



HAL
open science

Biominéralisation osseuse : de la caractérisation structurale du minéral à son organisation 3D

Stanislas von Euw

► **To cite this version:**

Stanislas von Euw. Biominéralisation osseuse : de la caractérisation structurale du minéral à son organisation 3D. Chimie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066460 . tel-01127563

HAL Id: tel-01127563

<https://theses.hal.science/tel-01127563>

Submitted on 7 Mar 2015

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.

Université Pierre et Marie Curie

Physique et Chimie des Matériaux (ED 397)

Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris / Equipe SMILES

Biominéralisation osseuse : de la caractérisation structurale du minéral à son organisation 3D

Par **Stanislas Von Euw**

Thèse de doctorat de Chimie

Présentée et soutenue publiquement le XX/XX/XXXX

Devant un jury composé de :

Mme Anne Lesage	Ingénieure de Recherche – CRMN, Lyon	Rapporteur
M. Christophe Drouet	Chargé de Recherche – CIRIMAT, Toulouse	Rapporteur
Mme Ina Reiche	Directrice de Recherche – LAMS, Paris	Examineur
M. Sylvain Deville	Chargé de Recherche – LSFC, Cavillon	Examineur
M. Frédéric Marin	Directeur de Recherche – Biogéosciences, Dijon	Examineur
Mme Florence Babonneau	Directrice de Recherche – LCMCP, Paris	Directrice
M. Thierry Azaïs	Maître de Conférences – LCMCP, Paris	Co-Directeur
Mme Nadine Nassif	Chargée de Recherche – LCMCP, Paris	Co-encadrant

Sommaire

Introduction Générale	1
------------------------------------	---

Chapitre I / Le tissu osseux : le collagène, l'apatite, la minéralisation

I-1-1) Généralités, Composition.....	10
I-1-2) Organisation multi-échelle.....	16
I-2 / Le Collagène.....	22
I-2-1) Généralités.....	22
I-2-2) Composition.....	22
I-2-3) Structure.....	24
I-2-4) Formation.....	25
I-2-5) Organisation du collagène de type I.....	26
I-3 / Le minéral : l'apatite biologique.....	32
I-3-1) Généralités.....	32
I-3-2) Structure cristalline.....	32
I-3-3) Substitutions ioniques.....	34
I-3-4) Composition chimique.....	39
I-4 / Biominéralisation osseuse.....	42
I-4-1) Morphologie des cristaux du minéral osseux.....	42
I-4-2) Déposition au sein de la MEC & Organisation 3D du minéral osseux.....	44
I-4-2-a) Nucléation homogène au sein des vésicules matricielles.....	44
I-4-2-b) Localisation & Organisation 3D.....	44
I-4-2-c) Nucléation hétérogène au sein des fibrilles de collagène.....	45
I-4-3) Rôles des protéines non-collagéniques.....	49
I-4-4) Mécanismes de nucléation/croissance du minéral osseux.....	55
I-4-4-a) Nucléation.....	55
I-4-4-b) Croissance.....	57
I-4-5) Surface des cristaux d'apatite carbonatée.....	59
I-4-6) Phénomène de maturation du minéral osseux.....	60
I-5 / L'eau.....	63
I-6 / Problématiques & Plan du manuscrit.....	67
I-6-1) Problématiques.....	67
I-6-2) Plan du manuscrit.....	67
Références bibliographiques.....	70

Chapitre II / Le caractère hydrophile du minéral osseux

Introduction.....	84
II-1 / Etat de l'art : Spectroscopie RMN à l'état solide.....	91
II-1-1) Caractérisation d'apatites de synthèse et biologique par RMN simple impulsion des noyaux ^1H & ^{31}P	92
II-1-1-a) L'hydroxyapatite.....	92
II-1-1-b) Le minéral osseux.....	94
II-1-2) RMN CP MAS 1D du noyau ^{31}P	97
II-1-3) Proposition de l'existence d'un domaine non-apatitique :.....	97
RMN 2D ^1H - ^{31}P	97
II-2 / Etude de l'os frais : caractère hydrophile du minéral osseux.....	101
II-2-1) Os frais.....	102
II-2-1-a) RMN simple impulsion des noyaux ^1H & ^{31}P	102
II-2-1-b) Spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P	103

II-2-1-c) Dynamique de transfert de polarisation croisée ^1H - ^{31}P	106
II-2-1-d) Echange chimique $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	107
II-2-2) Quantification du domaine non apatitique.....	109
II-2-3) Conclusion	112
II-3 / Continuité entre le domaine apatitique et le domaine non-apatitique.....	113
II-3-1) Os sec.....	113
II-3-2) Mélange physique HA + ACP	117
II-3-3) Conclusion	120
II-4 / Propriétés d'hydrophilie de plusieurs phosphates de calcium de référence.....	121
II-4-1) Les apatites biomimétiques	121
II-4-1-a) Caractérisation standard par DRX, MET et ATG.....	122
II-4-1-b) Caractérisation par RMN.....	124
- RMN simple impulsion ^1H & ^{31}P	124
- RMN 2D ^1H - ^{31}P	126
II-4-1-c) Echange d'aimantation ^1H - ^1H par diffusion de spin.....	129
II-4-1-d) Quantification du domaine non apatitique.....	129
- CHA.....	129
- CHA-SBF	131
II-4-1-e) MET-HR	132
- Os déprotéiné.....	133
- Apatites biomimétiques	134
II-4-2) Apatite stœchiométrique.....	136
II-4-3) Brushite et monétite.....	137
II-4-4 / Conclusion & Discussion.....	139
Références bibliographiques	142

Chapitre III / Etude du domaine non-apatitique de surface

Introduction	152
III-1 / Comparaison avec un phosphate de calcium amorphe	154
III-1-1) Comparaison par RMN ^{31}P	154
III-1-2) Comparaison par RMN ^1H	154
III-1-3) Caractère hydrophile de l'ACP	156
III-1-4) Conclusion & Discussion	157
III-2/ Etude de la composition chimique du domaine non-apatitique.....	161
III-2-1) Etude des ions HPO_4^{2-}	161
III-2-2) Etude des ions CO_3^{2-}	170
III-2-2-a) Spectroscopie infrarouge	170
III-2-2-b) RMN 2D ^1H - ^{13}C	172
III-2-3) Etude des ions Ca^{2+}	176
III-3 / Conclusion	179
Références bibliographiques	180

Chapitre IV / Organisation 3D des cristaux d'apatite

Introduction	188
IV-1 / Les techniques utilisées : Cryo-MET & WAXD.....	191
IV-1-1) Cryo-MET	191
IV-1-2) WAXD	191
IV-2 / Rôle de l'eau à l'interface minéral-minéral.....	193

IV-2-1) Comportement de CHA et CHA-SBF en milieu aqueux	193
IV-2-1-a) Observations par cryo-MET	193
IV-2-1-b) Analyses par WAXD	196
IV-2-2) Comportement de HA en milieu aqueux.....	198
IV-2-3) Comportement de CHA-aiguilles en milieu aqueux.....	199
IV-2-4) Obtention de plaquettes d'apatite dépourvues de domaine non-apatitique de surface	202
IV-2-4-a) Les différents protocoles expérimentaux	202
IV-2-4-b) Les différentes caractérisations : DRX, MET et RMN.....	203
IV-2-5) Comportement de CHA-200 en milieu aqueux.....	206
IV-2-5-a) Etude par RMN	206
IV-2-5-b) Observations par cryo-MET	207
IV-2-5-c) Analyses par WAXD	207
IV-2-6) Comportement de CHA sous vide	208
IV-2-7) Organisation 3D des cristaux d'apatite osseuse.....	213
IV-2-7-a) Comparaison avec la structuration de CHA et CHA-SBF dans l'eau	213
IV-2-7-b) Etude d'un échantillon de minéral osseux extrait chimiquement.....	214
- Etude des propriétés d'hydrophilie par RMN	215
- Observations par MET	216
- Observations par cryo-MET	217
- Analyses par WAXD.....	218
IV-3 / Mécanisme de formation des agglomérats orientés de plaquettes.....	220
IV-4 / Conclusion	226
Conclusion Générale	232
Matériels et méthodes	242
I / Protocoles de synthèse	242
I-1) L'apatite stœchiométrique HA	242
I-2) L'apatite biomimétique CHA	242
I-3) L'apatite biomimétique CHA-SBF.....	244
I-4) L'apatite carbonatée CHA-aiguilles	245
I-5) L'apatite carbonaté CHA- ¹³ C	245
I-6) L'apatite carbonaté CHA- ⁴³ Ca	245
I-7) Le phosphate de calcium amorphe	246
I-8) La brushite	246
II / Extraction du minéral osseux	247
III / Retrait du bruit de fond des diffractogrammes WAXD 1D	248
IV / Appareils utilisés.....	249
Références bibliographiques	251

Introduction Générale

La biominéralisation est le processus par lequel un organisme vivant va induire la formation d'un minéral. Plus de 60 types de minéraux sont répertoriés, et ces derniers peuvent aussi bien se déposer de façon intracellulaire (comme par exemple de l'or, ou des oxydes et oxo-hydroxydes de fer), que de façon extracellulaire (comme de la silice, du carbonate de calcium, du phosphate de calcium etc.). Les fonctions de ces minéraux sont d'une grande diversité. Ainsi, les minéraux intracellulaires assurent des fonctions telle la perception de la gravité, l'élimination d'espèces toxiques, ou encore l'orientation selon le champ magnétique terrestre. De leur côté, les minéraux extracellulaires se trouvent généralement sous la forme d'un endo- ou d'un exosquelette, assurant principalement des fonctions mécaniques (*i.e.* protéger et/ou supporter le corps de l'individu).

