{13}C de l'os est constitué de plusieurs signaux étalés sur deux gammes de déplacements chimiques (Fig. 20 spectre noir). Huster *et al.* ont étudié l'environnement chimique du ^{13}C du collagène de tendon bovin et de cartilage de cochon (Huster, 2002). Ils ont attribué tous les signaux des acides aminés du collagène dont les déplacements chimiques sont résumés dans le tableau 5.

Attribution	Déplacement
Ala β	17,4 ppm
Leu δ / Val γ	20,4 ppm
Pro γ	25,5 ppm
Pro β	30,4 ppm
Gly α	43,0 ppm
Pro δ	47,7 ppm
Ala α	54,3 ppm
Pro α , Hyp α , Hyp δ	59,5 ppm
Hyp γ	71,1 ppm
C=O	176 ppm

Tableau 5 : Déplacement chimique des carbones-13 des acides aminés dans le collagène du tendon de bovin (D'après Huster, 2002)

La séquence REDOR a déjà été largement utilisée pour étudier les interfaces organiques/inorganiques dans l'os dans la littérature.

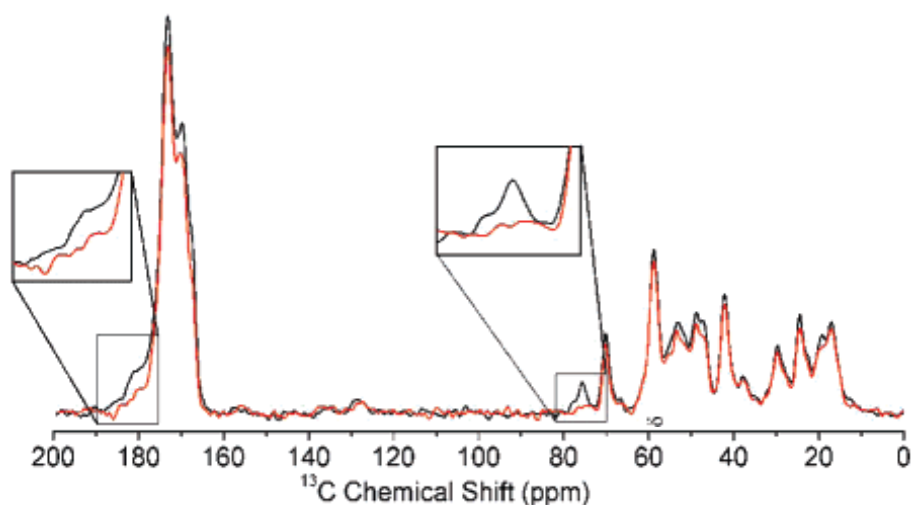


Figure 20: Comparaison des spectres de RMN $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR avec (rouge) et sans (noir) irradiation ^{31}P ($B_0 = 9,4 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 12,5 \text{ kHz}$; Temps de déphasage = 9,6 ms). (D'après Wise, 2007).

Wise *et al.* ont observé une perte d'intensité de deux signaux à 182 ppm et à 76 ppm sur le spectre RMN $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR (Fig. 20) de poudre d'os de cheval (Wise, 2007). La réintroduction du couplage dipolaire est la conséquence du déphasage des signaux, un temps de déphasage de 10 ms correspondant à une distance de moins de 5-6 Å entre ^{13}C et ^{31}P . Les auteurs ont attribué le signal à 182 ppm à des groupements carboxyle de sucres, et celui à 76 ppm aux groupes C-OH de sucres. Ils ont alors proposé que l'interface minérale/organique

soit constituée principalement de polysaccharides présents à une distance de moins de 5 Å de la phase minérale.

Hu. *et al.* (Hu, 2010) ont eux étudié l'os de bovin par la même séquence (Fig. 21). Ils ont aussi observé le déphasage des signaux à 182 et 76 ppm, mais en plus ont observé le déphasage d'un signal à 49 ppm. Ils les ont attribués à la présence de citrates (Fig. 21) qui seraient à une distance de 5-6 Å de la surface des particules d'apatite, avec une densité de 0,5/nm². Il faut noter ici que les auteurs avaient lavé les échantillons d'os par un mélange méthanol/chloroforme, puis les avaient séchés et broyés avant l'expérience RMN. Avec ce traitement, ils ont probablement déjà modifié la nature de l'os frais.

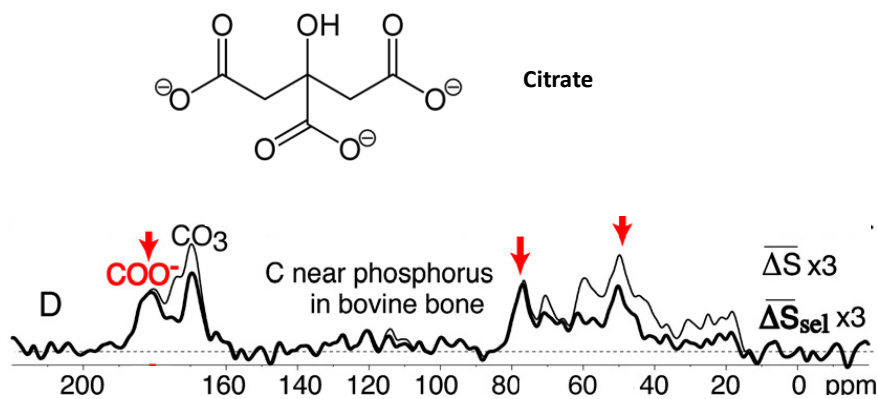


Figure 21: Spectre RMN ¹³C{³¹P} REDOR enregistré sur de l'os de bovin avec un temps de déphasage de 6 ms (D'après Hu, 2010)

Rai et Sinha (Rai, 2011) ont estimé la distance entre les carbones des acides aminés du collagène et les phosphates de l'apatite. Cette distance est plus longue que dans les exemples précédents, de l'ordre de (9,0 ± 0,5), (8,4 ± 0,5) et (7,6 ± 0,5) Å pour respectivement l'os frais, l'os séché depuis 1 jour et l'os séché depuis 3 jours. Ces auteurs ont supposé que le collagène se rapprochait donc de la surface de la phase minérale pendant la déshydratation de l'os. Ils ont proposé un modèle (Fig. 22) dans lequel des molécules d'eau se trouvent entre le collagène et la phase minérale, en se basant sur des études précédentes. L'une d'entre elles a estimé la distance entre la phase minérale et les protéines de stathérine (qui sont des protéines acides abondantes dans la salive humaine) à 4,5~5Å (Ndao, 2009 & Gibson, 2005) et une autre a montré que les GAGs sont à une distance de 5 Å par rapport à la surface des particules d'apatite (Jaeger, 2005 & Wise, 2007). Ce modèle est similaire à celui proposé par Wilson (Wilson, 2005), mais dans cette dernière étude les auteurs précisent la présence de citrates et d'autres molécules à la surface de l'apatite.

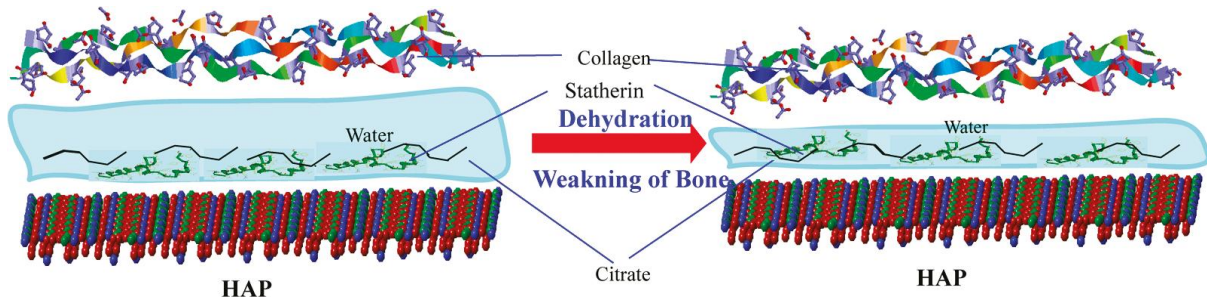


Figure 22 : Modèle de l'interface collagène/apatite dans l'os avant et après la déshydratation (D'après Rai, 2011).

Quant à *Nikel et al.*, ils ont comparé différents échantillons d'os humain (*Nikel, 2012*), et ont découvert à l'aide de la séquence de $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR que l'environnement des carbones des GAGs et/ou des citrates les plus proches de l'apatite ne varie pas en fonction de l'âge de l'échantillon. Ils ont aussi démontré une proximité entre l'apatite et les acides aminés les plus abondants du collagène, la proline et l'alanine à l'aide du taux de déphasage des signaux correspondants.

Certains chercheurs étudient directement la surface d'apatite de synthèse en présence de différentes molécules organiques dans l'objectif de simplifier le système étudié et d'augmenter la quantité d'interface organique/inorganique. Les molécules de collagène et les protéines non collagéniques (NCPs) sont les molécules les plus étudiées. Voici quelques exemples trouvés dans la littérature :

Bradley et al. ont synthétisé de l'apatite en présence de divers biopolymères GAG, et des études par REDOR ont montré que ces biopolymères sont très proches de l'apatite (*Bradley, 2010*).

L'équipe de *Drobny* a publié plusieurs articles (*Raghunathan, 2006 ; Ndao, 2009 & Ndao, 2010*) sur la stathérine, protéine acide abondante dans la salive humaine. Les auteurs ont mélangé cette protéine (Fig. 26) avec des apatites synthétiques et identifié plusieurs sites acides de la protéine qui influence la nucléation et la croissance de phosphate de calcium en interagissant directement avec la surface apatitique (*Raj, 1992*). Il est important de remarquer que la surface apatitique utilisée ici est une phase cristalline d'apatite, sans couche hydratée amorphe.

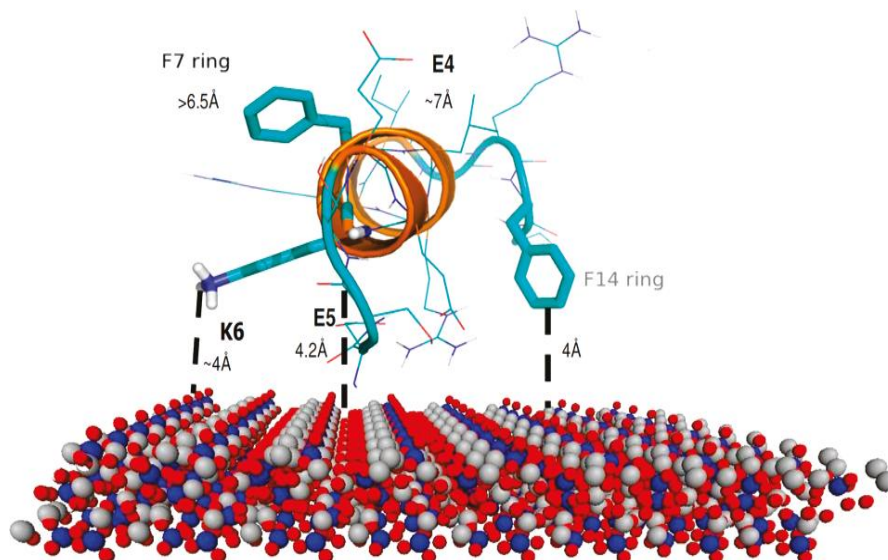


Figure 23 : Modèle d'interaction d'une protéine humaine (la stathérine) à la surface de l'apatite (D'après Ndao, 2010)

Flade et *al.* (Flade, 2001) ont étudié l'influence de l'ostéocalcine (Hunter, 1996) qui est considérée comme une des protéines minéralisantes dans l'os. Les auteurs ont réussi à former une phase apatitique à partir de brushite en présence de l'ostéocalcine. Les particules d'apatite formées sont sous forme de plaquettes dont la direction de croissance est (010), et non (001) comme dans l'os. Ces résultats montrent le rôle d'inhibiteur de croissance de l'ostéocalcine, ce qui affecte la morphologie des particules d'apatite.

Les informations fournies par l'étude de l'interface entre l'apatite et ces molécules organiques sont intéressantes, mais elles sont difficilement transposables à l'os du fait de l'absence de collagène. La matrice de collagène qui joue un rôle d'échafaudage, exerce un effet de confinement pendant la minéralisation qui est essentiel lors de la structuration de l'interface organique/minérale.

3. Etude par RMN à l'état solide de l'interface collagène-apatite

La meilleure méthode pour l'étude de l'interface dans l'os est d'étudier directement cette matrice complexe. Cette étude reste très compliquée à cause de la présence de divers composés (comme les lipides, les sucres, les protéines et les cellules). Nous avons donc aussi étudié comme composé modèle, la matrice hybride Coll/CHA(SBF) de composition plus simple (apatite, collagène et eau) dont nous avons montré précédemment qu'elle était une matrice mimétique de l'os.

3.1 Séquence double CP

Dans un premier temps nous avons testé la séquence RMN de double polarisation $^1\text{H}/^{31}\text{P}/^{13}\text{C}$ sur l'échantillon CHApN enrichi en ^{13}C , CHApN- ^{13}C , ce qui présente certains avantages, comme un réglage rapide de l'expérience et un temps d'acquisition relativement court (~ 3 h).

Nous avons réussi comme attendu, à obtenir un spectre (Fig. 24 spectre rouge) similaire au spectre $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ MAS (Fig. 24 spectre bleu), montrant les différents environnements chimiques des carbonates dans l'apatite CHApN- ^{13}C .

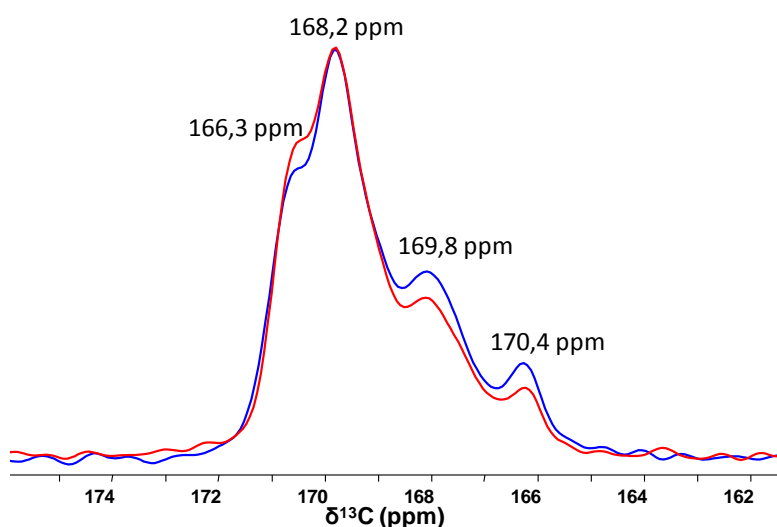


Figure 24: Spectre RMN CP $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ en bleu ($t_{\text{cp}}=10$ ms) et spectre double CP $^1\text{H}/^{31}\text{P}/^{13}\text{C}$ en rouge ($t_{\text{cp1}}=10$ ms et $t_{\text{cp2}}=20$ ms) enregistrés sur l'échantillon CHApN- ^{13}C ($B_0 = 7,05$ T ; $\nu_{\text{MAS}} = 14$ kHz).

Nous avons ensuite étudié par cette séquence, l'os sec et nettoyé avec CHCl_3 (pour éliminer les phospholipides).