Ces fonctions mécaniques sont induites par la synergie entre la phase minérale et la phase organique (*i.e.* polypeptides, polysaccharides, et polypeptides-saccharides). L'association intime de l'une avec l'autre conduit à un matériau composite complexe issu de millions d'années d'évolution. Outre le fait que ces matériaux composites biologiques soient une source d'inspiration intense pour les chimistes des matériaux, comprendre leurs processus de formation reste un axe majeur de recherche fondamentale. Ainsi, bien que de nombreux éclairages sur ces processus de formation aient été apportés au cours de ces 4 dernières décennies, de nombreuses questions persistent et notamment celles qui concernent la minéralisation des tissus durs chez les vertébrés.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la minéralisation du tissu osseux. Le tissu osseux résulte de l'organisation tridimensionnelle et hiérarchique de ses deux briques élémentaires : *(i)* des nanocristaux de phosphate de calcium, sous forme d'apatite ; et *(ii)* une protéine fibreuse formée de chaînes polypeptidiques, le collagène. Le tout est complété par un grand nombre de biomolécules, dont environ 200 protéines dites protéines non-collagéniques (PNCs), des cellules osseuses ainsi que de l'eau. Alors que cette organisation hiérarchique fait l'objet d'une description précise, aucun consensus n'émerge pour décrire les processus conduisant à l'organisation 3D du minéral où les cristaux d'apatite sont co-alignés à longue distance selon leur axe cristallographique *c*.

Ainsi, deux raisons majeures font que la compréhension de la minéralisation osseuse reste encore un défi de taille aujourd'hui. Premièrement, les techniques de caractérisation usuelles rendent difficile l'exploration de la matière minérale à l'échelle nanométrique, de même que celle des interactions organo-minérales. Ensuite, le second

obstacle (et sans doute le principal) réside dans le fait que le tissu osseux est un tissu vivant. Celui-ci est ainsi en perpétuelle évolution, avec une phase minérale qui se forme et se résorbe continuellement sous l'action des cellules osseuses, rendant « les propriétés physico-chimiques du minéral hétérogènes dans le temps et l'espace » pour reprendre l'expression de Melvin Glimcher.

L'étude du tissu osseux nécessite donc la mise en œuvre de techniques d'investigation structurale multiples, permettant une exploration à plusieurs échelles. La résonance magnétique nucléaire à l'état solide (RMN) *via* son aptitude à sonder sélectivement un ou plusieurs noyaux au sein de ce matériau composite complexe, est l'une d'entre elles. Son autre avantage majeur pour ce type d'étude, est qu'elle permet une caractérisation directe d'un échantillon d'os intact. La RMN est ainsi apparue comme un outil précieux pour l'étude du tissu osseux au début des années 80, et son utilisation n'a fait que s'amplifier au fil des années. En effet, elle est capable d'apporter des informations particulièrement pertinentes concernant la structure de la composante minérale, mais également la nature des interfaces organo-minérales présentes au sein du tissu osseux.

Cette thèse traite de la caractérisation structurale de la phase minérale à l'aide de l'outil RMN. Alors que le cœur des cristaux d'apatite est relativement bien décrit (avec une structure cristalline proche de l'hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), les connaissances dont nous disposons concernant la surface de ces particules sont encore très minces. L'étude de cette surface est de premier intérêt puisque c'est elle qui est exposée aux autres composants du tissu osseux (collagène, protéines non collagéniques (PNCs), cellules et molécules d'eau), et ses propriétés physico-chimiques conditionnent donc les interfaces mises en jeu avec ces derniers. D'un point de vue de la science des matériaux, il est connu que l'interface entre une phase organique et une phase minérale (plus précisément l'interaction de l'une avec l'autre), joue un rôle important lorsque le matériau subit des contraintes mécaniques. Et d'un point de vue de la biominéralisation, il est clair que les interactions de cette surface avec les biomolécules et les molécules d'eau environnantes influencent la formation et l'organisation 3D du minéral.

Des techniques RMN basées sur l'interaction dipolaire ^1H - ^{31}P , telle que la polarisation croisée, ont été utilisées à nombreuses reprises au cours de cette thèse en raison de leur capacité à sonder des proximités spatiales. Ceci nous a tout d'abord permis de confirmer la présence au sein du tissu osseux d'un domaine non-apatitique de surface, déjà

proposé dans la littérature. Grâce à l'étude d'échantillons d'os frais, celles-ci nous ont ensuite permis d'étudier les propriétés d'hydrophilie de ce domaine non-apatitique en surface du minéral osseux. Pour étayer nos résultats, nous les avons comparés à ceux d'un échantillon d'os sec, ainsi qu'à ceux de plusieurs échantillons de référence (apatite stœchiométrique, apatites biomimétiques, phosphate de calcium amorphe, brushite et monétite) secs ou mouillés artificiellement.

Nous avons, pour la toute première fois à partir d'un échantillon d'os intact, examiné la continuité entre ce domaine non-apatitique de surface et le cœur apatitique du minéral osseux. Les résultats obtenus ont une fois encore été renforcés par comparaison avec le comportement d'échantillons de référence, dont des apatites biomimétiques, et un mélange physique composé d'une apatite stœchiométrique et d'un phosphate de calcium amorphe. Cette démarche a été complétée par des expériences de microscopie électronique en transmission à haute résolution, afin de visualiser directement une telle couche de surface.

Un effort a également été fourni pour étudier la composition chimique de ce domaine non-apatitique de surface. Là encore, une technique basée sur la polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ a été utilisée afin de discriminer les ions PO_4^{3-} des ions HPO_4^{2-} . Des analogues de synthèse du minéral osseux enrichis respectivement en ^{13}C et en ^{43}Ca ont aussi été synthétisés, et des expériences RMN mettant en jeu les couplages dipolaires hétéronucléaires $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}-^{43}\text{Ca}$ ont alors permis d'identifier clairement la présence d'ions carbonate et calcium au sein du domaine non-apatitique.

Toutes les expériences décrites ci-dessus nous ont permis d'obtenir une meilleure description de la surface du minéral osseux, ainsi que de ses interactions avec les molécules d'eau du fluide extracellulaire. Une fois ces informations obtenues, nous avons essayé de comprendre si l'eau pouvait jouer un rôle dans la structuration de la phase minérale. Grâce à des observations réalisées par microscopie électronique en transmission en mode cryogénique, ainsi que des analyses de diffraction des rayons X aux grands angles (mode transmission), nous avons mis en lumière pour la toute première fois que l'interaction de la surface du minéral avec des molécules d'eau jouait un rôle significatif sur l'interface minéral-minéral et l'organisation 3D du minéral *in vivo*.

Le manuscrit de cette thèse s'articule donc de la façon suivante :

- Le **chapitre I** est un chapitre consacré entièrement aux données bibliographiques existant sur le tissu osseux; où y sont décrits en détails : *(i)* ses composants ; *(ii)* son organisation hiérarchique ; ainsi que *(iii)* les principes de sa biominéralisation.
- Le **chapitre II** s'articule autour d'études d'un échantillon d'os frais ainsi que d'une série d'échantillons de référence, dans le but de déterminer l'origine du caractère hydrophile du minéral osseux.
- Le **chapitre III** est consacré à la caractérisation structurale et chimique de la couche minérale en surface du minéral osseux.
- Le **chapitre IV** est consacré à l'étude de l'organisation 3D des cristaux d'apatite en présence d'eau.