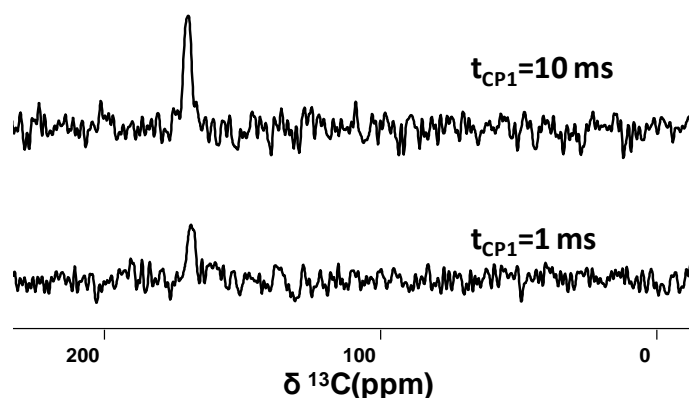


Figure 25: Spectre RMN double CP $^1\text{H}/^{31}\text{P}/^{13}\text{C}$ de l'os sec nettoyé avec CHCl_3 ($B_0 = 7,05$ T ; $\nu_{\text{MAS}} = 5$ kHz ; $t_{\text{cp1}}=1$ et 10 ms, $t_{\text{cp2}}=20$ ms)

Après 6 jours d'acquisition pour chaque expérience, les spectres sont tous constitués d'un seul signal centré sur 169 ppm, qui correspond aux carbonates des particules d'apatite carbonatée. Le signal du spectre enregistré avec $t_{CP1}=1$ ms est moins intense que celui où $t_{CP1}=10$ ms. Or nous venons de voir dans la partie II de ce chapitre que l'augmentation du temps de contact lors du premier transfert de polarisation ($^1H \rightarrow ^{31}P$) favorise la détection de la phase d'apatite, au détriment de la phase hydratée amorphe. L'augmentation du signal des carbonates semble donc bien montrer l'absence de carbonates dans cette phase amorphe comme déjà discuté dans la partie II du chapitre II.

En nous basant sur les données de la littérature dont nous avons déjà parlées (Hu, 2010 ; Rai, 2011 & Reid, 2006), nous pensions observer, en plus du signal des carbonates de l'apatite, les signaux à 76 ppm et 182 ppm, voire à 49 ppm, identifiés lors des expériences REDOR comme appartenant aux espèces organiques en interaction avec l'apatite dans l'os. L'absence de tels signaux dans notre expérience de double CP peut provenir du faible rapport signal sur bruit, mais rallonger le temps d'acquisition déjà très long, est impossible. Cela provient peut-être des paramètres de CP utilisés qui ne sont pas optimum pour la détection de telles espèces ce qui entraîne une diminution de l'efficacité du transfert CP. Ainsi t_{cp2} peut être optimal pour détecter les carbonates, mais pas pour les espèces organiques qui présentent sans doute une plus grande mobilité (couplage dipolaire ^{31}P - ^{13}C moyenné).

Dans la partie suivante, nous allons donc utiliser la séquence REDOR pour voir si nous retrouvons sur notre échantillon de bioapatite les résultats publiés.

3.2 Séquence REDOR

Nous avons testé la séquence REDOR avec deux temps de déphasage : 10 ms et 20 ms (Fig. 26 a & b).

Nous avons d'abord comparé les déplacements chimiques ^{13}C du collagène dans l'os avec les résultats de la littérature (Tab. 5). Nous avons réussi à attribuer tous les signaux (Fig. 26).

Lorsqu'on utilise un temps de déphasage de 10 ms (Fig. 26a), nous retrouvons bien une atténuation des signaux à 182 ppm et à 76 ppm. Le pic à 49 ppm présente une atténuation à peine perceptible. En effet, ce signal considéré comme pouvant être associé au groupement -

CH₂- des citrates, est « noyé » parmi les signaux de collagène. L'intensité des autres signaux ne subit aucun effet de déphasage dipolaire.

Quand le temps de déphasage augmente, 20 ms (Fig. 26b), une atténuation de la plupart des signaux est observée. Les 3 pics à 182 ppm, 76 ppm et 49 ppm, présentent un déphasage notable.

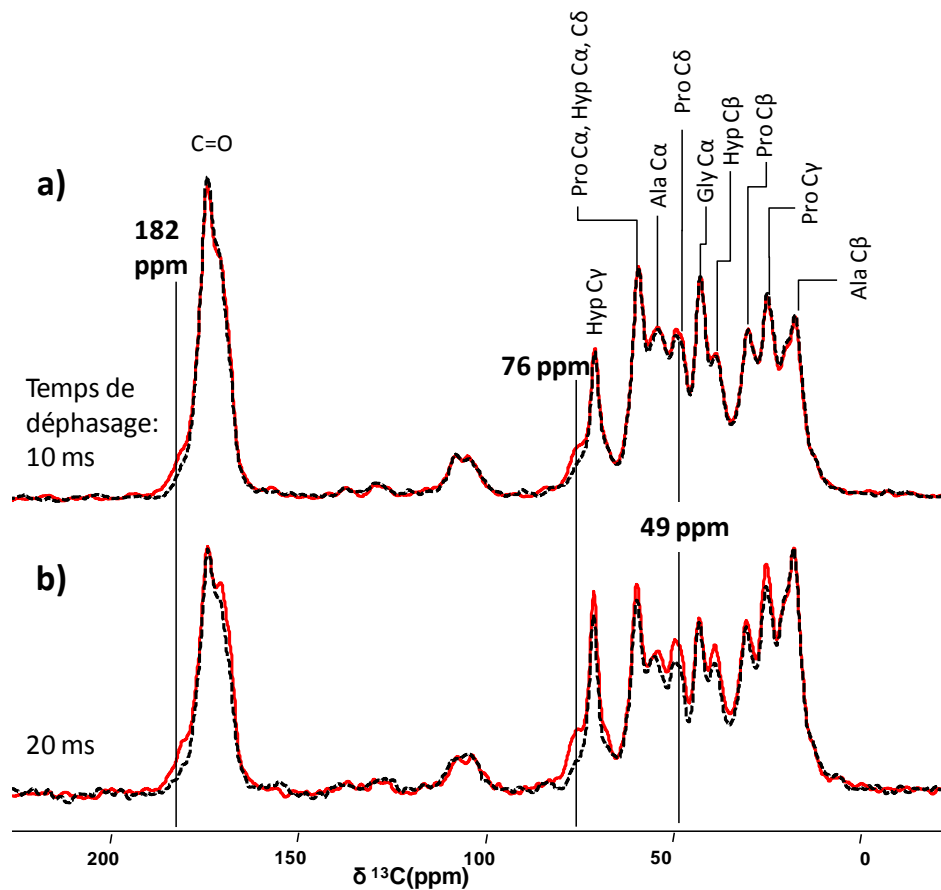


Figure 26: Comparaison des spectres de RMN $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR de l'os sec avec (noir) et sans (rouge) irradiation ^{31}P et pour 2 temps de déphasage (10 et 20 ms).

($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 5 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp1}} = 1 \text{ ms}$; $t_{90^\circ}(^{13}\text{C}) = 4,9 \mu\text{s}$, $t_{90^\circ}(^1\text{H}) = 4,9 \mu\text{s}$, $t_{90^\circ}(^{31}\text{P}) = 5,1 \mu\text{s}$)

Pour essayer de contribuer à la discussion sur la nature des espèces organiques présentes à l'interface organo-minérale dans l'os, qui semblent bien associées à des signatures RMN ^{13}C à 182, 76 et possiblement 49 ppm, nous avons étudié l'échantillon « biomimétique » Coll/CHA(SBF) séché dans les mêmes conditions que l'échantillon de bioapatite précédent. Rappelons que cet échantillon ne contient que le collagène comme composante organique.

Tout d'abord une comparaison des spectres RMN MAS $\{^1\text{H}\}^{13}\text{C}$ CP de Coll/CHA(SBF) séchée et de l'os sec est montré sur la figure 27. On remarque que le pic à 182 ppm qui a été attribué aux citrates ou aux GAGs semble également observé dans notre matrice qui ne contient que du collagène. Ceci remet en question l'attribution faite dans la littérature, des molécules organiques « intermédiaires » entre les molécules de collagène et l'apatite. Il est intéressant de remarquer l'absence de signal à 76 ppm qui doit donc être effectivement dû à d'autres molécules organiques que le collagène présentes *in vivo*. Le pic à 49 ppm est présent sur les deux spectres, car attribué au C_γ de la proline du collagène. Un autre signal (par exemple dû au groupe CH_2 des citrates) est donc difficilement identifiable.

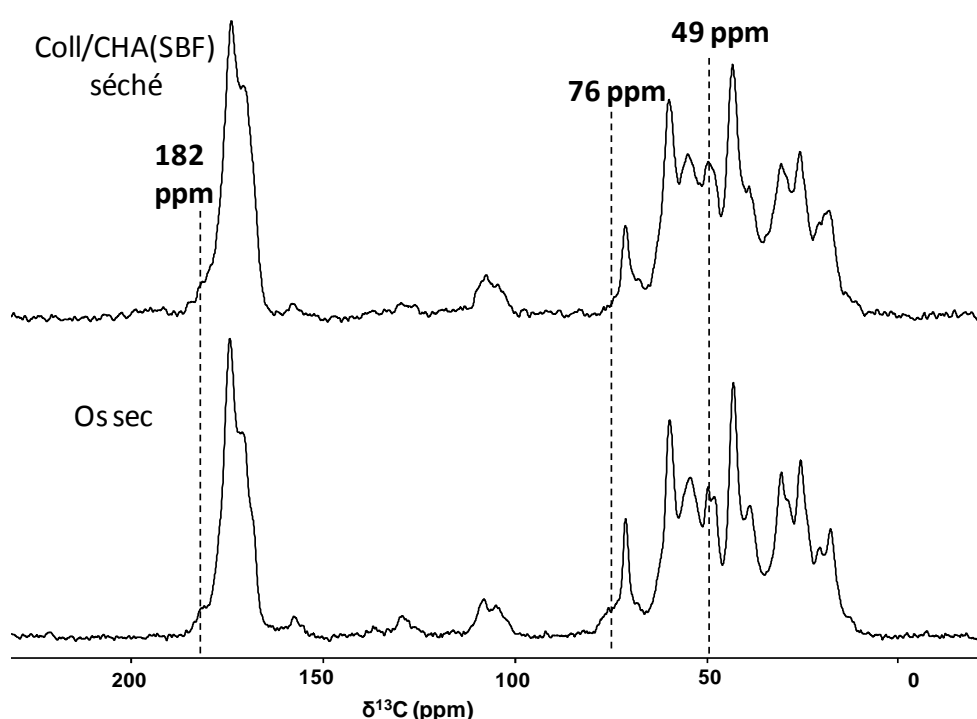


Figure 27 : Spectres RMN MAS $\{^1\text{H}\}^{13}\text{C}$ CP de la matrice Coll/CHA(SBF) séché et de l'os séché ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 5 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp1}} = 1 \text{ ms}$)

Ensuite, nous avons enregistré les spectres $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR sur la matrice Coll/CHA(SBF) séchée, en utilisant les mêmes paramètres expérimentaux, que pour l'échantillon d'os sec (Fig. 28).

Pour un temps de déphasage de 10 ms (Fig. 28a), un seul signal, à 169 ppm, présente une atténuation importante et il correspond aux carbonates dans l'apatite. Un très faible déphasage du pic à 182 ppm semblait être observé, ce qui nous a incités à regarder le spectre enregistré à plus fort temps de déphasage (20 ms) (Fig. 28b). Dans ce cas, nous confirmons

l'effet d'atténuation important sur le pic dû aux carbonates mais ne mettons en évidence aucune autre atténuation, et surtout pas du pic à 182 ppm.

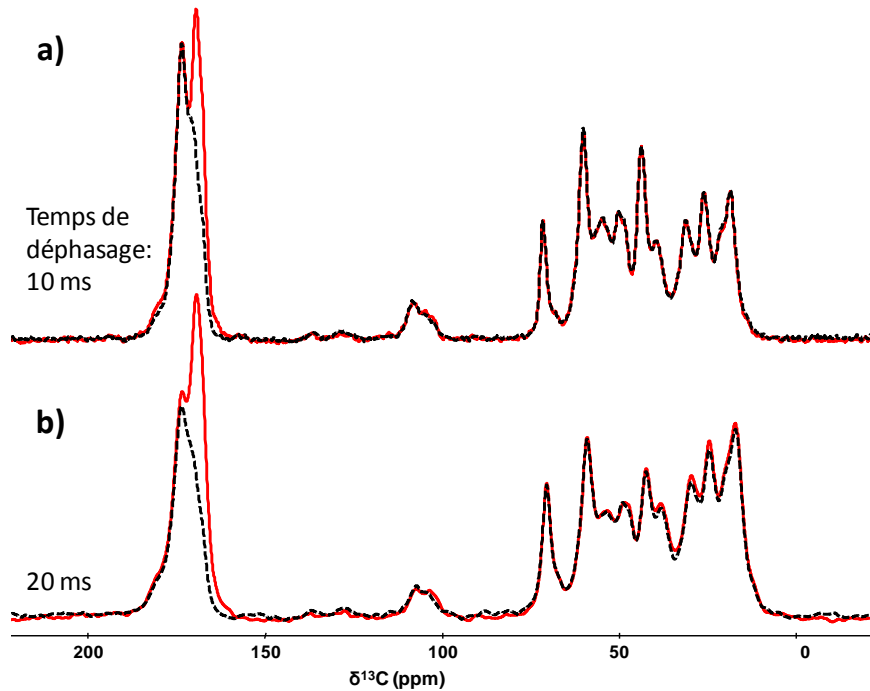


Figure 28: Comparaison des spectres normalisés de RMN $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR de la matrice Coll/CHA(SBF) séchée avec (noir) et sans (rouge) irradiation ^{31}P et pour 2 temps de déphasage, 10 et 20 ms. ($B_0 = 7,05 \text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 5 \text{ kHz}$; $t_{\text{cp}1} = 1 \text{ ms}$; $t_{90^\circ}(^{13}\text{C}) = 4,9 \mu\text{s}$, $t_{90^\circ}(^1\text{H}) = 4,9 \mu\text{s}$, $t_{90^\circ}(^{31}\text{P}) = 5,1 \mu\text{s}$)

L'absence de déphasage des signaux du collagène que nous espérions voir comme pour l'échantillon d'os à plus fort temps de déphasage, peut être due à une mobilité plus grande des molécules de collagène et/ou à une distance plus importante entre la phase minérale et les molécules de collagène dans la matrice Coll/CHA(SBF).

Jusqu'à ici, nous avons étudié les échantillons séchés. Il est important de rappeler le rôle indispensable de l'eau dans l'organisation spatiale des fibrilles de collagène, dans la stabilité de la phase minérale, et aussi dans les interactions entre phase minérale et matrice organique (Rai, 2011 & Zhu, 2009). Le séchage des échantillons altère probablement la structure de l'interface collagène/apatite et diminue la distance entre ces deux phases. D'où l'importance d'étudier des échantillons dans leur état « natif ». En revanche, l'augmentation de mobilité des molécules de collagène et de la distance entre phase minérale et phase organique qui sont prévisibles, ne sont pas favorables à l'acquisition d'un spectre REDOR.

Nous avons néanmoins tenté d'enregistrer les spectres $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR sur la matrice Coll/CHA(SBF) humide, en utilisant les mêmes paramètres expérimentaux, que pour

la matrice séchée (Fig. 29a), avec tout de même une différence significative, le type de rotor. En fait pour les échantillons secs qui sont réduits en poudre, nous avons utilisé des rotors de 4 mm standard pleins. Pour l'échantillon humide, il n'a pas été possible d'atteindre des vitesses de rotation MAS suffisantes avec ce type de rotor compte tenu de la texture de l'échantillon et nous avons donc utilisé des rotors de type CRAMPS permettant de bloquer l'échantillon au centre du rotor, ce qui diminue la quantité d'échantillon étudiée.

On remarque tout d'abord que le spectre sans déphasage (Fig. 29a rouge) est dominé par le signal des carbonates de l'apatite, et que les signaux fins dus au collagène ont disparu si on compare avec le spectre de la figure 28a sur la matrice sèche. Seuls subsistent des signaux assez larges ; ceci suggère une mauvaise efficacité de détection des signaux dus au collagène sans doute dû à l'augmentation de mobilité, ce qui est confirmé par le spectre RMN CP $\{^1\text{H}\}^{13}\text{C}$ (Fig. 29b) qui présente un rapport signal sur bruit très moyen malgré un temps d'acquisition long (18 h au lieu de 2 h pour le spectre de l'échantillon sec de la Fig. 27). On constate aussi sur ce spectre que les signaux fins associé au collagène ont disparu, laissant place à une distribution de signaux larges sans doute associées aux zones les plus rigides.

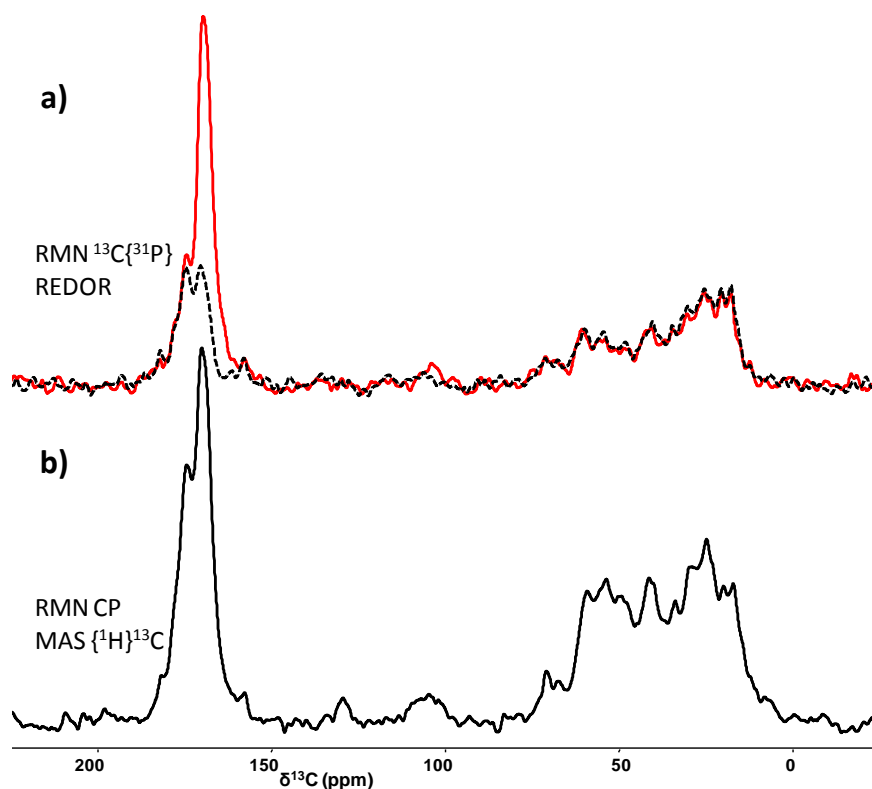


Figure 29 : Comparaison des spectres normalisés de RMN $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR de matrice Coll/CHA(SBF) séché avec (noir) et sans (rouge) irradiation ^{31}P pour un temps de déphasage de 10 ms ($B_0 = 7,05\text{ T}$; $\nu_{\text{MAS}} = 5\text{ kHz}$; $t_{\text{cp1}} = 1\text{ ms}$; $t_{90^\circ}(^{13}\text{C}) = 4,9\ \mu\text{s}$, $t_{90^\circ}(^1\text{H}) = 4,9\ \mu\text{s}$, $t_{90^\circ}(^{31}\text{P}) = 5,1\ \mu\text{s}$)

Le spectre RMN $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR enregistré avec un temps de déphasage de 10 ms ne montre l'atténuation que du signal des carbonates (Fig. 29a), ce qui suggère que les molécules de collagène qui sont détectées par cette expérience ne semblent pas à proximité de sites phosphates présents dans l'échantillon.

Ces premiers résultats obtenus par RMN $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR sur des échantillons d'os comparés à la matrice « biomimétique » Coll/CHA(SBF), nous montrent bien toute la complexité d'une telle étude. Nous avons reproduit les données de la littérature obtenues sur des échantillons d'os secs à savoir l'identification d'au moins 2 pics de résonance à 182 et à 76 ppm associées à des espèces organiques présentes à proximité des sites phosphates des particules d'apatite. Par contre, l'étude sur la matrice Coll/CHA(SBF) ne nous apporte pas d'informations très concluantes quant à l'existence ou non de sites C du collagène qui se trouveraient en interaction avec des sites phosphates. Cette étude met surtout en évidence les difficultés d'utilisation de séquences RMN basées sur le couplage dipolaire hétéronucléaire dans le cas d'échantillons où les sites peuvent présenter une grande mobilité, comme c'est le cas au niveau de l'interface collagène/apatite, surtout dans les échantillons hydratés.

IV. Conclusions

Nous avons dans ce dernier chapitre, focalisé notre attention sur l'interface organo-minérale présente dans les bioapatites et dans les matrices collagène-apatite « biomimétiques ». Nous nous sommes tout d'abord intéressés à mieux caractériser la phase amorphe distincte de la phase apatitique, souvent reportée dans la littérature et formant la surface externe des nanoparticules d'apatite. Nous avons confirmé son caractère hydraté, mais surtout mis en évidence de manière directe en utilisant une séquence RMN de double polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$ la présence de groupements hydrogénophosphates. La multiplicité des sites ^1H révélée par cette expérience, nous montre toute la complexité structurale de cette phase amorphe hydratée où hydrogénophosphates et molécules d'eau doivent former un réseau de liaisons hydrogène étendu.

Enfin, l'étude par RMN REDOR $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ a confirmé la capacité de cette méthode à aller explorer les interfaces organo-minérales dans des matériaux composites. Nous avons retrouvé les résultats de la littérature obtenus sur des échantillons d'os séché, mais n'avons pas pu clairement confirmer ou infirmer la présence de molécules organiques (GAGs ou citrate) au niveau de l'interface en étudiant la matrice Coll/CHA(SBF) séchée qui ne contient comme composante organique que le collagène. Ces résultats inattendus (et un peu décevants) obtenus sur cette matrice, où aucune atténuation des signaux dus au collagène n'est observée, (alors qu'ils l'ont été dans le cas de l'os séché à plus long temps de déphasage dans l'expérience REDOR), nous incitent à reproduire ces expériences avec des échantillons dont le taux de minéralisation intra et inter-fibrillaires serait plus important. Quant à l'étude la plus intéressante qui porterait sur des échantillons humides, les premiers résultats montrent que la grande mobilité des molécules de collagène introduite par la présence des molécules d'eau à l'interface affecte fortement l'efficacité d'une telle séquence.

Références bibliographiques

- A**
- B**
- Baccile **2007** Baccile, N.; Laurent, G.; Bonhomme, C.; Innocenzi, P.; Babonneau, F. *Chemistry of Materials* 2007, 1343-1354.
- Betts **1975** Betts, F.; Blumenthal, N.C.; Posner, A.S.; Becker, G.L.; Lehninger, A.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975;72:2088–90.
- Bradley **2010** Bradley, J. V.; Bridgland, L. N.; Colyer, D. E.; Duer, M. J.; Friščić, T.; Gallagher, J. R.; Reid, D. G.; Skepper, J. N.; Trasler, C. M. *Chemistry of Materials* 2010, 22, 6109-6116.
- Boskey **1997** Boskey, a. L. *Journal of Dental Research* **1997**, 76, 1433-1436.
- Brown **1966** Brown W., *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1966, 44, 205-220
- Brown **1976** Brown, W. E.; Chow, L. C. *Annual Review of Materials Science* 1976, 6, 213-236.
- Brown **1979** Brown W.; Schroeder L. ; Ferris J. *Journal of Physical Chemistry*, 1979, 83, 1385–1388.
- C**
- Cazalbou **2004** Cazalbou, S.; Eichert, D.; Combes, C.; Rey, C. *Journal of Materials Chemistry* 2004, 2148-2153.
- Ciesielski **2011** Ciesielski, W.; Kassassir, H.; Potrzebowski, M. J. *Solid state nuclear magnetic resonance* 2011, 39, 151-7.
- Combes **2010** Combes, C.; Rey, C. *Acta biomaterialia* 2010, 6, 3362-78.
- Crosby **1988** Crosby R. C., Reese R. L., Haw J. F., *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110, 8550
- Curry **1971** Curry, N. A.; Jones, D. W. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical* 1971, 3725-3729.
- D**
- E**
- Eanes **1970** Eanes, E. D., Posner, A. S., *Biological calcification* ed. H. Schraer, 1970 1-26.
- Eanes **1977** Eanes, E. D.; Meyer, J. L. *Calcified Tissue International* 1977, 23, 259.
- Edelman **1954** Edelman, I. S., A. H. James, H. Baden, and F. D. Moore. *Journal of Clinical Investigation*.1954 33:122–131.
- Elliott **1994** J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- F**
- Fernández-Seara **2002** Fernández-Seara, M. a; Wehrli, S. L.; Wehrli, F. W. *Biophysical journal* 2002, 82, 522-9.
- Flade **2001** Flade, K.; Lau, C.; Mertig, M.; Pompe, W. *Chemistry of Materials* 2001, 3596-3602.
- G**
- Georgalis **2000** Georgalis, Y.; Kierzek, A. M.; Saenger, W. *Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104, 3405–6.
- Glimcher **1957** Glimcher, M. J.; Hodge, A. J.; Schmitt, F. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1957, 43, 860-867.
- Guillion **1989** Guillion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson* 1989, 13, 57
- H**
- Harper **1966** Harper, R. A. ; Posner, A. S. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1966 122, 137
- Hartmann **1962** Hartmann, S.; Hahn, E. *Physical Review* 1962, 128, 2042-2053.
- Hester **1975** Hester, R. K.; Ackerman, J. L.; Cross, V. R.; Waugh, J. S. *Phys. Rev.Lett.* 1975, 34, 993-995.

- Hing **1993** Hing, A.E.; Schaefer, J. *Biochemistry* 1993, 32, 7513-7604
- Hu **2010** Hu, Y.-Y.; Rawal, a; Schmidt-Rohr, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107, 22425-9.
- Huang **2009** Huang, S.-J.; Tsai, Y.-L.; Lee, Y.-L.; Lin, C.-P.; Chan, J. C. C. *Chemistry of Materials* 2009, 21, 2583-2585.
- Hunter **1996** Hunter, G. K.; Hauschka, P. V.; Poole, A. R.; Rosenberg, L. C.; Goldberg, H. A. *Biochemical Journal* . 1996, 317, 59.
- Huster **2002** Huster, D.; Schiller, J.; Arnold, K. *Magnetic resonance in medicine* 2002, 48, 624-32.

I
J

- Jaeger **2005** Jaeger, C.; Groom, N. S.; Bowe, E. a.; Horner, A.; Davies, M. E.; Murray, R. C.; Duer, M. J. *Chemistry of Materials* 2005, 17, 3059-3061.
- Jäger **2006** Jäger, C.; Welzel, T.; Meyer-zaika, W.; Epple, M. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2006, 44, 573-580.

K

- Kaflak **1998** Kaflak A, Chmielewski D, Górecki A, Kolodziejski W., *Solid State NMR* 1998 10:191–196.
- Kaflak **2003** Kaflak-Hachulska, A.; Samoson, A.; Kolodziejski, W. *Calcified tissue international* 2003, 73, 476-86.
- Kaflak **2008** Kaflak, A.; Kolodziejski, W. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* 2008, 46, 335-41.
- Kim **2005** Kim S, Ryu HS, Shin H, Jung HS, Hong KS, *Materials Chemistry and Physics* 2005;91:500–6.
- Kolmas **2007** Kolmas, J.; Kolodziejski, W. *Chemical communications (Cambridge, England)* 2007, 21, 4390-2.
- Kolodziejski **1997** Kolodziejski, W.; Klinowski, J. *Chemical Physics Letters*, 1997, 206, 597
- Kolodziejski **1997B** Kolodziejski, W.; Klinowski, J. *The Journal of Physical Chemistry A* 1997, 101, 3937;
- Kolodziejski **2005** Kolodziejski, W. *Topics in current chemistry* 2005, 246, 235-70.

L

- Legeros **1978** Legeros, R. Z.; Bonel, G.; Legros, R. *Calcified Tissue Research* 1978, 118, 111-118.
- Levitt **1986** Levitt, M. H.; Suter, D.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* 1986, 84, 4243-4255.

M

- Mason **2008** Mason, H. E.; Kozlowski, A.; Phillips, B. L. *Chemistry of Materials* 2008, 294-302.
- Mathew **1988** Mathew M., Brown W. E. ,Schroeder L.W., Dickens B., *Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research*, 1988, 8, 235–250.
- Mathew **2011** Mathew, R.; Gunawidjaja, P. N.; Izquierdo-barba, I.; Jansson, K.; García, A.; Arcos, D.; Vallet-regí, M.; Ed, M. *Journal of Physical Chemistry* 2011, 0-10.
- Mueller **1966** Mueller, K. H.; Trias, A. M. D.; Ray, R. D. *JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY-AMERICAN* 1966, 48, 140-148.
- Müller **1974** Müller, L.; Kumar, A.; Baumann, T.; Ernst, R. R. *Phys. Rev. Lett.* 1974, 32, 1402-1406.

N

- Naito **1986** Naito, A.; McDowell, C. A. *J. Chem. Phys.* 1986, 84,4181-4186.
- Ndao **2009** Ndao, M.; Ash, J. T.; Breen, N. F.; Goobes, G.; Stayton, P. S.; Drobny, G. P. *Langmuir* 2009, 25, 12136-12143.
- Ndao **2010** Ndao, M.; Ash, J. T.; Stayton, P. S.; Drobny, G. P. *Surface science* 2010, 604, L39-L42.
- Neuman **1958** Neuman W.F.; Neuman M.W. Chicago, The University of Chicago Press, 1958,

- 39–54
- Neuman 1956** Neuman, W. F.; Toribara, T. Y.; Mulryan, B. J. *Journal of the American Chemical Society* 1956, 4263.
- Neuman 1975** Neuman, W. F.; Bareham, B. J. *Calcified tissue research* 1975, 17, 249-55.
- Neuman 1975 B** Neuman, W. F.; Bareham, B. J. *Calcified tissue international* 1975, 172, 161-172.
- Nancollas 1974** Nancollas, G. H.; Tomazic, B. *Journal of Physical Chemistry* 1974, 78, 2218.
- Nikel 2012** Nikel, O.; Laurencin, D.; Bonhomme, C.; Sroga, E.; Besdo, S.; Lorenz, A.; Vashishth, D. *Journal of Physical Chemistry* 2012, 116, 6320-6331.
- Nyman 2008** Nyman, J. S.; Ni, Q.; Nicolella, D. P.; Wang, X. *Bone* 2008, 42, 193 - 199.
- O**
- Onuma 2006** Onuma, K. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 2006, 52, 223–45.
- P**
- Picard 2001** Pickard, C.; Mauri, F. *Physical Review B* 2001, 63, 1-13.
- Pourpoint 2007** Pourpoint, F.; Gervais, C.; Bonhomme-Coury, L.; Azaïs, T.; Coelho, C.; Mauri, F.; Alonso, B.; Babonneau, F.; Bonhomme, C. *Applied Magnetic Resonance* 2007, 32, 435-457.
- Pourpoint 2008** Pourpoint, F.; Gervais, C.; Bonhomme-Coury, L.; Mauri, F.; Alonso, B.; Bonhomme, C. *Comptes Rendus Chimie* 2008, 11, 398-406.
- Q**
- R**
- Raghunathan 2006** Raghunathan, V.; Gibson, J. M.; Goobes, G.; Popham, J. M.; Louie, E. a; Stayton, P. S.; Drobny, G. P. *The journal of physical chemistry. B* 2006, 110, 9324-32.
- Rai 2011** Rai, R. K.; Sinha, N. *Journal of Physical Chemistry* 2011, 115, 14219-14227.
- Reid 2008** Reid, D. G.; Duer, M. J.; Murray, R. C.; Wise, E. R. *Chemistry of Materials* 2008, 20, 3549-3550.
- Rey 1989** Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T.; Dickson, I. R.; Glimcher, M. J. *Calcified tissue international* 1989, 45, 157-164.
- Rey 1995** Rey C.; Hina A.; Tofighi A.; Glimcher M.J., *Cells Materials* 1995 5:345-356
- Rey 2007** Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H.; Barroug, A *Materials Science and Engineering: C* 2007, 27, 198-205.
- Roberts 1992** Roberts, J. E.; Bonar, L. C.; Griffin, R. G.; Glimcher, M. J. *Calcified tissue international* 1992, 50, 42-8.
- Roufosse 1984** Roufosse, A H.; Aue, W. P.; Roberts, J. E.; Glimcher, M. J.; Griffin, R. G. *Biochemistry* 1984, 23, 6115-20.
- S**
- Saitô 1992** Saitô, H.; Yokoi, M. *Journal of biochemistry* 1992, 111, 376-82.
- Schaefer 1979** Schaefer J., Mckay R.A., Stejskal E.O., *J. Magn. Reson.* 34 (1979) 443–447.
- Seidel 2005** Seidel, K.; Etzkorn, M.; Sonnenberg, L.; Griesinger, C.; Sebald, A.; Baldus, M., *J. Phys. Chem. A*, 2005, 109, 2436
- T**
- Termine 1966** Termine, J. D.; Posner, A. S. *Science* 1966, 153, 1523-1525.
- Termine 1967** Termine, J. D.; Posner, A. S. *Calcified tissue international* 1967, 1, 8-23
- Termine 1972** Termine, J. D.; Eanes, E.D. *Calcified tissue international* 1972, 10, 171-197
- Tomlins 1998** Tomlins AM, Foxall PJD, Lindon JC, Lynch MJ, Spraul M, Everett JR, Nicholson JK. *Anal Commun* 1998;35:113–115
- Treboux 2000** Treboux, G.; Layrolle, P.; Kanzaki, N.; Onuma, K.; Ito, A. *Journal of the American Chemical Society* 2000, 122, 8323–4
- Tseng 2006** Tseng, Y.-H.; Mou, C.-Y.; Chan, J. C. C. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, 6909-18.
- U**
- V**