Chapitre I /

Le tissu osseux : le collagène, l'apatite, la minéralisation

Chapitre I / Le tissu osseux : le collagène, l'apatite, la minéralisation	10
I-1 / Le Tissu Osseux.....	10
I-1-1) Généralités, Composition	10
I-1-2) Organisation multi-échelle.....	16
I-2 / Le Collagène	22
I-2-1) Généralités	22
I-2-2) Composition.....	22
I-2-3) Structure.....	24
I-2-4) Formation.....	25
I-2-5) Organisation du collagène de type I	26
I-3 / Le minéral : l'apatite biologique.....	32
I-3-1) Généralités	32
I-3-2) Structure cristalline.....	32
I-3-3) Substitutions ioniques.....	34
I-3-4) Composition chimique.....	39
I-4 / Biominéralisation osseuse.....	42
I-4-1) Morphologie des cristaux du minéral osseux	42
I-4-2) Déposition au sein de la MEC & Organisation 3D du minéral osseux	44
I-4-2-a) Nucléation homogène au sein des vésicules matricielles	44
I-4-2-b) Localisation & Organisation 3D.....	44
I-4-2-c) Nucléation hétérogène au sein des fibrilles de collagène	45
I-4-3) Rôles des protéines non-collagéniques.....	49
I-4-4) Mécanismes de nucléation/croissance du minéral osseux	55
I-4-4-a) Nucléation.....	55
I-4-4-b) Croissance.....	57
I-4-5) Surface des cristaux d'apatite carbonatée.....	59
I-4-6) Phénomène de maturation du minéral osseux	60
I-5 / L'eau	63
I-6 / Problématiques & Plan du manuscrit.....	67
I-6-1) Problématiques	67
I-6-2) Plan du manuscrit	67
Références bibliographiques.....	70

Chapitre I / Le tissu osseux : le collagène, l'apatite, la minéralisation

I-1 / Le Tissu Osseux

I-1-1) Généralités, Composition

Le tissu osseux est un tissu conjonctif qui, avec le cartilage, constitue l'endosquelette des vertébrés [1], [2]. D'un point de vue mécanique, il supporte le poids du corps permettant ainsi son déplacement en conjonction avec les muscles et les articulations, et fournit également une protection aux organes internes. D'un point de vue métabolique, il sert comme réservoir ionique prenant ainsi part à l'homéostasie du fluide extracellulaire. Il est également connu pour son rôle hématopoïétique [3] (*i.e.* la sécrétion et le renouvellement des cellules sanguines) puisqu'il renferme la moelle osseuse. Enfin, d'un point de vue de la science des matériaux, le tissu osseux est un matériau hybride minéral-organique (ce qui le classe ainsi dans la catégorie des tissus durs) qui possède une organisation très sophistiquée. La constance requise pour assurer les propriétés mécaniques du tissu osseux paraît en contradiction avec son besoin de versatilité afin d'assurer ses fonctions métaboliques ; ce qui traduit la grande complexité de ce tissu.

		% massique
<i>i</i>	minéral (apatite)	64
<i>ii</i>	collagène de type I	22
<i>iii</i>	eau	9
<i>iv</i>	protéines non-collagéniques	3
<i>v</i>	cellules	2

Tableau 1. Les constituants élémentaires du tissu osseux classés selon leurs proportions massiques moyennes au sein de la partie médiane d'un os long humain pour un individu d'âge adulte. Proportions tirées de LeGeros [4].

Les constituants élémentaires du tissu osseux, regroupés dans le **Tableau 1**, sont les suivants :

(i) Le composé majoritaire en masse est un minéral de phosphate de calcium carbonaté (~64 % en masse), lequel cristallise sous la forme de nanocristaux adoptant une structure d'apatite. Il s'agit de la phase cristalline la plus stable thermodynamiquement dans des

conditions physiologiques parmi tous les phosphates de calcium [5], [6].

(ii) Le second constituant est une protéine polypeptidique, le collagène de type I (~22 % de la masse totale et ~90 % de la masse protéique) qui adopte un arrangement fibrillaire.

(iii) Le troisième constituant est l'eau (~9 % en masse). Cette eau se trouve aussi bien sous forme d'eau dite libre au sein du fluide extracellulaire, que sous forme d'eau physisorbée à la surface du minéral ou bien en interaction avec des molécules organiques, mais également en tant qu'eau de structure incorporée dans le réseau cristallin de l'apatite.

Ces trois constituants majoritaires que sont le minéral, le collagène de type I et l'eau seront présentés de manière plus approfondie dans la suite de ce manuscrit.

(iv) Vient ensuite une multitude de macromolécules appelées protéines non-collagéniques (PNCs) (~3 % en masse). On distingue plusieurs sortes de PNCs, dont environ 25 % d'entre elles sont de nature exogène puisqu'elles proviennent principalement du plasma sanguin, et sont ainsi appelées protéines plasmatiques comme l'albumine, la transferrine ou encore l'hémoglobine- β par exemple [7]. Le reste est au contraire produit par des cellules ostéoformatrices (*i.e.* les ostéoblastes). Ainsi ces PNCs endogènes sont localisées au sein même de la matrice extracellulaire où elles sont en interaction intime avec tous les acteurs de la minéralisation osseuse. Il n'est pas étonnant dès lors qu'on les suspecte de jouer des rôles multiples et distincts à chaque étape, de la nucléation à la croissance du minéral, à la façon avec laquelle le minéral se dépose puis s'organise au sein de la matrice de collagène, ou bien même d'avoir également un rôle d'inhibition envers la précipitation du minéral [8]–[10]. De plus, ces PNCs endogènes sont tellement nombreuses, de l'ordre de 200 au sein d'un os bovin par exemple [11], qu'il est difficile d'en dresser une liste exhaustive. On peut néanmoins les classer selon trois catégories principales [7], [9] :

- Les protéines GLA, appelées de cette façon car elles possèdent un domaine riche en résidus glutamate gamma-carboxylé (ou résidus GLA). Elles sont au nombre de trois : l'ostéocalcine, la MGP (pour Matrix GLA Protein), et la GRP (pour GLA-Rich Protein).
- Les glycoprotéines, sont des hétéroprotéines constituées d'une partie polypeptidique sur laquelle sont greffés des chaînons formés de plusieurs oses ou dérivés d'oses. Cette catégorie de PNC comprend l'ostéonectine, l'ostéopontine, la BSP (pour Bone SialoProtein) ou la DMP-1 (pour Dentin Matrix Protein-1) par exemple. Les trois dernières sont appelées SIBLINGs (pour Small Integrin-Binding LIgand, N-linked Glycoproteins).

- Les protéoglycanes, sont constituées d'une chaîne polypeptidique sur laquelle sont greffées des chaînes linéaires glycosaminoglycanes (ou GAGs). Cette catégorie de PNC comprend la décorine par exemple.

Les protéines GLA sont connues pour leur forte affinité à l'égard du calcium des cristaux d'apatite *via* leurs résidus glutamate gamma-carboxylé [12]. De manière plus inattendue, il a été décelé récemment qu'une protéine GLA comme l'ostéocalcine, exclusivement sécrétée par les ostéoblastes au sein de l'os, a également une fonction endocrinienne régulant des fonctions physiologiques qui n'ont rien à voir avec le tissu osseux ; comme stimuler la sécrétion d'insuline [13] ou encore favoriser la production de testostérone [14]. De leur côté, les SIBLINGs, appelées également protéines acides car riches en résidus acides aspartique et acides glutamique, jouent notamment un rôle dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (MEC, voir ci-dessous), ainsi que comme support de nucléation pour le minéral [8]. Un protéoglycane comme la décorine est connu pour sa capacité à se lier au collagène, régulant ainsi potentiellement l'agencement tridimensionnel des fibrilles. Parmi ces PNCs produites de façon endogène, on trouve également un grand nombre de ce que l'on appelle des facteurs de croissance. Parmi eux, par exemple, les BMPs (pour Bone Morphogenetic Proteins) ou les TGF-beta (pour Transforming Growth Factors), lesquels ont des actions spécifiques sur l'ostéogénèse. L'ostéogénèse correspond à la l'élaboration du tissu osseux, depuis l'activation des cellules progénitrices jusqu'à l'étape finale de minéralisation. Enfin, on trouve également plusieurs enzymes, comme la phosphatase alcaline et la lysyl oxydase par exemple, lesquelles ont des rôles importants dans la fabrication des composants de la matrice extracellulaire.

(v) Puis finalement des cellules (~2 % en masse), dont certaines sont des cellules osseuses en charge de la formation (les ostéoblastes) et de la résorption (les ostéoclastes) du tissu alors que d'autres assurent la vascularisation et l'innervation de l'édifice (cellules endothéliales...), toutes alimentées par un réseau complexe de canalicules (*i.e.* canaux de Havers et de Volkmann).

L'apatite (*i*), dont la caractérisation structurale et chimique sera l'objet principal de cette thèse, constitue à lui tout seul ce que l'on appelle la matrice inorganique ; alors que le collagène (*ii*) et les PNCs (*iv*) constituent eux la matrice organique. Les constituants (*i*), (*ii*), (*iii*) et (*iv*) composent ensemble la matrice extracellulaire (MEC). Au sein de cette MEC, on peut noter également la présence de petits composés ioniques tel le citrate, bien connu pour

son fort pouvoir chélatant envers les ions calcium. Les proportions massiques regroupées dans le **Tableau 1** sont des valeurs moyennes au sein de la partie médiane d'un os long (os cortical) de mammifère tel que l'homme chez un individu adulte. Ces valeurs sont indiquées à titre informatif et ne sont assurément pas des valeurs absolues. En effet, la composition du tissu osseux peut être très disparate et varier en fonction de l'espèce, de l'âge et du régime alimentaire de cette dernière, de la localisation du tissu ainsi que d'une éventuelle pathologie. Ces disparités, quand elles sont naturelles et non pathologiques, rendent compte de la forte adaptabilité du tissu osseux à sa fonction biologique ou mécanique. A titre d'exemple, un animal comme la gazelle a besoin d'être agile afin de fuir face aux prédateurs. Cela nécessite d'avoir des os plutôt légers et souples lesquels sont ainsi peu minéralisés, de l'ordre de 50 % en masse [15]. De ce fait, ce type d'os gagne en flexibilité [15], mais également en légèreté (la densité du collagène est approximativement deux fois moindre que celle de l'apatite *i.e.* $\sim 1.3 \text{ g/cm}^3$). Au contraire, les os qui composent le museau d'une baleine ont une proportion en minéral impressionnante proche de 96 % en masse [16], taux record au sein des vertébrés. Ceci les rend donc beaucoup plus lourds afin de, on peut l'envisager, favoriser leur immersion. Cependant, de manière générale, les tissus osseux des mammifères et des oiseaux présentent de fortes similitudes. En revanche, chez les téléostéens (classe regroupant les poissons possédant un squelette), les cas de figure sont bien plus complexes. En effet, par exemple, il se trouve que la plupart de ces derniers possèdent des arrêtes qui ne contiennent pas ou plus de cellules osseuses [16]. Tel est le cas pour le rostre (le prolongement rigide de la tête) chez l'espadon par exemple [16]. On se retrouve dans un cas particulier où le tissu osseux est quasiment inerte et la façon avec laquelle le tissu fait fi de cette absence de cellules est encore très obscure. Ce n'est pas tout, certaines espèces de reptiles, dont les lepidosauria par exemple, possèdent des os peu, voire pas du tout vascularisés [17].

Trêve de cas particuliers, place maintenant aux tissus osseux des mammifères, lesquels sont dits vivants car vascularisés et riches en cellules osseuses. Cela se traduit dans un premier temps par une perpétuelle évolution du tissu afin de s'accommoder à la croissance de l'individu. Ensuite, une fois que l'individu a atteint sa taille adulte, le tissu osseux subit un renouvellement constant afin de : colmater de potentielles lésions (propriétés d'autoréparation de micro-fractures) ; d'assurer la libération de certains ions (Ca^{2+} , HPO_4^{2-} ...) en fonction des besoins du métabolisme ; ou bien même de contrer le phénomène de maturation des cristaux d'apatite (lequel sera discuté ultérieurement). Ce phénomène est appelé remodelage osseux, et il s'effectue par le biais de réactions de résorption, puis de formation (ostéogénèse)

incessantes sous l'action des cellules osseuses spécifiques : les ostéoclastes (cellules résorptrices) et les ostéoblastes (cellules formatrices). Pour un lieu donné au sein du tissu, il se produit tout d'abord la phase de résorption, puis ensuite, celle de formation, le tout suivi par une phase de quiescence, et ainsi de suite. Il est estimé que pour un être humain de jeune âge (c'est à dire moins de 30 ans), la totalité de son squelette est résorbé et reformé tous les 5 à 6 ans [2]. Ce mécanisme est ininterrompu, et il ne s'effectue pas à la même vitesse au sein des différents tissus osseux d'un individu (ni même d'ailleurs au sein d'un unique tissu donné). Il conduit ainsi à une disparité en terme de composition, et ceci notamment car l'os néoformé se minéralise progressivement. De plus, au sein du squelette humain par exemple, on dénombre 206 os constants avec des formes et des tailles variables (*cf. Figure 1*). Ces pièces osseuses se classent selon trois catégories en fonction de leurs morphologies : les os longs (fémur, tibia...), les os courts (os du carpe) et les os plats (sternum, os du crâne...). On trouve également une douzaine d'os dits sésamoïdes (paletta, fabella...). Ces derniers sont des cas particuliers puisqu'ils proviennent de la minéralisation initiale d'un tendon. Certains de ces os sésamoïdes ne sont pas répertoriés parmi les 206 pièces osseuses du squelette, car ils ne sont pas constants d'un individu à l'autre et sont appelés os surnuméraires (telle la fabella par exemple).

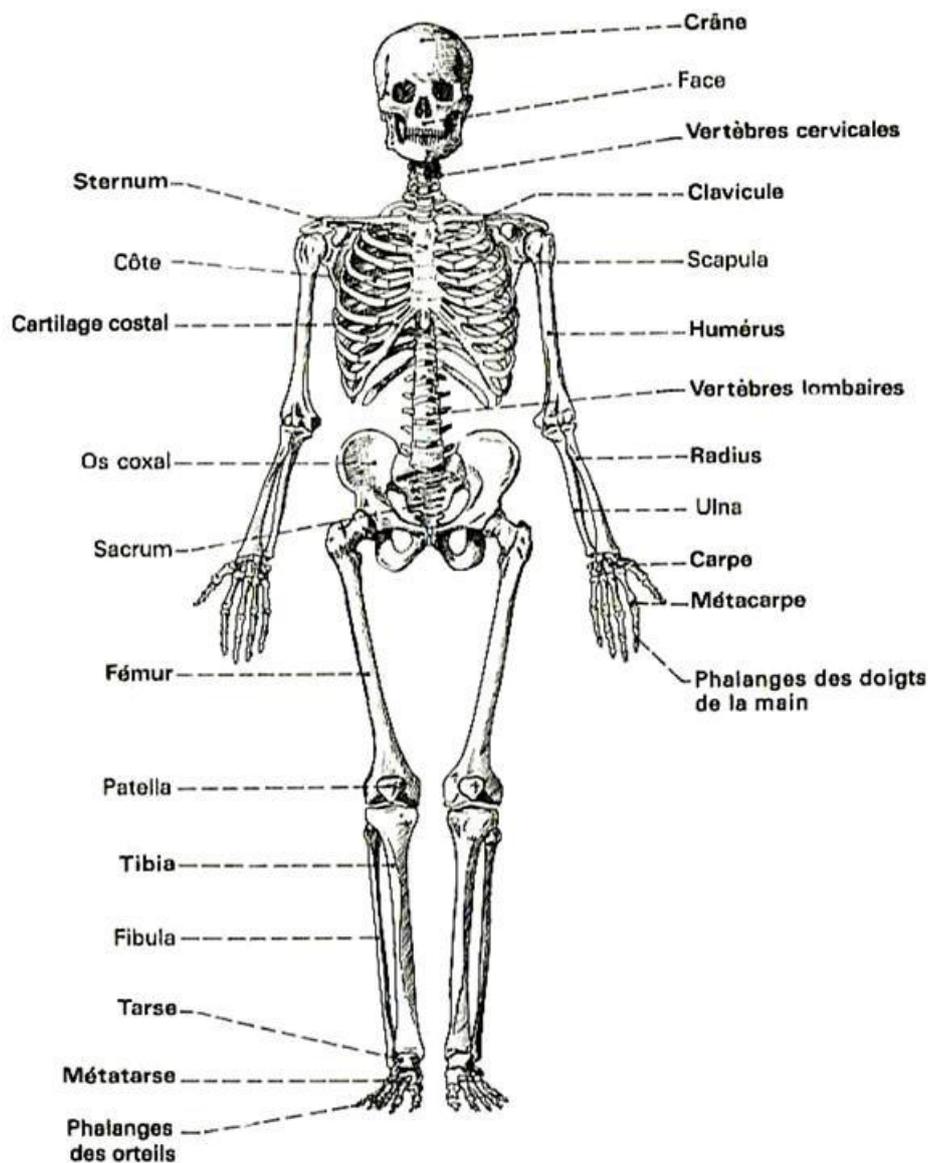


Figure 1. Anatomie du squelette humain, constitué de 206 os constants.

A la vue des différentes caractéristiques détaillées ci-dessus, il est difficile de définir le tissu osseux à l'aide d'une composition chimique ou bien même d'une morphologie unique. Cependant, il y a une caractéristique commune au sein des différents tissus osseux, c'est la façon avec laquelle ils sont organisés à différentes échelles.

I-1-2) Organisation multi-échelle

Cette organisation multi-échelle, dite organisation hiérarchique, a été décrite selon sept niveaux distincts et s'opère sur une large échelle métrique [1] : de l'échelle nanométrique où les constituants élémentaires sont dans leurs états individuels ; à l'échelle macroscopique (ou anatomique) du tissu osseux où la pièce osseuse possède une morphologie spécifique dédiée à sa fonction mécanique (*cf.* **Figure 1**). Ces sept niveaux d'organisation peuvent être détaillés comme ceci, d'après Weiner et Wagner [1] (*cf.* **Figure 2**) :

Niveau 1. Au premier niveau, on trouve les deux constituants majoritaires du tissu osseux pris chacun dans leur état individuel : les cristaux d'apatite (sous la forme de plaquettes de taille nanométrique, *cf.* le cliché de cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET) d'un os humain déprotéiné) ; ainsi que les fibrilles de collagène non minéralisées (*cf.* le cliché de cryo-MET provenant d'un tendon de dinde).