W	
Wilson 2005	Wilson, E. E.; Awonusi, A.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Tecklenburg, M. M.; Beck, L. W. <i>Journal of bone and mineral research</i> 2005, 20, 625-34.
Wilson 2006	Wilson, E. E.; Awonusi, A.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Tecklenburg, M. M. J.; Beck, L. W. <i>Biophysical journal</i> 2006, 90, 3722-31.
Wise 2007	Wise, E. R.; Maltsev, S.; Davies, M. E.; Duer, M. J.; Jaeger, C.; Loveridge, N.; Murray, R. C.; Reid, D. G. <i>Chemistry of Materials</i> 2007, 19, 5055-5057.
Wooley 1997	Wooley, K.L.; Klug, C. A.; Tasaki, K.; Schaefer, J. J. <i>Am. Chem. Soc.</i> 1997, 119, 53-58
Wu 1988	Wu X., Zhang S. ; Wu X., <i>Journal of Magnetic Resonance B</i> 1988 77, 343-347.
Wu 1993	Wu X.; Zilm K. W. <i>Journal of Magnetic Resonance A</i> 1993 102, 205-213.
Wu 1994	Wu, Y.; Glimcher, M. J.; Rey, C.; Ackerman, J. L. <i>Journal of Molecular Biology</i> 1994, 244, 423-435.
Wu 2002	Wu, Y.; Ackerman, J. L.; Kim, H.-M.; Rey, C.; Barroug, A.; Glimcher, M. J. <i>Journal of bone and mineral research</i> 2002, 17, 472-80.
X	
Y	
Yesinowski 1987	Yesinowski, J. P.; Eckert, H. <i>Journal of the American Chemical Society</i> 1987, 109, 6274-6282.
Z	
Zioupou 1998	Zioupou, P.; Currey, J. D. <i>Bone</i> 1998, 22, 57.
Zhu 2009	Zhu, P.; Xu, J.; Sahar, N.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Ramamoorthy, A. <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2009, 131, 17064-5.
Zhu 2010	Zhu, P.; Xu, J.; Morris, M.; Kohn, D.; Ramamoorthy, A. <i>Bone</i> 2010 , 47, S388-S389.

Conclusion Générale

L'objectif de ce travail de thèse était d'élaborer des matrices mimétiques du tissu osseux (en terme d'organisation des fibrilles de collagène ; de nature et distribution de la phase minérale) afin de progresser dans la compréhension des mécanismes physico-chimiques impliqués dans la formation du tissu osseux.

La matrice de collagène ayant un rôle de charpente pour le tissu osseux, notre approche fut de synthétiser une matrice dense de collagène dont l'organisation hiérarchique mimait celle du tissu compact de l'os afin d'élaborer un bon modèle de matrice hybride collagène/apatite. Pour cela, nous avons mis en place un procédé d'élaboration de matrices denses fibrillaires de collagène (Wang 2011, brevet FR 2960439/WO 2011151587) en combinant la méthode de dialyse inverse avec celle d'injection continue. Cette méthode nous a permis d'obtenir des matrices denses de collagène, de manière reproductible, en contrôlant la quantité de collagène injectée au cours du temps. Ces synthèses ont ouvert l'accès à l'étude de nouveaux composites collagène/apatite.

Avant l'étude de l'étape de minéralisation, nous avons entrepris une caractérisation fine des apatites biologiques servant de référence et des phases d'apatite de synthèse servant de modèle. Nous avons mis en évidence l'influence de la substitution par les ions carbonates sur les caractéristiques structurales des nanoparticules d'apatite de synthèse. L'augmentation du taux de carbonate implique une diminution de la taille des cristallites des nanoparticules d'apatite. Le désordre structural induit par l'insertion d'ions carbonates au sein de la structure se traduit par une distribution d'environnement chimique du noyau ^{31}P plus importante. L'analyse des différents environnements chimiques du phosphore a permis la mise en évidence d'une organisation cœur-couronne des nanoparticules d'apatite biologiques et synthétiques. Ceci confirme le modèle proposé dans la littérature : le cœur des particules est constitué par une phase cristalline apatitique entourée d'une couche externe amorphe hydratée.

Cette similarité entre l'apatite biologique et les apatites de synthèse confirme la possibilité de synthétiser des apatites mimétiques de l'apatite biologique. Elle laisse aussi supposer que l'interface organique/minérale dans le tissu osseux s'effectue entre les molécules organiques et la couche externe amorphe des particules d'apatite.

Nous avons été surpris de constater la similitude importante entre les apatites biologiques et les apatites CHApSBF en termes de morphologie, de cristallinité et d'environnement chimique du noyau ^{31}P . Ces deux matériaux sont pourtant formés dans des milieux très différents, la seule molécule organique présente dans la solution SBF 1,5 est le trishydroxyméthylaminométhane (un tampon). Nous avons expliqué cette similitude par la substitution de divers ions. Il pourrait être intéressant d'étudier plus en détail les apatites obtenues par précipitation de la solution SBF 1,5 en variant certaines conditions de synthèse telles que la concentration des précurseurs ioniques, le pH de la solution initiale ou la solution tampon, afin de déterminer les principaux facteurs qui sont responsables de son analogie avec les apatites biologiques.

Après les études approfondies de la matrice de collagène et de la phase minérale, nous avons minéralisé la matrice dense de collagène selon un procédé mettant en jeux les propriétés physico-chimiques du collagène en absence d'autres molécules organiques présentes *in vivo* telles que des GAGs ou NCPs, et en augmentant la charge en minéral par imprégnation dans un fluide physiologique (SBF 1,5) sous agitation (Wang 2012). Nous avons ainsi réussi à réaliser la minéralisation de ces matrices dont l'organisation mime le réseau fibrillaire de l'os compact. Les résultats montrent que les plaquettes d'apatites carbonatées, de taille nanométrique, co-alignent selon l'axe *c* avec l'axe principal des fibrilles de collagène uniquement dans la matrice où la concentration en ions calcium et phosphate est nettement supérieure au milieu physiologique pendant l'étape de concentration du collagène. Ces résultats nous ont permis de démontrer ici l'influence de la densité et de l'organisation hiérarchique de la matrice sur la phase minérale (orientation, taille, structure), ainsi que le rôle indispensable des NCPs pour concentrer localement les précurseurs ioniques dans les sites de nucléation intrafibrillaire lors de la minéralisation *in vivo*.

Malgré tous les efforts que nous avons faits pour élaborer notre matériau, nous avons toutefois négligé un paramètre qui doit être important *in vivo*. En effet, dans les milieux biologiques, la pression partielle en CO_2 n'est pas négligeable. Afin d'obtenir un système plus proche du système naturel, il serait alors intéressant de réaliser les expériences sous atmosphère contrôlé en CO_2 .

Nous sommes parvenus à réaliser une matrice biomimétique du tissu osseux avec ou sans phase minérale, la validation de ces matrices comme implants osseux a été réalisée dans des sites osseux intra-fémoraux chez le gros animal (la brebis). Les premiers résultats sont

encourageants donnant accès à de nouveaux matériaux d'implant qui réunissent les caractéristiques nécessaires pour de telles applications à savoir la biocompatibilité et la biorésorbabilité.

Même si la compréhension du mécanisme de biominéralisation est loin d'être complète, ce système peut être utilisé pour de nouvelles études telles que l'étude cinétique de la minéralisation. Il donne aussi accès, comme évoqué précédemment, à l'étude du rôle des NCPs sur la nucléation/croissance. Cela peut être effectué en ajoutant des molécules organiques pendant les différentes étapes de préparation des matrices à savoir, par exemple, pendant l'étape de concentration de la solution acide de collagène en présence des précurseurs ioniques ou pendant l'imprégnation dans des bains SBF 1,5. Enfin, l'influence des précurseurs ioniques peut aussi être évaluée par ce modèle. Les résultats préliminaires montrent déjà un effet des ions sur la morphologie des fibrilles de collagène.

Pendant ce travail de thèse, nous avons pu mettre en avant l'intérêt d'utiliser une technique telle que la RMN à l'état solide pour caractériser des matériaux composites. Cette technique de caractérisation nous a permis de distinguer différentes phases même les moins cristallisées et nous a donné accès à l'étude de l'interface. Même si nos études sur l'interface organique/minéral par RMN à l'état solide en utilisant la séquence REDOR ne sont pas encore achevées, elle devrait apporter des informations pertinentes sur la structure à l'interface collagène/apatite. En effet, cette technique semble adaptée aux études sur des matrices hybrides collagène/apatite séchées.

En conclusion, ce travail de thèse est un apport intéressant en vue d'une meilleure compréhension du mécanisme de biominéralisation de l'os. En parallèle de cet aspect fondamental de la recherche, il a aussi ouvert une voie plus appliquée en permettant la synthèse de biomatériaux pour des implantations osseuses.

Matériels et Méthodes

I.	Liste des réactifs et des solutions.....	187
II.	Synthèses des apatites.....	188
1.	Synthèses par diffusion de vapeur de NH_3	188
2.	Synthèses par la méthode de neutralisation.....	189
3.	Apatites formées à partir de la solution SBF 1,5.....	190
3.1	Préparation de la solution SBF 1,5 à $\text{pH} = 7,4$	190
3.2	Précipitation de la solution SBF 1,5 par congélation/décongélation.....	191
4.	Echantillons issus du tissu osseux.....	191
III.	Préparation des solutions de collagène.....	192
1.	Extraction du collagène de type I.....	192
2.	Dosage de l'hydroxyproline.....	194
3.	Conditionnement des échantillons.....	196
IV.	Concentration des matrices denses de collagène sans ou avec minéral.....	196
1.	Concentration de collagène par dialyse inverse en injection continue (Wang 2011).....	196
2.	Synthèses des matrices hybrides collagène/apatite (co-précipitation de collagène avec l'apatite) : Coll/CHA et Coll/SBF.....	198
2.1	La matrice hybride (Coll/CHA).....	199
2.2	La matrice hybride (Coll/SBF).....	199
3.	Synthèse de matrices hybrides collagène / apatite en présence d'additifs organiques.....	200
3.1	Synthèse d'une matrice de collagène et d'une matrice hybride en présence de polyAspartate (Coll/PolyAsp et Coll/SBF/PolyAsp).....	200
3.2	Synthèse d'une matrice de collagène et d'une matrice hybride en présence d'héparine (Coll/Hép et Coll/SBF/Hép).....	200
4.	Augmentation de la charge en minéral par imprégnation des matrices.....	201
V.	Informations structurales et techniques de caractérisation correspondantes.....	203
1.	La microscopie électronique à transmission (MET) et les cryométhodes.....	203
1.1	Observation par MET.....	203
1.2	Les cryo-Méthodes.....	206
2.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	207
3.	Analyses thermogravimétriques (ATG).....	207
4.	Spectroscopie infrarouge (IR).....	208
5.	Diffraction des Rayons X (DRX).....	209
6.	Résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide.....	210
6.1	Séquence HPDEC.....	211
6.2	Séquence CP (Polarisation Croisée).....	211
6.3	Séquence HETCOR.....	212
6.4	Séquence double CP.....	212
6.5	Séquence REDOR.....	213

Matériels et Méthodes

I. Liste des réactifs et des solutions

Réactif	Nom	Pureté
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Chlorure de calcium dihydraté	$\geq 99\%$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Nitrate de calcium tétrahydraté	$\geq 99.0\%$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Phosphate diammonique	$\geq 99.99\%$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté	$\geq 99.1\%$
NaHCO_3	Bicarbonate de sodium	$\geq 99\%$
NaCl	Chlorure de sodium	$\geq 99.0\%$
Na_2SO_4	Sulfate de sodium	
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Phosphate de dipotassium trihydraté	
KCl	Chlorure de potassium	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Chlorure de magnésium hexahydraté	
$(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol	
Solution	Composition chimique et concentration	
Phosphate Buffered Saline (PBS 1x)	NaCl , 137 mM ; KCl , 2,7 mM ; Na_2HPO_4 , 10 mM ; KH_2PO_4 , 1,76 mM	
Simulated Body Fluid (SBF)	NaCl , 142 mM ; NaHCO_3 , 4,2 mM ; KCl , 3 mM ; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 mM ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mM ; Na_2SO_4 , 0,5 mM ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM ; $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$, 0,01M	

II. Synthèses des apatites

Les apatites mentionnées dans la thèse ont été obtenues à partir de synthèses décrites dans la littérature.

1. Synthèses par diffusion de vapeur de NH_3

Cette synthèse a été effectuée selon le procédé décrit par Nassif *et al.* (Nassif 2010). Les solutions de sels de calcium et de phosphate sont préparées dans une solution aqueuse d'acide acétique (500 mM) à température ambiante. Le pH de ces solutions est ajusté à 2,2 en ajoutant de l'acide chlorhydrique (HCl) 12M. Deux solutions différentes sont préparées :

HApD : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à une concentration 110 mM; NaH_2PO_4 à 66 mM. Le rapport molaire Ca/P est 1,67 correspond à la formation de l'apatite stœchiométrique (Nassif 2010)

CHApD : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à une concentration 110 mM; NaH_2PO_4 à 33 mM et NaHCO_3 à 33 mM. Le rapport molaire Ca/P est déficient en phosphate, mais le rapport molaire Ca/(P+C) est égal à 1,67.