Niveau 2. Au second niveau, on trouve les fibrilles de collagène minéralisées, c'est à dire au sein desquelles sont insérés les cristaux d'apatite. **Ces cristaux y sont tous coalignés entres-eux selon l'axe cristallographique c du réseau apatitique (lequel correspond à la direction de croissance privilégiée des plaquettes), phénomène qui sera étudié en détail lors du chapitre IV de ce manuscrit.** De plus, il se trouve que l'axe longitudinal des fibrilles est également coaligné avec cet axe cristallographique c des cristaux d'apatite (*cf.* le cliché MET d'une fibrille minéralisée de tendon de dinde au sein de la **Figure 2**).

Niveau 3. L'assemblage local et uniaxial de plusieurs de ces fibrilles minéralisées conduit à la formation de fibres de plus grande taille (*cf.* le second cliché MET d'un tendon de dinde au sein de la **Figure 2**). Des études effectuées en diffraction électronique ainsi qu'en tomographie MET ont montré que la totalité des cristaux d'apatite étaient également coalignés selon leur axe c au sein de plusieurs fibrilles adjacentes, et ceci dans les trois directions de l'espace [1], [18]. Ceci met en exergue l'organisation remarquable de ces édifices.

Niveau 4. L'assemblage plus global des fibrilles à l'échelle supérieure conduit à différents édifices selon quatre organisations principales, lesquelles sont, selon la **Figure 2** :

- (i) Un édifice de fibrilles parallèles, lequel est le résultat à l'échelle micrométrique (voire millimétrique) de la structure du **niveau 3** conduisant à un agencement dense où les fibrilles sont co-orientées à longue distance. Cet édifice est

retrouvé lors des prémices de la formation osseuse chez les bovidés [1] ou alors au sein des tendons minéralisés chez la dinde par exemple [19].

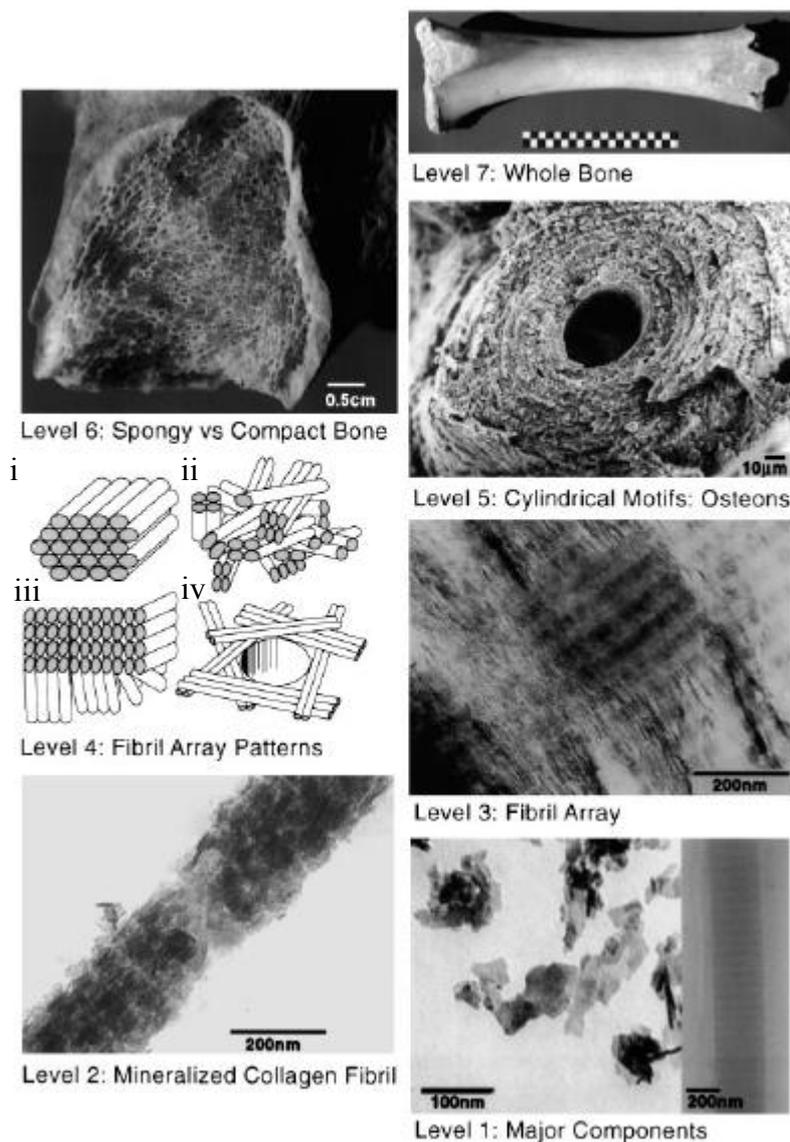


Figure 2. Description des sept niveaux hiérarchiques d'organisation présents au sein du tissu osseux. Image reproduite d'après Weiner et Wagner [1].

- (ii) Un édifice de fibrilles dites tissées, lequel résulte d'un empilement de fibrilles orientées aléatoirement. Cet édifice, peu dense, est très couramment rencontré au sein des os de mammifères et d'oiseaux.
- (iii) Un édifice de fibrilles torsadées en organisation cholestérique [20] (plus communément appelée organisation en contreplaqué). Cette organisation

cholestérique peut être décrite comme un empilement de plans parallèles, au sein desquels toutes les fibrilles ont une orientation uniaxiale, et où le plan suivant présente une déviation d'orientation. Cette déviation d'orientation s'effectue à un angle constant (*cf.* **Figure 3**). Cet édifice compact est également très couramment rencontré au sein des os de mammifères et d'oiseaux.

- (iv) Un édifice de fibrilles à orientations radiales, où toutes les fibrilles sont contenues dans un même plan lesquelles possèdent des orientations complètement aléatoires les uns par rapport aux autres. Ces édifices prennent place autour de cavités au sein de la dentine humaine.

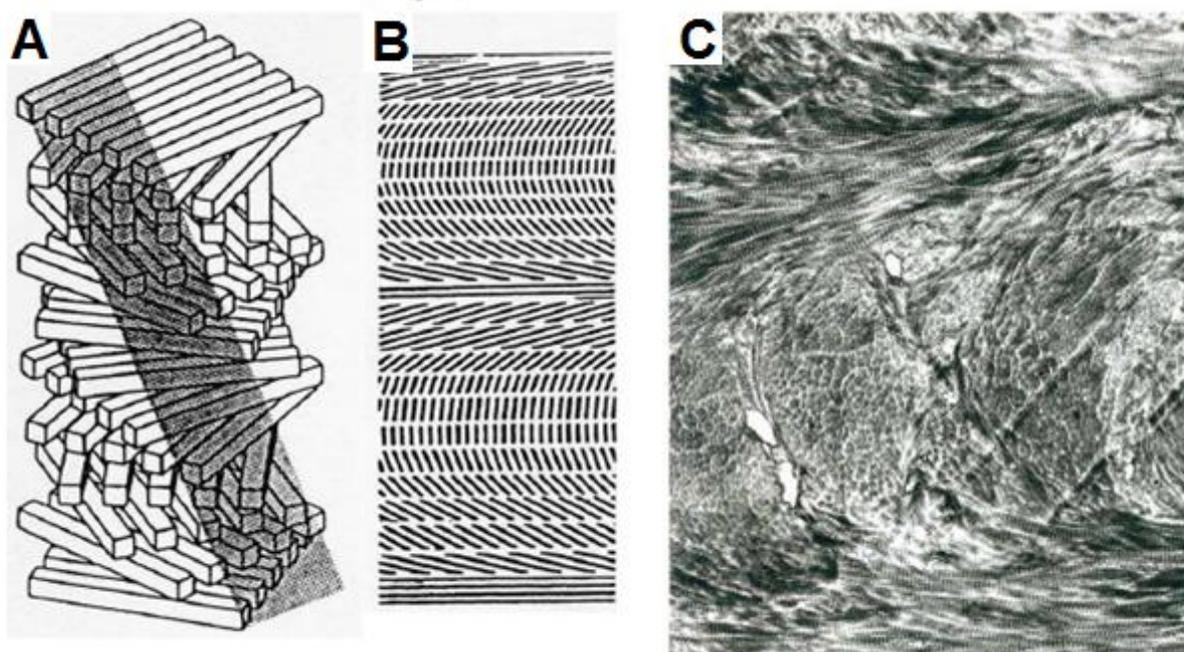


Figure 3. (A) Schéma de l'organisation cholestérique des fibrilles de collagène de type I rencontrée au sein de l'os compact ; voir organisation du **niveau 4 iii** de la **Figure 2**. (B) Plan de coupe oblique selon la partie grisée du schéma (A), laissant apparaître des séries d'arceaux superposés. Ces derniers sont formés par l'empilement successif de plusieurs plans de fibrilles qui possèdent une déviation d'orientation les uns par rapport aux autres. (C) Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) d'une structure en arceaux sur une coupe oblique d'un échantillon d'os déminéralisé. Image reproduite d'après Giraud-Guille [21].

Niveau 5. Cet édifice adoptant une organisation cholestérique se trouve dans l'os compact dans lequel les fibrilles minéralisées s'agencent en lamelles concentriques pour former les ostéons (ou système de Havers). Un ostéon provenant d'un os humain observé en microscopie électronique à balayage (MEB) apparaît au sein de la **Figure 2**. Ces ostéons ont

un arrangement de type « oignon », avec un diamètre compris entre 100 à 500 μm selon une coupe transversale (cf. **Figure 4**), alors qu'ils sont cylindriques selon une coupe longitudinale. Dans le cas des os longs, ils sont orientés selon l'axe longitudinal de l'organe osseux. Leur formation initiale résulte du remodelage osseux primaire au sein du tissu osseux primitif (l'ostéoïde), où l'action des ostéoclastes va conduire à l'excavation de larges tunnels. Cet ostéoïde est sécrété par les ostéoblastes et consiste en une matrice extracellulaire non minéralisée mais riche en protéines non-collagéniques [22]. Il se produit ensuite une étape d'angiogenèse (processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins) au sein de ces tunnels, vaisseaux qui vont approvisionner le tissu résorbé en ostéoblastes pour la suite du remodelage.

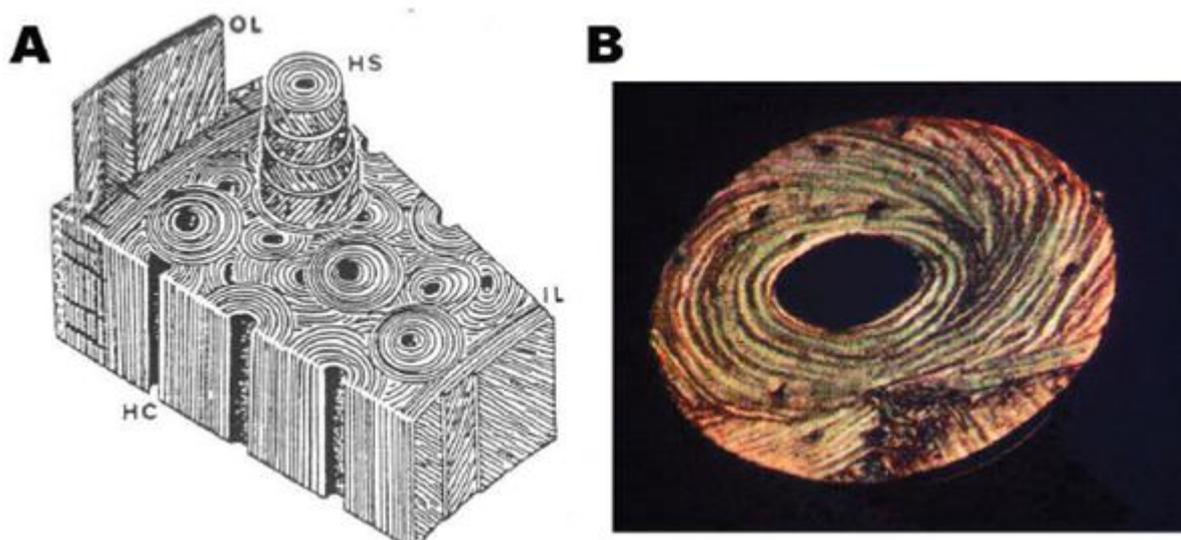


Figure 4. Organisation des fibrilles de collagène de type I au sein de l'os compact pour former le système de Havers. **(A)** Schéma de lamelles osseuses minces et arciformes qui composent l'os compact (avec, OL = lamelles circonférentielles externes ; IL = lamelles circonférentielles internes ; HS = système de Havers ou ostéon formé de lamelles concentriques ; HC = canal de Havers). **(B)** Observation d'un ostéon en lumière polarisée laissant apparaître une alternance de bandes sombres et d'autres plus claires, reflétant ainsi la variation des orientations des fibrilles au sein des lamelles. Images reproduites d'après Giraud-Guille [21] (A) et Vigier [23] (B)

L'étape suivante consiste à la formation du nouveau tissu sous l'action de ces ostéoblastes. Ces dernières conduisent à la genèse des lamelles concentriques (rencontrées au **niveau 4**) qui vont petit à petit combler le creux des tunnels (cf. **Figure 4**). Ce comblement continue jusqu'à coloniser la totalité des tunnels (avec environ une dizaine de lamelles par ostéon), à l'exception d'un canalicule central où subsiste le vaisseau sanguin originel. C'est ce

canalicule vertical vascularisé qui constitue en partie les canaux de Havers. Ces canaux de Havers communiquent entre eux par le biais d'autres canaux transverses appelés canaux de Volkmann, lesquels ont été formés antérieurement. Ce réseau de canalicules vascularisés (appelés également canaux nourriciers) est très développé, et il est relié à la moelle osseuse (cf. **Figure 5**).

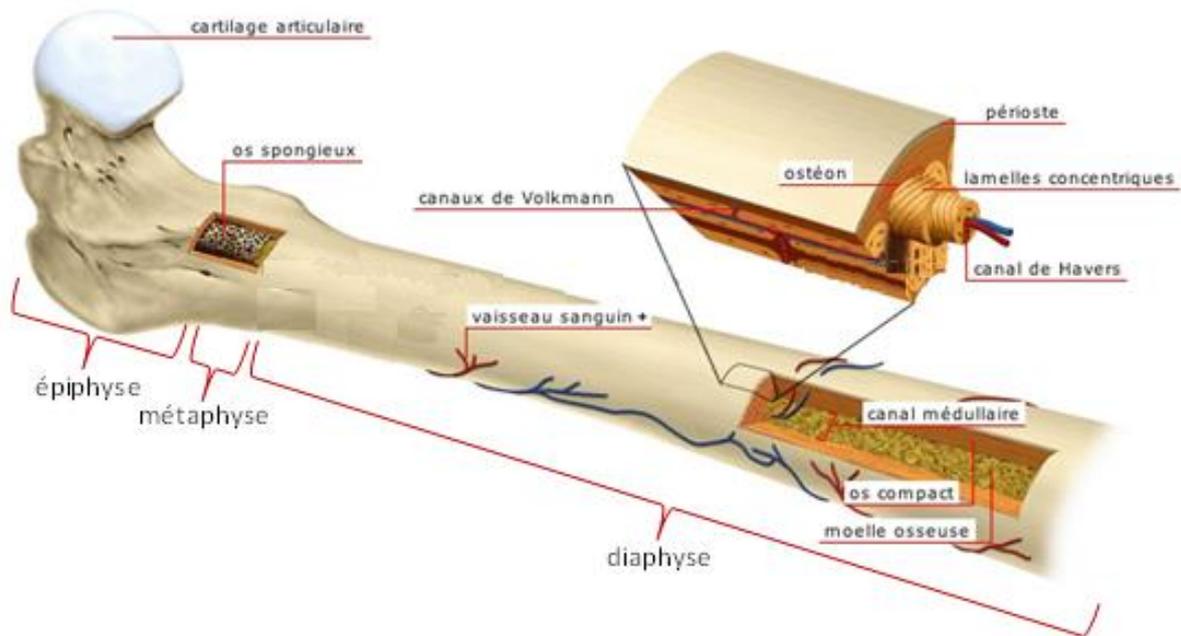


Figure 5. Schéma d'un fémur humain montrant l'agencement de ces constituants : os cortical et os spongieux, puis à l'échelle inférieure, ostéons, canal médullaire, périoste et canaux de Havers et de Volkmann.

C'est par ce biais là que la moelle osseuse va ainsi acheminer de nouvelles ostéoclastes au sein de la matrice de collagène minéralisée, afin d'assurer la continuité du remodelage du tissu (remodelage secondaire). A noter cependant que ces phénomènes de remodelages ne sont pas propres aux ostéons, mais concernent tous les niveaux hiérarchiques d'organisation.