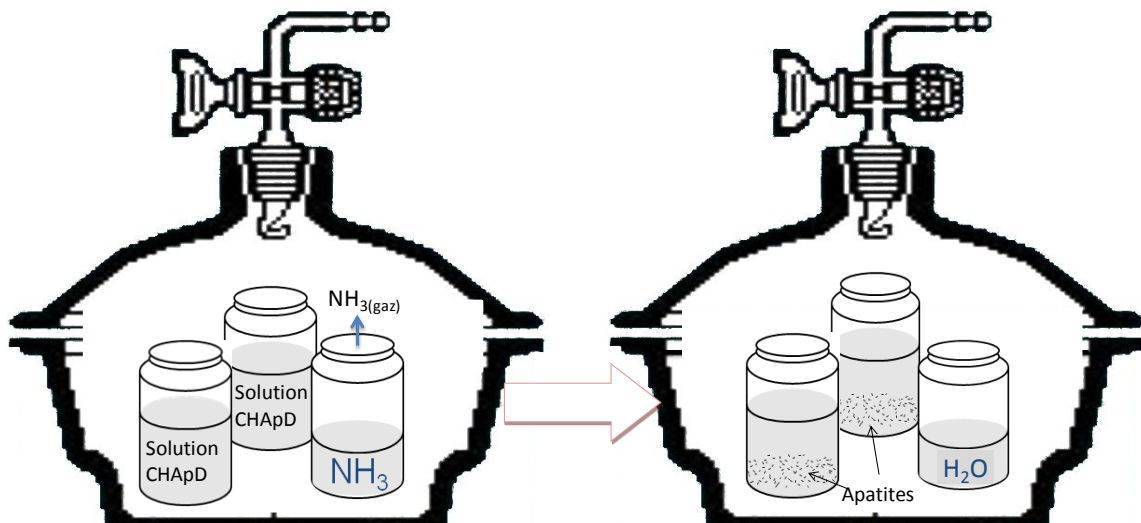


Figure 1 : Schéma du montage pour la synthèse de HApD et CHApD obtenues par la méthode de diffusion de vapeur d'ammoniac

Trois flacons (35 ml, h = 50 mm) sont placés dans un dessiccateur de 1L fermé hermétiquement (Fig. 1). Deux des flacons contiennent 20 ml des solutions préparées précédemment et le troisième, 8 ml de solution aqueuse d'ammoniaque 30% w/w. Les trois récipients sont couverts de Parafilm percé de quelques trous avec une aiguille afin de ralentir la diffusion de vapeur d'ammoniac. Le dessiccateur est placé sous hotte à température ambiante.

Suite à la diffusion de vapeur d'ammoniac, le pH des solutions augmente et des précipités sont observés au bout de 1 heure. Après 7 jours, le pH de la solution est 10-11. Les précipités sont récupérés par centrifugation pendant 10 min à une vitesse de 22290G à 10°C, lavés ensuite avec 40 mL d'eau doublement distillée. Cette étape de centrifugation-lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de lavage soit neutre (4 ou 5 fois en moyenne). Les précipités sont séchés à l'étuve à 37°C pendant 7 jours. Ensuite, les précipités de couleur blanche sont broyés dans un mortier et stockés dans des piluliers en verre avant les caractérisations.

2. Synthèses par la méthode de neutralisation

Les synthèses ont été réalisées selon le procédé décrit dans la littérature (Osaka 1991). Les nanocristaux d'apatite sont obtenus par réaction entre du nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et de l'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Toute l'eau utilisée pendant la synthèse et le lavage est portée à ébullition et refroidie sous barbotage d'azote (N_2) pour s'affranchir du CO_2 dissous.

Une solution aqueuse de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ à 300 mM (100 ml) dont le pH est ajusté à 10 (par ajout d'une solution d'ammoniaque 30% w/w), est ajoutée à la vitesse constante de 3 ml/min à 100 ml de solution (500 mM) de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sous forte agitation à température ambiante. Pour que la vitesse d'ajout soit constante pendant la réaction, nous avons utilisé un titreur automatique (Titrand 808, Metrohm). L'expérience a lieu entièrement sous atmosphère d' N_2 , afin d'éviter la carbonatation des solutions. Dans le cas de la synthèse d'apatite carbonatée, la source de carbonate à savoir le bicarbonate de sodium NaHCO_3 est ajoutée à la solution de phosphate. Le rapport Ca/P reste constant à 1,67.

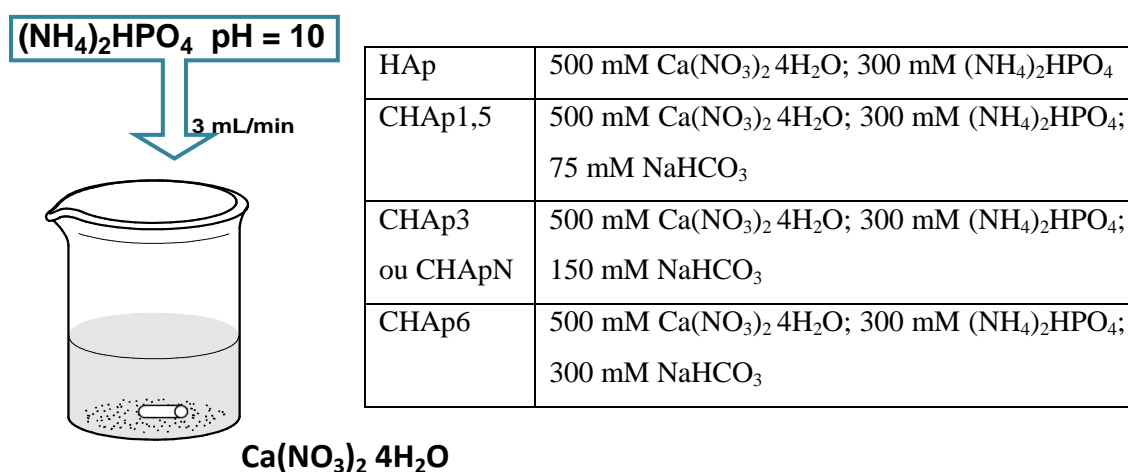


Figure 2 : Schéma du montage pour la synthèse d'apatite par la méthode de neutralisation. A droite : tableau résumant les concentrations en précurseurs dans les différents échantillons

Après l'ajout, la solution est agitée pendant 24h. Les précipités sont récupérés par centrifugation pendant 10 min à une vitesse de 22290G à 10°C, ensuite lavés avec 40 mL d'eau doublement distillée. Cette étape centrifugation-lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de lavage soit neutre (environ 3 fois). Ensuite les échantillons sont séchés à l'étuve à 105°C pendant 48 h. Des poudres de couleur blanche sont obtenues.

Pour l'étude de la substitution par les ions carbonates, nous avons varié la quantité de précurseurs carbonatés introduits (Tableau de la figure 2).

3. Apatites formées à partir de la solution SBF 1,5

3.1 Préparation de la solution SBF 1,5 à pH = 7,4

Cette solution physiologique est une solution dont la concentration en ions est proche de celle présente dans le fluide extracellulaire ou le plasma sanguin humain. Elle a été mise en place, afin de reproduire la formation de l'apatite *in vitro* sur des matériaux bioactifs. Il existe différentes solutions physiologiques dont la composition en ions est variée (Hanks 1949 & Kokubo 1987). La solution physiologique mise en place par Kokubo *et al.*, nommée « Simulated Body Fluid » (SBF) possède une concentration en ions proche de celle du plasma sanguin humain. La différence majeure entre la composition de ce SBF et le fluide physiologique est la quantité de HCO_3^- qui est plus faible dans le cas du SBF (Tab. 1).

Ion	Simulated body fluid	Human blood plasma
Na^+	142.0 mM	142.0 mM
K^+	5.0 mM	5.0 mM
Mg^+	1.5 mM	1.5 mM
Ca^+	2.5 mM	2.5 mM
Cl^-	148.8 mM	103.0 mM
HCO_3^-	4.2 mM	27.0 mM
HPO_4^{2-}	1.0 mM	1.0 mM
SO_4^{2-}	0.5 mM	0.5 mM

Tableau 1 : Comparaison de concentration des ions dans le SBF et le plasma sanguin humain

Néanmoins, pour nos synthèses, nous avons utilisé une solution de SBF 1,5 fois plus concentrée en sels par rapport au SBF de Kokubo notée « SBF 1,5 » (RHEE 2000). Cette solution est moins stable que le SBF conventionnel et la formation d'apatite est plus rapide à partir de cette solution.

La solution SBF 1,5 est préparée en dissolvant 1,2 g de 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 121,1 g/mol, 0,01M) qui est un tampon de la solution dans 1 L d'eau double-distillée sous agitation. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 7,4 avec de

l'acide chlorhydrique (HCl) concentré (12 M). La solution est maintenue à 37°C dans un bain d'huile. Les sels suivants sont ajoutés successivement dans la solution l'un après l'autre, l'ajout d'un sel ayant toujours lieu après la dissolution totale du précédent :

NaCl 12,45g (213 mM, 58,44 g/mol); NaHCO₃ 0,529g (6,3 mM, 84 g/mol); KCl 0,334 g (4,5 mM, 74,55 g/mol) ; K₂HPO₄·3H₂O 0,342 g (1,5 mM, 228,2 g/mol) ; CaCl₂·2H₂O 0,559 g (3,8 mM, 147,02 g/mol) ; Na₂SO₄ 0,107 g (0,75 mM, 142,04 g/mol) ; MgCl₂·6H₂O 0,467 g (2,3 mM, 203,21 g/mol)

Après dissolution complète de tous les sels, on mesure le pH. Généralement, le pH reste à 7,4, mais si le pH a changé le réajustement de pH est nécessaire avec HCl ou NH₃ concentrés. Ensuite, pour éviter toute contamination par des microorganismes, quelques milligrammes de NaN₃ sont ajoutés dans la solution, bien qu'elle soit aussi stérilisée par filtration. Elle est conservée à 4°C. La force ionique de la solution est 248,9 mM soit 1,5 fois plus importante que celle du SBF.

3.2 Précipitation de la solution SBF 1,5 par congélation/décongélation

La solubilité des ions dans l'eau change en fonction de la température. Nous avons utilisé cette caractéristique en plaçant une bouteille de solution SBF 1,5 dans un congélateur à -20°C pendant 12 h. Ensuite, la solution est remise à température ambiante jusqu'à la décongélation totale. Des précipités de couleur blanche sont trouvés au fond du flacon et en suspension dans la solution SBF 1,5. Ils sont alors récupérés par centrifugation pendant 10 min à une vitesse de 22290G à 10°C et séchés dans l'étuve à 37°C pendant 3 jours.

4. Echantillons issus du tissu osseux

Les prélèvements osseux utilisés pour les caractérisations proviennent de l'Institut Mutualiste Montsouris (IMM) CERA. Les échantillons d'os sont prélevés à l'aide d'une perceuse électrique d'os longs (sites métaphysaires et diaphysaires) de brebis de deux ans sacrifiées pour d'autres sujets de recherche. Les morceaux d'os sont fermés hermétiquement ou conservés dans une solution de PBS 1X, puis conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation.

Pendant la thèse, nous avons étudié des échantillons issus du tissu osseux sous différents états.

Os frais : L'échantillon d'os frais extrait de brebis est utilisé directement pour les caractérisations sans aucun traitement avec ou sans imprégnation dans du PBS 1X.

Os séché : L'échantillon est obtenu par séchage de l'échantillon d'os frais sous sorbonne pendant 48 h avant la caractérisation.

Bioapatite (Os sec et lavé) : Nous avons utilisé aussi l'échantillon d'os de brebis pour lequel les débris cellulaires (phospholipides) sont éliminés par lavage dans du chloroforme (CHCl_3). Ceci nécessite plusieurs bains successifs de CHCl_3 sous agitation avec une durée de 24 h pour chaque bain.

III. Préparation des solutions de collagène

1. Extraction du collagène de type I

Solutions utilisées :

CH_3COOH 0,5M	CH_3COOH Purex 58ml ; H_2O 2L
NaCl 4M	NaCl 467,5g ; H_2O 2L
NaCl 4M/ CH_3COOH 0,5M	NaCl 233,8g ; CH_3COOH 0,5M 1L
PBS (Phosphate Buffer Saline) 10X	NaCl 80g ; KCl 2g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 28,9g ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,027g ; H_2O doublement distillée 1L

Tableau 2 : Composition des solutions utilisées pendant l'extraction du collagène

1) Prélèvement des tendons

Le collagène utilisé durant cette thèse est extrait de queues de rat qui proviennent de rats de laboratoire du type wistar âgé de 5~6 mois maximum, n'ayant pas subi de traitement particulier. Les tendons sont prélevés sur les queues de rats à l'aide d'une pince coupe-ongles. On serre légèrement la queue à 1 cm de son extrémité fine, ensuite on casse la vertèbre par rotation du poignet et on tire pour sortir une partie du tendon de la queue. Le tendon recueilli est immédiatement mis dans un bécher de PBS. L'opération se répète de 1 cm en 1 cm tout au long de la queue. Les 3 derniers centimètres à la base de la queue ne sont pas utilisés. Toutes les opérations sont réalisées sous hotte de culture cellulaire stérile.

2) Lavage des tendons

Les tendons sont lavés abondamment avec du PBS 1X, puis centrifugés à 4°C à 5500 tours/min pendant 5 min. L'opération doit être répétée plusieurs fois jusqu'à ce que le surnageant soit limpide et incolore, c'est-à-dire sans sang résiduel (notamment sans d'albumine). Après lavage, les tendons sont rincés par une solution aqueuse de NaCl 4 M afin

de lyser les cellules résiduelles par choc osmotique et afin de faire précipiter d'éventuelles protéines de haut poids moléculaires. Les tendons sont encore une fois lavés abondamment avec du PBS 1X, puis centrifugés à 4°C à 5500 tours/min pendant 5 min. L'opération doit être répétée plusieurs fois afin d'éliminer un maximum de sels et tous les débris cellulaires.

3) Mise en solution et purification du collagène

Les tendons sont mis dans une solution aqueuse de CH₃COOH à 0,5 M stérile, puis agités pendant 24 h à 20°C jusqu'à dissolution totale du collagène.

La solution de collagène est centrifugée à 4°C à 21000 rpm pendant 2 heures afin d'éliminer les gros agrégats non dissous. Le surnageant est récupéré et mélangé avec la solution de NaCl à 4 M. Le volume de solution de NaCl est ajouté de façon à obtenir une concentration finale du sel égale à 300 mM. En effet, les éventuels contaminants (sang ou protéines) précipitent à une telle concentration ce qui permet ensuite de les éliminer par centrifugation à 21000 rpm pendant 3 heures.

Le surnageant est récupéré, puis le collagène est précipité en présence d'une solution de NaCl à 4 M dans une solution de CH₃COOH à 0,5 M de façon à ce que la concentration finale du sel soit 700 mM. Le collagène précipité est récupéré par centrifugation à 4400 rpm pendant 10 minutes à 10°C. La centrifugation est arrêtée lorsque la solution de collagène est limpide et jusqu'à disparition de culot au fond des tubes de centrifugation. Ceci permet aussi d'éliminer définitivement les molécules résiduelles organiques/débris cellulaires encore présentes en solution.

Les culots sont alors rassemblés et resolubilisés dans une solution de CH₃COOH à 0,5 M. Notons que 200 grammes de culots dans 1,8 L de solution de CH₃COOH conduisent à une solution de collagène concentrée à 2-3 mg/ml.

Afin d'éliminer le sel et HCl, quatre dialyses successives sont effectuées contre du CH₃COOH à 0,5 M. Il faut environ 10 volumes de CH₃COOH pour un volume de collagène dialysé. Afin d'éliminer les agrégats non dissous, une dernière centrifugation est effectuée à 21000 rpm pendant 3 heures à 15°C.

2. Dosage de l'hydroxyproline

La concentration en collagène des solutions est déterminée par un dosage de l'hydroxyproline, acide aminé quasi spécifique du collagène qui représente environ 10% de son poids moléculaire. Pour cela, le collagène doit être préalablement hydrolysé.

Solutions utilisées

Tampon de dosage (Solution conservée à 4°C)	6,25 g Acide citrique monohydraté (0,25 M) 17,5 g Acétate de sodium trihydraté (1 M) 4,25 g Hydroxyde de sodium (0,85 M) 1,5 ml Acide acétique Purex 125 ml H ₂ O Ajuster le pH à 6 avec l'acide acétique Purex
Acide Perchlorique 3,15 M (Solution conservée à 4°C)	30 ml Acide Perchlorique 65% (10,39 M) 70 ml H ₂ O distillée
Hydroxyproline standard (20 µg/ml)	Solution mère : 20 mg Hydroxy-L-Proline 100 ml H ₂ O distillée Solution de dosage : 1/10 de la solution mère
Solution de Chloramine T	400 mg Chloramine T 5 ml H ₂ O distillée 7,5 ml Méthyl Cellosolve (éther monoéthylique de l'éthylène glycol) 12,5 ml Tampon de dosage
Solution de DMBA	1 g DMBA (Diméthylamino-4 benzaldéhyde) 5 ml Méthyl Cellosolve

Tableau 3 : Composition des solutions utilisées

1) Hydrolyse du collagène

Quand la concentration en collagène est supérieure à 20 mg/ml, la solution de collagène est diluée à l'aide d'une solution de CH₃COOH à 0,5 M afin d'avoir une valeur expérimentale correcte. Le facteur de dilution est fixé en fonction de la concentration initiale de collagène, une concentration d'environ 5 mg/ml en collagène après dilution est optimale pour la mesure. Pour accélérer la dissolution, le mélange est mis dans un bain à ultrasons jusqu'à obtenir d'une dissolution totale.