Niveau 6. A l'échelle supérieure, l'organe osseux associe deux principaux types d'architectures distincts : *(i)* Un qui est très dense en éléments constitutifs, appelé os cortical (ou os lamellaire, ou os compact, voire os haversien, cf. **Figure 4**), composé de fibres de 2 à 3 μm de diamètre agencées en lamelles organisées (de manière cholestérique, cf. **Figure 3**). *(ii)* Et un autre qui est au contraire très peu dense et poreux, appelé os spongieux (ou os trabéculaire), composé de fibres de 0,1 à 3 μm (cf. **niveau 4 ii**). Ce sont ces deux types

d'architectures qui sont observés en microscopie optique sur la **Figure 2 (niveau 6)** dans le cas d'un fémur humain fracturé. Ainsi, dans le cas d'un os long tel le fémur (*cf.* **Figure 5**), l'os spongieux se trouve principalement aux extrémités (c'est-à-dire dans la zone appelée l'épiphyse), alors que l'os cortical compose l'organe dans sa partie médiane (zone appelée diaphyse). La partie intermédiaire entre l'épiphyse et la diaphyse est appelée métaphyse, laquelle est également constituée d'os spongieux. La diaphyse, formant le corps cylindrique de l'organe est creuse, et ce sont ses parois denses qui sont donc constituées d'os cortical. L'espace vacant au centre de la diaphyse, appelé cavité ou canal médullaire, possède des parois tapissées d'os spongieux. Encore plus au centre de ce canal médullaire se trouve l'endoste, qui lui-même renferme la moelle osseuse (lieu où se produit l'hématopoïèse entre autre). Pour finir, la surface externe de l'os est recouverte d'une fine couche très vascularisée appelée périoste, laquelle est composée de lamelles circonférentielles externes (*cf.* **Figure 4 A**).

Niveau 7. Vient finalement le dernier niveau d'organisation, lequel correspond à la morphologie finale adoptée par l'os tel un organe (*cf.* la photographie d'un os bovin de la **Figure 2**, échelle égale à 10 cm).

I-2 / Le Collagène

I-2-1) Généralités

On retrouve le collagène, une protéine, chez toutes les espèces animales dans l'embranchement des métazoaires [16]. Le collagène n'est pas seulement une protéine ubiquitaire, c'est également la protéine la plus abondante du règne animal. En effet, elle compose à peu près 30% du protéome (ensemble de toutes les protéines composant un organisme) d'un être humain par exemple. C'est principalement cette dernière qui apporte l'intégrité structurale, ainsi que la stabilité mécanique et l'élasticité aux tissus conjonctifs *via* son organisation supramoléculaire au sein de la matrice extracellulaire. De plus, sur la base de leurs structures supramoléculaires, il y a deux grandes catégories de collagène, à savoir les collagènes fibreux et non-fibreux. Tout type de collagène fibreux et non-fibreux confondus, il y a au jour d'aujourd'hui exactement 29 différents types de collagènes qui ont été identifiés, nommés I, II, III, IV et ainsi de suite jusqu'à XXIX. Ces différents types possèdent des séquences d'acides aminés propres, donc des structures moléculaires et supramoléculaires propres, afin de répondre aux contraintes mécaniques spécifiques demandées par le tissu dans lequel ils sont incorporés. Certains tissus sont parfois composés de l'association de plusieurs types de collagènes, comme la cornée et la peau qui sont composés des collagènes de type I et V par exemple [24], [25]. Parmi eux, le collagène dit de type I, qui appartient à la catégorie des collagène fibreux, rentre dans la composition de nombreux tissus : peau, cornée, tendon, cartilage, dentine et os, entre autres. Ainsi dans l'os, 90% de la masse totale en protéines est celle du collagène de type I, et le reste correspond aux protéines non-collagéniques.

I-2-2) Composition

A l'échelle moléculaire, le collagène résulte de l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques, toutes hélices gauches et toutes de même taille (environ un millier d'acides aminés, d'une longueur d'environ 300 nm chacune) s'enroulant les unes avec les autres. Cela conduit à la formation d'une triple hélice chirale (triple hélice droite cette fois-ci).

Amino acid profile of collagens from Amur sturgeon skin (residues/1000 residues).

	Type I	Type V
Hyp (-)	109.31 ± 4.06	112.07 ± 2.03
Asp (D)	37.88 ± 2.86	42.27 ± 3.57
Thr (T)	23.44 ± 2.92	25.47 ± 1.64
Ser (S)	46.03 ± 3.06	36.57 ± 2.10
Glu (E)	68.26 ± 0.25	95.32 ± 3.55
Pro (P)	114.66 ± 1.77	122.23 ± 3.85
Gly (G)	329.36 ± 15.57	312.78 ± 12.71
Ala (A)	109.13 ± 6.76	48.50 ± 4.91
Val (V)	14.42 ± 1.35	21.46 ± 0.97
Met (M)	4.01 ± 0.71	6.69 ± 1.94
Ile (I)	11.13 ± 0.04	13.02 ± 0.33
Leu (L)	16.45 ± 1.02	35.47 ± 2.14
Tyr (Y)	2.33 ± 0.47	2.35 ± 0.76
Phe (F)	11.30 ± 0.40	14.32 ± 2.81
Hyl (-)	8.65 ± 0.46	36.87 ± 2.68
His (H)	17.43 ± 3.70	13.38 ± 1.08
Lys (K)	22.78 ± 0.64	14.25 ± 1.14
Arg (R)	53.43 ± 5.20	47.03 ± 3.67

-, No one-letter designation for the amino acid.

Tableau 2. Les proportions de chaque acide aminé retrouvé au sein des collagènes de type I et V, extraits de la peau d'esturgeon. Tableau reproduit d'après Wang et al. [24].

Cette triple hélice est l'unité fondamentale du collagène, elle possède une masse moléculaire d'environ 285 kdalton [26]. Les chaînes polypeptidiques qui la composent peuvent toutes posséder exactement la même séquence d'acides aminés, ou bien au contraire en posséder des différentes (au choix parmi les 38 chaînes polypeptidiques de collagène référencées). Le collagène de type I est retrouvé en grande quantité dans le tissu osseux, au sein duquel il est le principal type de collagène présent. Et au sein du collagène de type I, les acides aminés les plus rencontrés sont la Glycine (~ 33 %), la Proline (~ 12 %), l'Alanine (~ 11 %) ou encore l'Hydroxyproline (~ 11 %, provenant de l'hydroxylation post-traductionnelle de la Proline [26]), dont les formules chimiques apparaissent au sein de la **Figure 6**. Les proportions ci-dessus ont été tirées à partir d'une étude faite sur du collagène de type I extrait de la peau d'esturgeon (cf. **Tableau 2**) [24]. Ainsi, toujours d'après le **Tableau 2**, 18 acides aminés différents composent le collagène de type I. On retrouve également de la Glutamine (~ 7 %), de la Sérine (~ 5 %), de l'Arginine (~ 5 %), de l'Aspartate (~ 4 %), de la Thréonine (~ 2 %), ou encore de l'Hydroxylysine (0,9 %, provenant de l'hydroxylation post-traductionnelle de la Lysine) etc. Toujours d'après le **Tableau 2**, nous constatons que pour le collagène de type V, également un type de collagène fibreux constituant la peau d'esturgeon en association avec le type I, la proportion en acides aminés est quelque peu différente (la

Glycine restant néanmoins majoritaire). D'ailleurs, quel que soit le type de collagène considéré, la Glycine est toujours l'acide aminé majoritaire et les chaînes polypeptidiques qui le compose respectent toujours la répétition Glycine-X-Y (dans laquelle environ un tiers des X sont des résidus Proline, et un tiers des Y sont des résidus Hydroxyproline). Ceci est l'une des conditions intrinsèques afin qu'une triple hélice de chaînes polypeptidiques puisse être considérée comme du collagène. L'autre étant sa capacité à s'auto-assembler de manière supramoléculaire au sein de la matrice extracellulaire, comme évoqué précédemment lors de la description du **niveau 4** de l'organisation hiérarchique du tissu osseux.

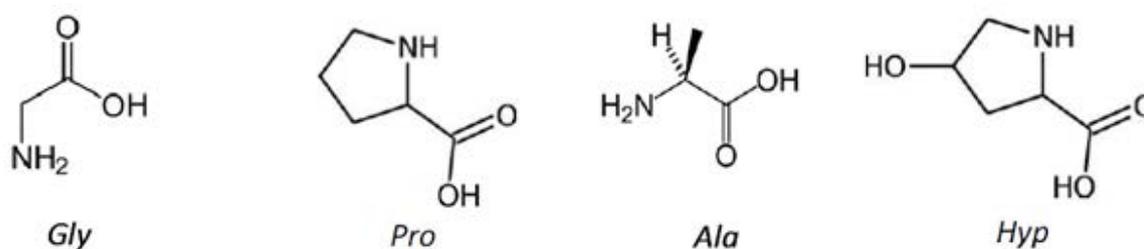


Figure 6. Formules chimiques des 4 acides aminés les plus abondants au sein du collagène de type I : Gly = Glycine ; Pro = Proline ; Ala = Alanine ; Hyp = Hydroxyproline.