Une fois la solution de collagène prête, 50 µL de cette dernière est mélangé avec 50 µL de HCl à 35% puis le mélange est vortexé. Les molécules de collagène sont ainsi

hydrolysées en milieu acide afin de libérer les résidus d'hydroxyproline. Ce mélange est fermé hermétiquement et placé à l'étuve à 100°C pendant une nuit. Le mélange est ensuite séché avec le bouchon d'épendorff ouvert toujours à l'étuve à 100°C afin d'évaporer le liquide restant.

2) Dosage de l'hydroxyproline

1 ml d'eau distillée est ajouté dans les échantillons séchés précédemment à l'étuve puis l'ensemble est vortexé. Ensuite les échantillons sont dilués avec de l'eau (Tab. 4①) et coloré par la Chloramine T (Tab. 4②). En fait, l'hydroxyproline est oxydée par de la chloramine T. Ensuite, cette réaction est stoppée par de l'acide perchlorique (Tab. 4③). Un complexe coloré généré par le diméthylamino-4-benzaldéhyde (DMBA) (Tab. 4④) avec l'hydroxyproline est détecté par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 557 nm. Une gamme étalon d'hydroxyproline est préparée comme indiqué ci-dessous :

	Gamme d'hydroxyproline à partir d'une solution mère à 20 µg/ml					Echantillon collagène		
Hydroxyproline ou échantillons (µL)	0 0 µg/ml	40 0,8 µg/ml	80 1,6 µg/ml	100 2 µg/ml	140 2,8 µg/ml	10	20	40
①H ₂ O (µL)	400	360	320	300	260	390	380	360
Dilution						1/40	1/20	1/10
②Chloramine T	200 µL à température ambiante pendant 20 min, vortexer							
③Acide perchlorique 3,15 M	200 µL à température ambiante pendant 5 min, vortexer							
④DMBA	200 µL à 60°C pendant 20 min, vortexer							

Tableau 4 : Composition des solutions utilisées pendant le dosage de l'hydroxyproline

3) Calcul de la concentration en collagène

La concentration en collagène dans la solution initiale est déduite à partir de la concentration mesurée d'hydroxyproline, sachant que l'hydroxyproline représente 13% de la masse de collagène. La valeur obtenue correspond à une concentration massique (mg de collagène/g de solution). La densité de la solution étant proche de 1 mg/mL, nous avons utilisé la concentration massique comme unité (mg/ml).

Le facteur de dilution tient compte (i) du volume de l'échantillon dilué dosé ; (ii) de la reprise de l'extrait de collagène sec dans 1 ml d'H₂O diluée ; (iii) de la quantité de collagène hydrolysée.

3. Conditionnement des échantillons

Après purification, la solution de collagène peut être conservée à 4°C afin d'éviter la dénaturation, pendant plusieurs mois, dans un récipient étanche qui la protège de l'évaporation et de la contamination par des champignons et/ou des bactéries.

IV. Concentration des matrices denses de collagène sans ou avec minéral

1. Concentration de collagène par dialyse inverse en injection continue

(Wang 2011)

Le procédé est une combinaison des procédés de dialyse inverse et d'injection continue. Avant tout, il nous faut monter un système hermétique (Fig. 3) qui se compose d'une seringue, d'un capillaire (long ~ 30 cm, diamètre ~ 1 mm, en téflon), d'un bouchon de dialyse (QuixSep, 1mL) et d'une membrane de dialyse en cellulose (CelluSep, taille de pores 3,5 kD). Nous remplissons la seringue d'une solution diluée (à 1 ou 3 mg/ml) de collagène solubilisée dans de l'acide acétique (500 mM), dont l'extrémité est bouchée par un cône percé lui-même à son extrémité pour laisser passer le capillaire. L'autre extrémité du capillaire est insérée dans un bouchon de dialyse percé préalablement au diamètre du capillaire au fond du bouchon. En tenant l'ouverture du bouchon vert le haut, on pousse la seringue afin que le bouchon de dialyse soit rempli au bord. Ensuite, on couvre l'ouverture du bouchon avec la membrane de dialyse, puis on la maintient sur le bouchon en enfilant un couvercle cylindrique rouge. Une fois, le montage du système fini, l'étanchéité des joints au niveau des jonctions bouchon/capillaire et capillaire/cône est assurée avec de la cire fondue.

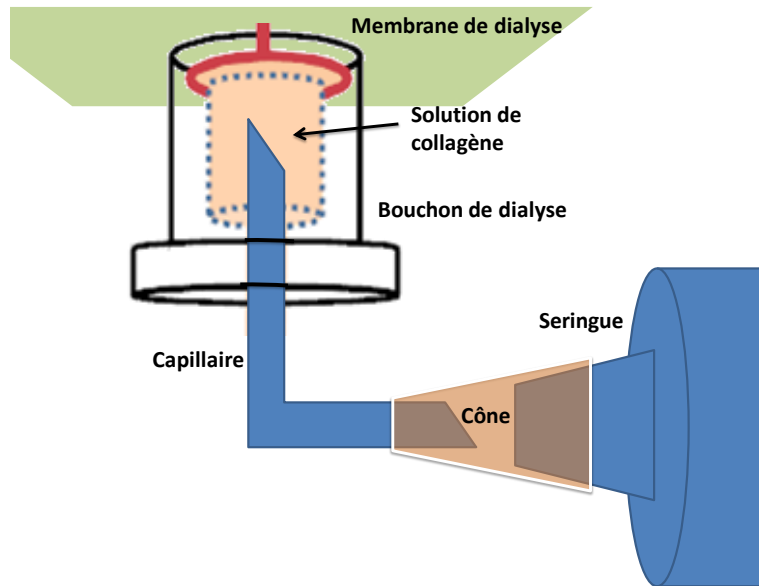


Figure 3 : Schéma du montage de remplissage du bouchon de dialyse

Dans un bécher muni d'un barreau aimanté, 300 mL d'une solution de polyéthylène glycol (PEG, Fluka, 35 kD) dans une solution d'acide acétique à 500 mM y est ajoutée (Fig. 4A). Le bouchon de dialyse est plongé dans la solution en n'immergeant que la partie contenant la membrane de dialyse. Le PEG en large excès en concentration impose à la solution de collagène une pression osmotique. Les petites molécules (eau, ions et acide acétique) diffusent librement à travers la membrane de dialyse pour équilibrer les différences de pression osmotique de chaque côté de la membrane.

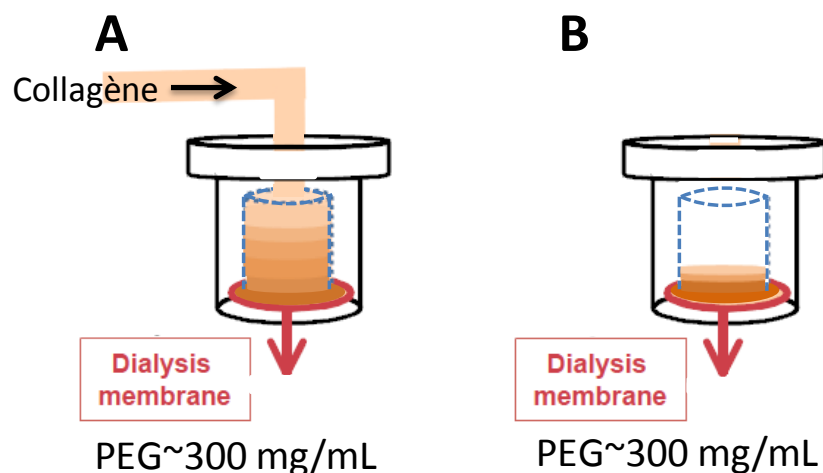


Figure 4 : Schéma du montage du procédé de concentration du collagène par les méthodes de dialyse et injection continue. A) Bouchon de dialyse plongé dans une solution PEG acide sous agitation. La solution de collagène diluée est injectée par le capillaire grâce à un pousse-seringue ; B) Stabilisation de la solution de collagène après injection continue de collagène

La solution de collagène est injectée en continu dans le bouchon de dialyse à l'aide d'un pousse-seringue, dont le débit d'injection est réglé en fonction de la vitesse de dialyse afin d'assurer une pression équivalente de chaque côté de la membrane. La viscosité de la solution de collagène dans le bouchon de dialyse augmente avec la concentration de collagène, la diffusion ralentit ainsi avec la concentration. Donc la vitesse d'injection est très rapide au début de dialyse (~ 3 mL/min), mais diminue au cours du temps et peut atteindre jusqu'à 0,1 µL/min.

Après avoir injecté la solution de collagène dilué (30 mL à 1 mg/mL et 10 mL à 3 mg/mL), l'injection est arrêtée mais le bouchon de dialyse avec son capillaire est laissé dans le bain de PEG une semaine de plus pour diminuer le gradient de concentration dans le bouchon de dialyse et permettre l'obtention d'une concentration homogène au sein de la matrice (Fig. 4B).

Une fois l'équilibre atteint, le bouchon de dialyse (sans capillaire) est mis dans un dessiccateur où un bécher contenant 5 mL d'une solution aqueuse d'ammoniac à 28,0-30,0% est placée. Les échantillons sont laissés sous vapeur d'ammoniac pendant 3 h. L'ammoniac induit une augmentation de pH dans la matrice de collagène, qui peut atteindre 11,4 au point de saturation de la solubilité de l'ammoniac dans l'eau dans ces conditions. Cette méthode permet la réalisation de la fibrillogénèse des solutions. Le procédé a lieu dans un système totalement hermétique, la contamination bactérienne est évitée.

La matrice est alors délicatement retirée du bouchon de dialyse et rincée avec de l'eau doublement distillée stérilisée jusqu'à obtention d'un pH de l'eau de rinçage neutre. La matrice est blanche légèrement translucide. Elle a la forme d'un disque dont le diamètre est environ 1 cm et l'épaisseur 2~3 mm. La matrice est conservée dans l'eau dans un tube corning stérile de 15 mL. Le tube est conservé à 4°C.

2. Synthèses des matrices hybrides collagène/apatite (co-précipitation de collagène avec l'apatite) : Coll/CHA et Coll/SBF

Le procédé de synthèse des matrices hybrides collagène/apatite qui correspond à une co-précipitation du collagène avec l'apatite, est le même que celui réalisé pour la matrice dense de collagène, c'est-à-dire une dialyse inverse couplée à une injection continue. Les seules différences sont les suivantes : (i) des précurseurs ioniques de la phase minérale sont ajoutés dans la solution initiale acide de collagène (à 1 mg/mL) avant l'injection ; (ii) la

solution acide de PEG est à la même concentration que les précurseurs ioniques dans la solution initiale acide de collagène ; (iii) dans l'étape de rinçage, une solution de PBS X1 est utilisée à la place de l'eau afin de ne pas dissoudre la phase minérale précipitée au sein de la matrice hybride. La force ionique de la solution initiale acide est identique à celle du plasma sanguin.

Ici, deux compositions de sels sont utilisées, dont la force ionique est identique à celle du plasma humain pour que les résultats soient comparables. La concentration des sels dans la solution initiale de collagène à 1 mg/mL est indiquée dans le tableau ci-dessous :

Concentration (mM)	CaCl ₂ ·2H ₂ O	NaH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	NaHCO ₃	NaCl	KCl	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Na ₂ SO ₄	Acide acétique	Force Ionique (mM)
Coll/CHA	46.1	13.8	-	13.8	-	-	-	-	500	165.9
Coll/SBF	2.5	-	1	4.2	142	3	1.5	0.5	500	165.7

Tableau 5 : Concentration des ions présents dans les solutions mères acides de collagène

Comme la masse de sels à dissoudre dans la solution acide de collagène à 1 mg/mL est trop petite (~ 10 mg), il est impossible de peser correctement les sels. Afin d'avoir une concentration de sels reproductible dans la solution acide de collagène, nous avons préparé deux solutions mères : une solution de collagène (à 3 mg/mL) et une autre de précurseurs ioniques (Solution de CHA et de SBF) dont la concentration est 1,5 fois plus élevée que la concentration des ions présents dans les solutions mère de collagène (Tab. 5). Donc pour 30 mL de solution finale, nous avons mélangé 10 mL de la solution mère de collagène et 20 mL de la solution de précurseurs ioniques.

2.1 La matrice hybride (Coll/CHA)

Un mélange de collagène (1 mg/mL) et des sels (CaCl₂·2H₂O, NaH₂PO₄ et NaHCO₃) est concentré par la méthode d'injection continue contre une solution de PEG de 300 mg/mL qui contient la même concentration de sels et d'acide que la solution injectée collagène/sels.

2.2 La matrice hybride (Coll/SBF)

La solution de collagène (1 mg/mL) et de sels (SBF) est concentrée aussi par la méthode d'injection continue contre une solution de PEG de 300 mg/mL qui contient également tous les ions présents dans SBF.

Après concentration de la solution initiale acide et réalisation de la fibrillogénèse des matrices hybrides, les matrices sont rincées cinq fois dans une solution PBS X1 pendant 3 minutes. Les matrices hybrides sont ensuite stockées dans du PBS X1 à 4°C.

3. Synthèse de matrices hybrides collagène / apatite en présence d'additifs organiques

Le polyAspartate et l'héparine sont ajoutés séparément dans la solution acide de collagène (à 1 mg/mL) contenant ou non les sels composants le SBF.

3.1 Synthèse d'une matrice de collagène et d'une matrice hybride en présence de polyAspartate (Coll/PolyAsp et Coll/SBF/PolyAsp)

Le polymère acide, le polyAspartate (5,75 µg/mL, $M_w=1200\text{Da}$, BASF) (Fig. 5) est ajouté dans la solution acide diluée de collagène contenant ou non les sels présents dans le SBF avant la concentration.

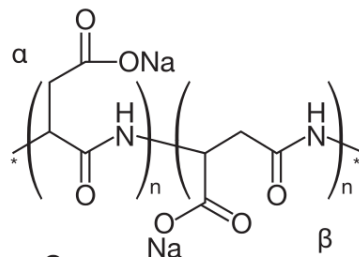


Figure 5 : Formule du polyaspartate composé de 30% de monomères α et 70% de monomères β .

3.2 Synthèse d'une matrice de collagène et d'une matrice hybride en présence d'héparine (Coll/Hép et Coll/SBF/Hép)

Les glycosaminoglycanes (GAGs) ont longtemps été désignés sous le terme de "mucopolysaccharides acides" en raison de leur forte capacité de rétention de l'eau ("muco"), de leur nature glucidique ("polysaccharides") et de leur caractère acide provenant de leurs multiples charges négatives ("acides"). Il s'agit en effet de chaînes linéaires (polymères non ramifiés) sulfatées (sauf l'acide hyaluronique) composées de la répétition d'un diholoside de base contenant toujours une hexosamine (glucosamine (GlcN) ou galactosamine (GalN)) et un autre ose (acide glucuronique (GlcA), acide iduronique (IdoA), galactose (Gal)) (Bradley 2010).

Ici, nous ajoutons la molécule d'héparine (8,3 $\mu\text{g/mL}$, 176,3 USP/mg, Sigma-Aldrich) (Fig. 6) dans la solution acide initiale de collagène avec ou sans précurseurs ioniques avant concentration de la matrice. Après l'ajout d'héparine, la solution qui était initialement transparente se trouble. Des études complémentaires seraient nécessaires pour expliquer ce phénomène.

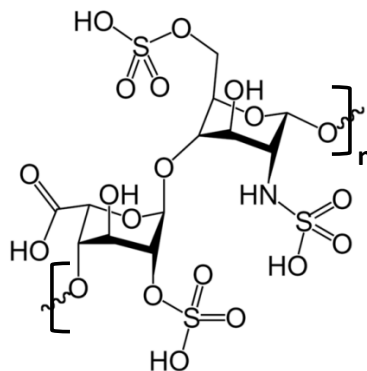


Figure 6 : Molécule d'héparine constituée essentiellement d'unités disaccharidiques trisulfatées: l'acide L-iduronique-2-O-sulfate et D-glucosamine-N-sulfate, 6-O-sulfate.

4. Augmentation de la charge en minéral par imprégnation des matrices dans une solution SBF 1,5

Après fibrillogénèse et co-précipitation du collagène avec l'apatite, les matrices de collagène et les matrices hybrides collagène/apatite sont imprégnées dans la solution SBF 1,5 afin d'augmenter le degré de minéralisation de la matrice. En effet, la solution SBF 1,5 est métastable, les précipités se formant facilement à partir de cette solution.

Les matrices de collagène ou hybrides sont mises dans une solution SBF 1,5 dans des tubes corning de 50 mL à 37°C sous agitation (120 tr/min, INFORS) pendant 5 à 7 jours. Nous avons observé la formation d'un précipité blanc sur la paroi du tube corning au bout de 5~7 jours, indiquant la précipitation de l'apatite. Au bout d'une semaine d'agitation, la matrice est placée dans un nouveau tube corning avec une nouvelle solution de SBF 1,5 afin d'assurer une concentration des ions constante dans le milieu.

Le nombre de bains d'imprégnation dans du SBF 1,5 est fixé en fonction du degré de minéralisation recherché. Le taux de minéralisation est proportionnel aux nombres de bains de SBF 1,5. Les échantillons ainsi traités sont notés **(SBF)** dans le manuscrit : Coll(SBF),

Coll/CHA(SBF), Coll/SBF(SBF, ils ont été immergés dans les solutions de SBF 1,5 (3 * 7 jours).

La vitesse de précipitation à partir de la solution SBF 1,5 varie en fonction de la nature des matrices hybrides (charge de surface, surface spécifique). Il est difficile de faire une étude rigoureuse de la cinétique de précipitation de la solution SBF 1,5. Le taux de minéralisation est déterminé par ATG, même si nous n'avons pas distingué la phase minérale formée à la surface des matrices de celle précipitée dans l'espace inter/intrafibrillaire. D'une façon générale, le degré de minéralisation est 1,5 fois plus élevé après chaque bain de SBF 1,5 d'une durée d'une semaine. Le temps d'imprégnation est limité à une semaine, car nous n'avons pas observé d'augmentation du degré de minéralisation après avoir prolongé l'imprégnation jusqu'à deux semaines. Après deux mois d'imprégnation dans une même solution SBF 1,5, le degré de minéralisation diminue, ceci montre qu'il y a un échange d'ions permanent entre la solution et la phase minérale.

V. Informations structurales et techniques de caractérisation correspondantes

Différentes méthodes de caractérisation ont été utilisées au cours de cette thèse. Comme la nature des échantillons étudiés est très différente (des nanoparticules minérales jusqu'à des gels organiques), la préparation de ceux-ci, pour une même technique de caractérisation est variable en fonction de la nature de l'échantillon concerné.

Techniques	Distances caractéristiques	Informations	
RMN	Distances interatomiques (Quelques Å)	Interface organique/minéral Caractérisation du minérale (cœur/surface)	
DRX	Périodicité au sein d'une fibre de collagène (1 Å ~ 10 nm)	Distance longitudinale (~0,29 nm) et latérale (~1,3nm)	Organisation spatiale entre phases organique/minéral
	Distances interatomiques	Nature de la phase des particules cristallines	
MET	10 nm~ 1µm	Assemblage 3D des fibrilles de collagène	
Cryo-Méthode	10 nm~ 1µm	Interaction minérale/organique et minérale/minéral	
MEB	100 nm~ 1µm	Assemblage 3D de fibres de collagène et textures cristal-liquides	
ATG		Rapport massique minéral/organique	

Tableau 6 : Techniques utilisées, distances caractéristiques explorées et nature des informations structurales recueillies.

1. La microscopie électronique à transmission (MET) et les cryométhodes

1.1 Observation par MET

Les observations ont été effectuées au laboratoire avec un microscope électronique FEI TECMAI G² Spirit Twin, à 120 kV équipé d'une caméra CCD. Le diaphragme objectif est nécessaire pour l'observation des échantillons fragiles.

Les grilles ont été préparées différemment selon la nature des échantillons, cristaux d'apatite ou matrices de collagène :

Les poudres : les échantillons d'apatite sont broyés dans un mortier, puis dispersés dans de l'éthanol 100% ou de l'eau double-distillée par bain ultrasons. Ensuite, une goutte de

la suspension obtenue est déposée et séchée sur une grille de cuivre sur le côté recouvert d'un film de carbone. La MET nous informe localement sur la morphologie des particules. En plus, elle nous fournit des informations complémentaires à la DRX concernant la taille et la distribution en taille des particules. Le rayonnement provient d'électrons dont la longueur d'onde est de l'ordre du picomètre (10^{-12} mètres) ce qui peut permettre d'atteindre une résolution atomique.

Les matrices de collagène non-minéralisées ou hydrides : L'observation par MET nécessite de placer les échantillons sous vide. Il est donc nécessaire de les stabiliser en les fixant. Nous présentons ici la méthode classique par fixation chimique et déshydratation. Nous avons travaillé sur des coupes ultrafines ce qui nous permet d'avoir un aperçu à la fois de la surface et de l'intérieur des échantillons. La préparation de l'échantillon est suivante :

1) Fixation chimique

La fixation chimique a pour but de maintenir la structure des échantillons en réticulant les protéines entre elles par création de ponts covalents entre les groupements aminés libres des protéines. Pour cela, les gels fibrillaires de collagène sont fixés à 4°C pendant une heure dans du glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate (33 mM, pH 7,4), puis lavés par trois bains de 10 min dans un mélange tampon cacodylate (50 mM, pH 7,4)/ saccharose 0,3M. Ce fixateur crée les points de réticulation.

L'étape de fixation par le tétraoxyde d'osmium (OsO_4) qui réagit avec les doubles liaisons C=C n'a pas été réalisée, afin d'éviter des dépôts de précipités à base d'osmium à la surface des échantillons qui laisse des tâches noires sur les grilles, ce qui pourraient perturber l'observation (Fig. 7).

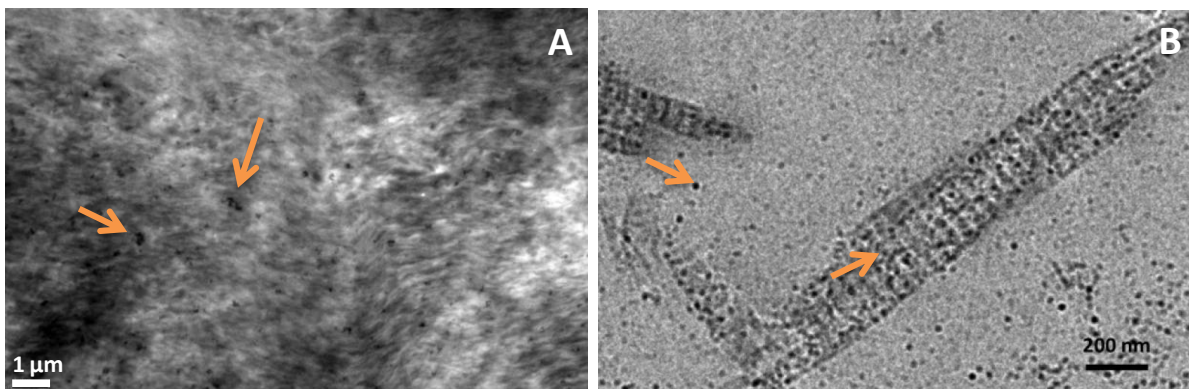


Figure 7 : Clichés de MET des échantillons fixés par OsO_4 : A. Coll; B. matrice de collagène non-minéralisée (~ 2mg/mL) (les artéfacts sont indiqués par les flèches)

Les échantillons sont ensuite progressivement déshydratés dans des bains aqueux d'éthanol de concentration 50%, 70% et 95% pendant 5 min chacun et enfin dans deux bains d'éthanol 100% pendant 10 min. L'éthanol est ensuite remplacé par de l'oxyde de propylène en deux bains de 10 min, le premier dans un mélange 50/50 d'éthanol et d'oxyde de propylène, le second dans de l'oxyde de propylène pur.

2) *Inclusion*

Les échantillons déshydratés sont progressivement imprégnés, puis inclus dans de la résine dont la composition est décrite dans le tableau ci-dessous :

Abréviations	Noms	Volume
EMbed 812	Epon-812 substituted	20 ml
DDSA = durcisseur	Dodecetyl succinic anhydride	9 ml
NMA = accélérateur	Methyl-5-Norbornene-2,3-Dicarboxylic Anhydride	12 ml
DMP-30	2,4,6-Tri(Dimethylaminoethyl)phenol	0,62-0,82 ml

Tableau 7 : Solutions utilisées pendant l'inclusion des échantillons hybrides

L'imprégnation a d'abord lieu dans un bain d'oxyde de propylène/résine (3:1) pendant 1h à 4°C, suivi d'un autre mélange d'oxyde de propylène/résine (1:3) pendant une nuit à 4°C et, enfin, de deux bains d'une heure dans de la résine. Au cours du dernier bain, la résine est dégazée sous vide.

Les échantillons sont ensuite placés dans des moules alvéolaires remplis de résine. Les moules sont alors mis sous vide pendant 1h avant d'être placés à l'étuve à 60°C pendant 3 jours.

3) *Ultramicrotomie*

Les blocs de résine sont d'abord coupés en tranches demi-fines (~ 1 µm), puis observés au microscopie optique afin de vérifier la présence de l'échantillon sur les coupes. Ensuite, les échantillons sont coupés pour obtenir des sections ultrafines de 70~80 nm à l'aide d'un ultramicrotome (Ultracut Reichert Young). Les coupes microtomiques sont déposées sur des grilles de cuivre (couvert de film de carbone de préférence).

4) *Contraste*

Les grilles sont placées au contact de gouttes contenant l'acétate d'uranyle.

Dans nos échantillons, deux composants de différente nature coexistent. Le premier est constitué d'éléments organiques légers (le collagène). Le contraste n'est donc pas suffisant

vis-à-vis des électrons. L'ajout de sels d'atomes lourds (comme U) est nécessaire pour visualiser l'échantillon. L'autre est un minéral de la famille des phosphates de calcium plus dense aux électrons, et donc tout à fait visible par MET. Ainsi, contrairement au cas du collagène, la présence de contrastants peut rendre l'observation difficile car une confusion peut se faire entre les dépôts de contrastants et des nanoparticules d'apatite pendant l'observation. Ainsi, l'ajout de contrastant n'est pas systématique pendant la préparation des échantillons et est fonction des objectifs fixés pour l'observation.

1.2 Les cryo-Méthodes

A. Cryo-microscopie électronique à transmission

Les échantillons ont également été préparés pour la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET). Cela nécessite une congélation rapide d'une suspension aqueuse des échantillons sur la grille de MET afin de former une couche de glace vitreuse par imprégnation dans de l'éthane (-175°C) refroidi par de l'azote liquide (-190 à -195 °C). Cet état vitreux correspond à un état amorphe métastable de l'eau et évite la formation de glace cristallisée opaque. Toutes les observations ont été réalisées à l'Institut Pasteur en collaboration avec M. Gérard Pehau-Arnaudet (Plate-forme de Microscopie Ultrastructurale UMR 3528 Biologie Structurale des Processus Cellulaires et Maladies Infectieuses)

Les poudres : Les particules d'apatite ont été mises en suspension dans de l'eau doublement distillée suivi d'environ 5 min de bain à ultrasons. Une goutte de suspension est déposée sur une grille de MET recouverte d'un film de carbone troué dans une chambre à 20°C et 80% d'humidité. Le surplus d'eau est absorbée à l'aide d'un papier filtre pendant 2 secondes, puis la grille est plongée immédiatement dans l'éthane liquide. Une fois, la grille prête, elle est placée dans un porte échantillon contenant un réservoir d'azote liquide, afin d'éviter un réchauffement de la grille qui conduirait à la sublimation de la glace à partir de -155°C.

Les matrices de collagène pure ou hydride : Les matrices sont d'abord plongées dans l'azote liquide, puis broyées à froid dans un mortier jusqu'à ce qu'il ne reste plus de gros morceaux de matrice. Les poudres de matrices sont conservées dans de l'eau double-distillée (cas de la matrice de collagène) ou dans du PBS 1X (cas des matrices hybrides). Ensuite, la préparation de la grille est la même que celle pour les produits en poudre.

B. Préparations des échantillons par CryoFracture

La préparation des matrices hybrides collagène/apatite par cryofracture a été réalisée à la plate-forme de microscopie électronique de l'Institut Fédératif de Recherche Biologie Intégrative avec l'aide de Mme Ghislaine Frébourg.

Les échantillons sont coupés avant d'être mis dans une coupelle de 100 μm d'épaisseur et 1 mm de diamètre. Puis, les échantillons sont refroidis à -150°C par de l'azote liquide et fracturés transversalement ou perpendiculairement au milieu des échantillons. Des métaux lourds (platine) sont projetés sur la face fracturée avec un angle d'incidence, ce qui permet d'obtenir un effet d'ombrage pour les observations. Les répliques sont rincées à H_2SO_4 , puis à l'eau afin d'éliminer le reste des matrices hybrides et ne conserver que les « répliques ». Les coupes sont déposées sur les grilles de MET pour une observation au MET classique.

2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations des échantillons ont été réalisées avec un microscope électronique à balayage Hitachi S-3400N à une tension d'accélération de 9 kV. La chambre d'observation de MEB est sous vide, d'où la nécessité de traiter les matrices humides.

L'étape de *fixation chimique* des échantillons est identique à celle effectuée pour l'observation au MET. Les matrices sont fixées dans du glutaraldéhyde à 2,5% puis déshydratées par une succession de bain aqueux d'éthanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 100%).

Séchage supercritique CO₂ Les échantillons sont séchés au point critique du CO₂ à l'aide d'un appareil BAL-TEC 030 afin de conserver la structure tridimensionnelle des matrices.

A la fin, les échantillons sont déposés sur des adhésifs de carbone conducteur placé sur des porte-échantillons métalliques, puis métallisés à l'or sur une épaisseur d'environ 10 nm avant être mis dans la chambre d'observation.

3. Analyses thermogravimétriques (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une méthode par laquelle la variation de masse d'un échantillon est enregistrée en fonction du temps et de la température, pendant

l'augmentation de cette dernière. Cette méthode nous permet de déterminer le taux de minéralisation des matrices de collagène minéralisées, et d'évaluer le taux de substitution par les ions carbonates des apatites synthétiques. Les mesures sont réalisées sur un appareil thermo-microbalance NETZSCH STA 409PC. Les échantillons sont placés dans un creuset en alumine, un creuset vide en alumine étant utilisé comme référence. Ensuite, l'échantillon est chauffé sous flux d'air, avec une vitesse de 5°C/min jusqu'à 800°C.

Pour mesurer le taux de minéralisation des matrices hybrides, les échantillons sont calcinés jusqu'à 600°C (Mkukuma 2004) : la perte de masse depuis la température ambiante jusqu'à 200°C correspond à l'eau physisorbée des échantillons ; la phase organique se décompose entre 200°C et 600°C ; à la fin, les matrices ne contiennent plus que la phase minérale. Le taux de minéralisation est calculé à partir de

$$\text{Taux de minéralisation} = \frac{\text{Masse(Phase minérale)}}{\text{Masse(Phase minérale + Matière organique)}}$$

Les apatites carbonatées ne sont pas thermostables, une perte de masse entre 400°C et 1000°C accompagnée d'un dégagement de CO₂ et H₂O correspond à la décomposition des carbonates (Krajewski 2005). Nous pouvons analyser la quantité de la substitution carbonatée à partir de la perte de masse entre 400°C et 1000°C, mais cette valeur est souvent surestimée à cause de la perte des autres molécules pendant le chauffage (tel que les résidus carbonatés).

4. Spectroscopie infrarouge (IR)

La caractérisation des poudres par la spectroscopie IR a été menée avec un appareil Perkin Elmer Spectrum One (USA). Les spectres sont enregistrés entre 650 et 4000 cm⁻¹ avec une résolution de 1 cm⁻¹. Les mesures sont réalisées en réflexion totale atténuée (ATR). Le principe consiste à mettre en contact un cristal de ZnSe avec la poudre à analyser. Le faisceau IR se propage dans le cristal. Si l'indice de réfraction du cristal est supérieur à celui de l'échantillon (n>2.42), le faisceau subit des réflexions totales au delà d'un certain angle d'incidence à l'interface échantillon/cristal, à l'exception d'une onde, dite onde évanescente qui émerge du cristal et est absorbée par l'échantillon. C'est cette onde évanescente qui est responsable du spectre IR observé.

5. Diffraction des Rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) nous a permis de déterminer la nature cristalline ou amorphe de nos composé et d'identifier les phases cristallines, ou de mettre en évidence l'organisation de molécules de collagène entre elles, selon le domaine d'angles exploré.

A partir du diffractogramme, nous pouvons calculer la distance interréticulaire d (la distance entre deux plans cristallographiques) par la loi de Bragg.

$$2 d \sin\theta = n \cdot \lambda$$

avec :

- θ , angle de Bragg = demi-angle de déviation (moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur)
- n (ordre de diffraction) = 1
- λ (longueur d'onde des rayons X) = 1,540593 Å

Cette distance interréticulaire correspond, soit aux distances interatomiques dans un cristal, soit à des distances intermoléculaires du collagène. La distance détectée par DRX selon l'équipement utilisé, peut aller de 0,1 nm à 100 nm.

Dans la pratique, nous avons utilisé deux types de montage pour la mesure de DRX.

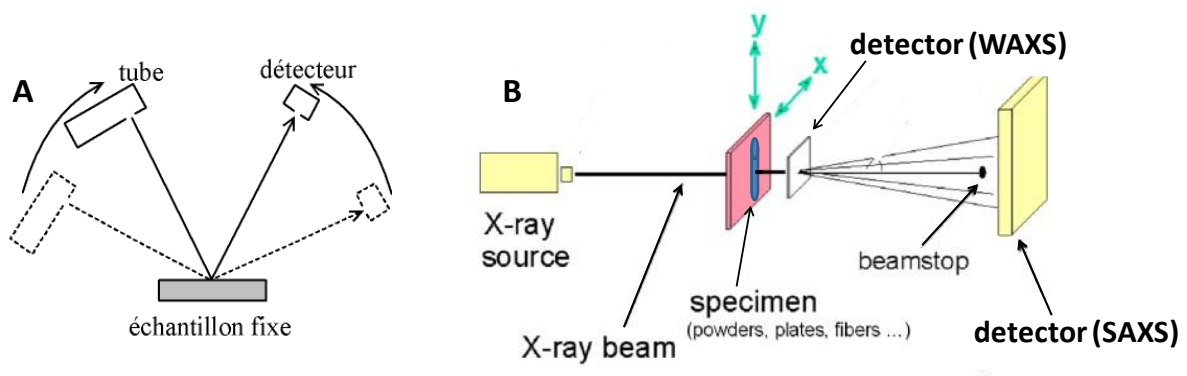


Figure 8 : Schémas de la configuration des diffractomètres de rayons X utilisés : A, DRX en mode réflexion ; B, DRX en mode transmission (WAXS).

Les poudres ont été étudiées par DRX en mode réflexion (Fig. 8A), car il est facile d'obtenir sur nos poudres qui ne sont pas hydratées, un échantillon présentant une face plate. Les poudres sont pour cela compactées dans un porte-échantillon comportant un espace creux sous forme de disque. Les rayons X arrivent sur l'échantillon avec un angle d'incidence θ , et

un détecteur mesure l'intensité des rayons X diffractés selon la direction de diffraction. Les diffractogrammes ont été enregistrés sur un diffractomètre Bruker D8 avec la radiation $\text{CuK}\alpha$, sur l'intervalle $4 - 60^\circ$ (en 2θ) avec un pas de 0.012° et des temps de comptage de 1,6 s. Le porte-échantillon tourne dans le plan xy pendant l'enregistrement afin de détecter/moyenner tous les plans de diffraction. Les phases sont identifiées par comparaison avec les références du fichier ICDD-PDF (International Center for Diffraction Data - Powder Diffraction Files).

Comme il est impossible de préparer une face plane à partir d'une *matrice de collagène* et comme il est indispensable de garder les matrices humides, nous avons utilisé la diffusion des rayons X (S-MAX 3000 RIGAKU) aux grands angles (**WAXS**) qui permet de travailler dans des capillaires en mode transmission (Fig. 8B).

La matrice est coupée en petit blocs et fermée hermétiquement dans un capillaire en silicate de 1 mm de diamètre par une cire spécifique. Ensuite, le capillaire est placé dans une enceinte sous vide dans laquelle passe le faisceau de rayons X. Le vide est nécessaire afin de s'affranchir de tout phénomène de diffusion par l'air. Une plaque plate sensible (image plate) d'une dimension de $15 \times 15 \text{ cm}^2$ avec une résolution de $50 \text{ }\mu\text{m}$, placée à 59 cm derrière l'échantillon enregistre les RX diffractés aux grands angles.

Détermination de la direction préférentielle d'organisation : L'utilisation de plaques pour la détection du signal permet d'enregistrer des diffractogrammes à deux dimensions. Ceci permet de vérifier s'il y a une direction préférentielle d'organisation des plaquettes d'apatite dans les matrices de collagène ou en présence d'eau.

6. Résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide

La RMN est une technique spectroscopique fondée sur la transition entre les niveaux d'énergie associés aux moments de spin des noyaux. Seuls les noyaux possédant un moment magnétique, c'est-à-dire un spin nucléaire non nul, peuvent donner un signal par RMN.

Toutes nos expériences ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance III avec un champ magnétique $B_0 = 7 \text{ T}$ avec une fréquence de résonance de 300 MHz pour le ^1H , 75 MHz pour le ^{13}C et 121 MHz pour le ^{31}P . La plupart des expériences ont été réalisées avec une sonde Bruker triple résonance et dans des rotors de 4 mm de diamètre. Deux types de rotor ont été utilisés : les rotors standards où l'échantillon occupe tout le rotor et les rotors « CRAMPS » où l'échantillon est centré dans le rotor entre deux inserts de téflon.

Voici les différentes séquences utilisées pendant la thèse :

6.1 Séquence HPDEC

La séquence HPDEC (High Power DECoupling) est la technique la plus simple pour acquérir un spectre (Fig. 9). La séquence consiste en l'application d'une simple impulsion sur la voie S et d'un découplage haute puissance pendant l'acquisition, selon la voie I. Le découplage pour les expériences $\{^1\text{H}\}^{31}\text{P}$ est ici de 50 à 100 kHz.

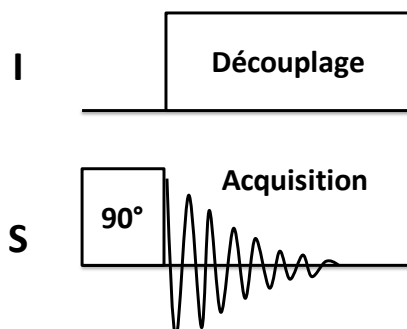


Figure 9 : Séquence d'impulsion HPDEC

6.2 Séquence CP (Polarisation Croisée)

Le principe de cette séquence consiste à transférer une partie de l'aimantation des spins abondants vers les spins rares. La séquence de polarisation croisée est représentée sur la figure 10. Une impulsion de 90° suivant O_y amène l'aimantation des spins I (abondants) suivant O_x . Nous appliquons ensuite un champ radiofréquence B_{1I} parallèlement à l'aimantation créée, c'est-à-dire déphasé de 90° par rapport au champ nécessaire à la première impulsion. Les spins I se trouvent ainsi « verrouillés » (spin-lock) le long de B_{1I} dans le référentiel tournant. Les deux systèmes de spins sont alors mis en contact en appliquant un champ B_{1S} sur les spins S satisfaisant la condition de Hartmann-Hahn (Hartmann 1962), et un transfert d'énergie s'établit entre les spins I (^1H) et S (^{31}P).

Pour que le transfert ait lieu entre les deux systèmes de spins, l'énergie totale doit être conservée. La séparation des niveaux Zeeman ($\omega_0 = \gamma B_0$) est différente pour les spins I et S dans le référentiel du laboratoire. En revanche, cette condition peut être satisfaite dans le référentiel tournant, par l'application simultanée des champs radio fréquence B_{1S} et B_{1I} tels que $\omega_{1S} = \omega_{1I} = \gamma_S B_{1S} = \gamma_I B_{1I}$. C'est la condition de Hartmann-Hahn pour un échantillon statique. Cette condition est modifiée par la rotation à l'angle magique.

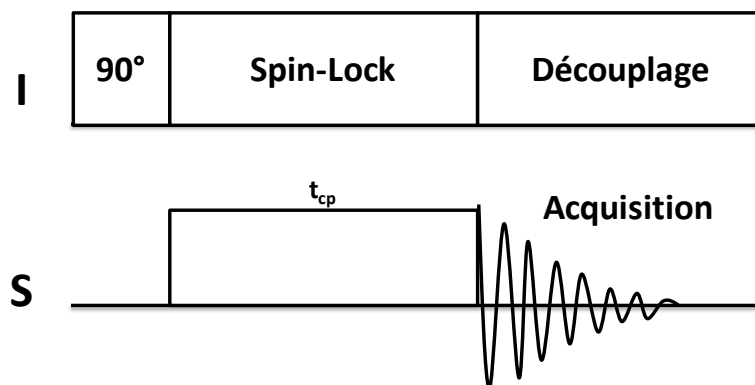


Figure 10 : Séquence de polarisation croisée

6.3 Séquence HETCOR

L'expérience HETCOR (HETeronuclear COrrélation) est une variante à deux dimensions de l'expérience de polarisation croisée (Fig.11). La seule différence est l'introduction d'un délai incrémentable t_1 avant la période de spin-lock dans l'objectif de coder par le déplacement chimique, l'évolution de l'aimantation du noyau abondant (ici, ^1H). Cela permet d'acquérir un nombre de spectres RMN ^{31}P (dimension F2) dont l'intensité de chaque pic est modulée par sa propre interaction avec les espèces ^1H qui lui sont proches. Une deuxième transformée de Fourier dans la dimension F1 reconstitue un spectre ^1H . La carte entière présente un nombre de tâches de corrélation qui sont fonction des interactions entre les espèces ^{31}P et ^1H du système.

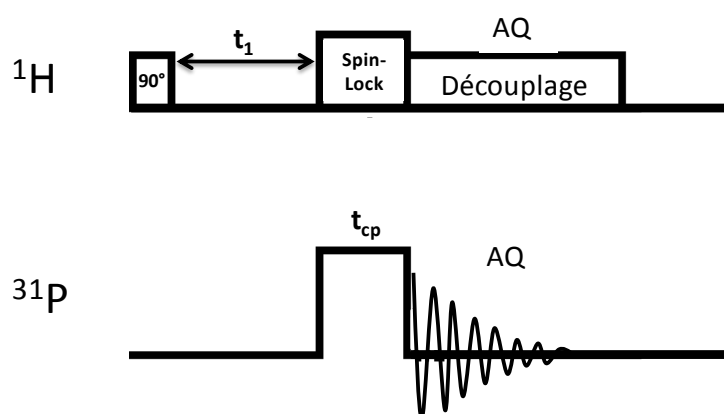


Figure 11 : Séquence d'HETCOR

6.4 Séquence double CP

La séquence de double CP consiste en deux transferts de polarisation consécutifs (Fig. 12) sous conditions de Hartmann-Hahn.

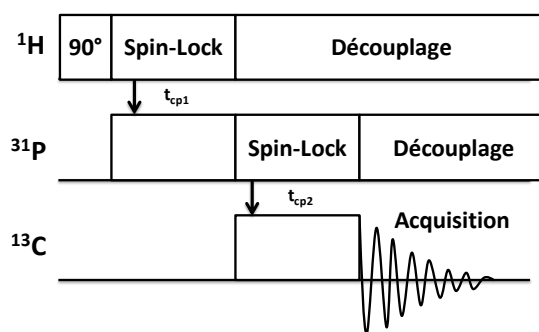


Figure 12 : Séquence d'impulsions de double CP

6.5 Séquence REDOR

La séquence REDOR (Rotational Echo Double Resonance) a été introduite en 1989 par Gullion *et al.* (Gullion 1989). C'est une des méthodes de recouplage hétéronucléaire les plus utilisées. Elle met en œuvre une série d'impulsions π appliquée sur la voie I (ici I = ^{31}P), qui affecte uniquement l'interaction dipolaire hétéronucléaire I-S, la détection du signal se faisant sur la voie S (S = ^{13}C).

Comme la rotation à l'angle magique refocalise le couplage dipolaire à chaque période de rotor, un moyen de le réintroduire est d'utiliser des impulsions synchronisées sur les périodes de rotor. L'impulsion située au milieu de chaque période de rotor sert à éviter l'annulation du déphasage dipolaire sur une période. L'impulsion située à la fin de chaque période sert à accumuler les déphasages introduits durant chaque période (Fig. 13).

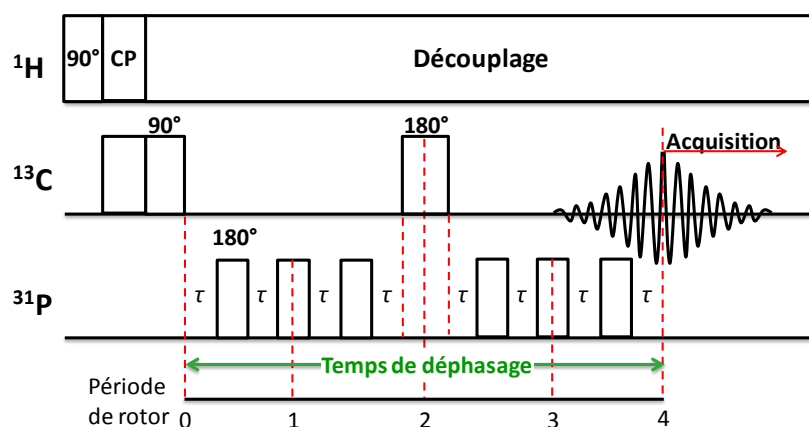


Figure 13 : Séquence de pulse REDOR

Annexe

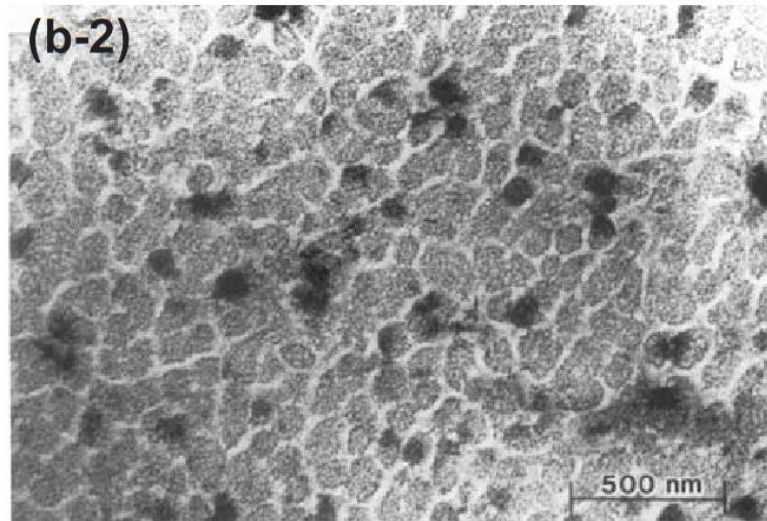


Figure 1 : Cliché de MET d'une arête de poisson partiellement calcifié (D'après Glimcher 1959).