I-2-3) Structure

La récurrence de la Glycine tous les trois acides aminés est primordiale afin que trois chaînes polypeptidiques puissent adopter une structure sous forme de triple hélice de collagène. En effet, au sein d'une triple hélice, la chaîne latérale d'un acide aminé sur trois pointe vers l'intérieur. De plus, la chaîne latérale de la Glycine est la plus petite parmi l'ensemble des chaînes latérales des 22 acides aminés connus, en l'occurrence il s'agit seulement d'un atome d'Hydrogène. Le volume restreint d'une telle chaîne latérale lui permet de prendre place régulièrement au centre de la triple hélice au contraire des chaînes latérales plus volumineuses. Cependant, cette contrainte stérique n'est pas la seule raison conduisant à la formation d'une triple hélice, puisqu'il y a également des contraintes physico-chimiques. En effet, au sein des chaînes latérales, la présence répétée de cet atome d'hydrogène appauvrit l'édifice en hétéroatomes. Ainsi, toute création de liaisons H au sein d'une même chaîne polypeptidique de collagène est difficile. C'est ce phénomène de créations de liaisons H qui favorise la formation d'une simple hélice- α . Néanmoins, l'absence de liaisons H au sein d'une unique chaîne polypeptidique de collagène n'est également pas la seule raison pour laquelle cette dernière privilégie la formation d'une triple hélice plutôt que celle d'une hélice- α . La forte présence de Proline et d'Hydroxyproline au sein du collagène (respectivement $\sim 12\%$ et

~ 11 % pour rappel dans le cas du collagène de type I) est aussi un handicap. En effet, la Proline possède une chaîne latérale cyclique, laquelle rend la chaîne polypeptidique de collagène rigide, empêchant ainsi toute élaboration d'une hélice- α .

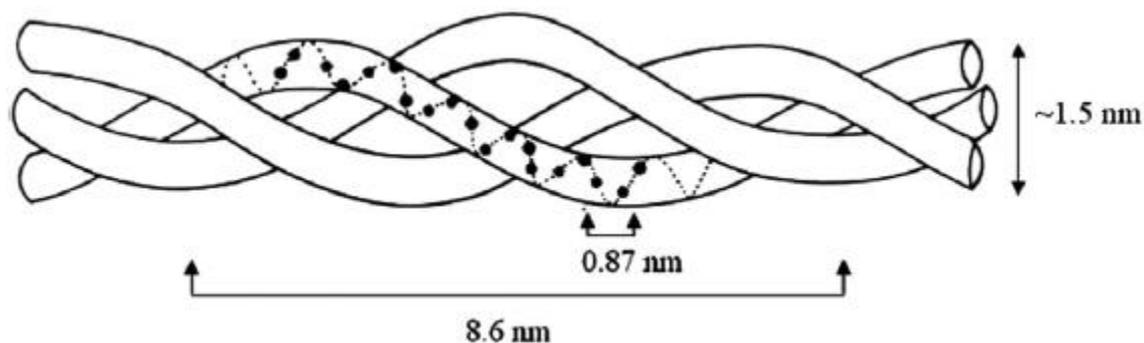


Figure 7. Schéma d'une triple hélice de collagène de type I composée de 3 chaînes polypeptidiques. Image reproduite d'après Meyers et al. [15].

Enfin, si les atomes d'hydrogène appartenant à la chaîne latérale des résidus Glycine prennent place au centre de la triple hélice de collagène pour des considérations stériques, les autres chaînes latérales provenant des autres types d'acides aminés (comprenant les groupements -OH, -COOH et -NH₂) sont elles, rejetées vers l'extérieur et donc accessibles. Et ce sont ces dernières chaînes latérales qui vont permettre la stabilité de la triple hélice par le biais d'un réseau coopératif de liaisons H intermoléculaires entre chaînes polypeptidiques adjacentes. La **Figure 7** schématise trois chaînes polypeptidiques (avec un pas de 0,87 nm chacune, soit 3,3 résidus par tour) enroulées les unes avec les autres formant une triple hélice de collagène de type I. Cette triple hélice de collagène de type I possède un pas de 8,6 nm (soit environ une trentaine d'acides aminés par tour), une longueur totale d'approximativement 300 nm et un diamètre d'environ 1,5 nm.

I-2-4) Formation

In vivo, l'assemblage du collagène est issu de la formation d'un intermédiaire propeptide appelé procollagène. Ce procollagène, sorte de collagène primitif, se forme initialement au sein du réticulum endoplasmique (*i.e.* un organite présent à l'intérieur du cytoplasme des cellule ostéoblastes), à l'intérieur duquel se déroule notamment l'hydroxylation post-traductionnel des résidus Proline et Lysine [27]. C'est ici que se déroule également la connexion des 3 chaînes polypeptidiques au moyen de ponts disulfures, par le biais de résidus Cystéine aux positions C-terminales. Ces ponts disulfures favorisent d'abord

l'alignement, puis ensuite l'enroulement des chaînes les unes avec les autres, conduisant à la formation d'une triple hélice de procollagène. Ce procollagène migre ensuite au sein de l'appareil de Golgi (*i.e.* un organite présent autour du noyau cellulaire des otéoblastes) à l'intérieur duquel va se fixer des chaînes polypeptidiques non-hélicales à chacune des extrémités de la triple hélice. Ces chaînes non-hélicales vont dans un premier temps favoriser la maturation de la triple hélice, c'est à dire conduire à un meilleur agencement de ses trois chaînes polypeptidiques. Par la suite, ces chaînes non-hélicales, qui sont chargées négativement à cause de la présence de résidus osidiques (glucose, galactose...), procure la solubilité à la structure et permettre ainsi son éjection en dehors de la cellule. Une fois au sein du fluide extracellulaire, les extrémités contenant les chaînes non-hélicales ainsi que les ponts disulfures sont clivés par dégradation enzymatique (sous l'action de protéases), ce qui conduit à la formation d'une molécule de collagène. Cette molécule de collagène mature possède au final deux parties distinctes : *(i)* la zone sous forme de triple hélice centrale ; et *(ii)* des extrémités N et C terminales (appelées N et C télopeptides) qui consistent en des séquences linéaires résiduelles (issues des chaînes non-hélicales) de 10 à 25 acides aminés [27], [28]. La perte de ses chaînes non-hélicales entraîne une diminution drastique de la solubilité de la molécule de collagène, ce qui va favoriser leur organisation sous forme de fibrilles.

I-2-5) Organisation du collagène de type I

Dans le cas des collagènes fibreux (c'est-à-dire les types I, II, III, V et XI), les molécules de collagène s'associent de manière spontanée conduisant à la formation de fibrilles, phénomène appelé fibrillogénèse. *In vivo*, ce phénomène commencerait par l'action d'une enzyme spécifique, la lysyl oxydase qui contient du cuivre, laquelle va catalyser la désamination oxydative des résidus Hydroxylysine présents au niveau des extrémités N et C télopeptidiques, donnant ainsi naissance à un dérivé aldéhydique (l'hydroxyallysine). Par la suite, un résidu hydroxyallysine télopeptidique côté C-terminal d'une molécule de collagène ainsi formé, va réagir spontanément sur la fonction amine d'un résidu Lysine (ou Hydroxylysine) côté N-terminal dans la zone hélicale d'une seconde molécule de collagène (ou l'inverse, c'est-à-dire un résidu hydroxyallysine côté N-terminal qui réagit sur la fonction amine d'un résidu Lysine côté C-terminal) [28]. Deux résidus hydroxyallysine télopeptidique localisés sur deux molécules de collagène voisines peuvent également s'unir ensemble par aldolisation. Les résidus Hydroxyallysine agissent donc en tant qu'agents réticulants, qui permettent de lier successivement plusieurs molécules de collagène entre-elles (*cf.* **Figure 8**). Qui plus est, il s'agit d'une réticulation chimique, puisque les liaisons

intercaténaïres ainsi formées sont des liaisons covalentes, ce qui explique la grande stabilité des collagènes fibreux. Ces liaisons covalentes sont des liaisons carbone-carbone dans le cas d'une aldolisation. Alors que dans le cas de l'attaque d'un résidu hydroxyallysine sur une fonction amine, le tout conjugué avec la condensation d'un second résidu hydroxyallysine voisin, cela conduit à la formation d'une liaison covalente croisée appelée liaison pyridinoline.

Ces liaisons pyridinolines s'établissent à des endroits bien spécifiques le long de toutes les chaînes de collagène. En effet, dans la zone hélicale d'une chaîne de collagène de type I au sein du tissu osseux, la distance entre l'extrémité N-terminale et l'emplacement où se trouve la liaison pyridinoline liant une seconde chaîne de collagène est exactement de 67 nm. Deux chaînes de collagène adjacentes et liées entre elles se retrouvent donc légèrement décalées l'une par rapport à l'autre. Ainsi, lorsque la fibrillogénèse est bien induite (c'est-à-dire lorsque l'empilement des chaînes de collagène se fait de façon uniaxial), ce décalage dans l'arrangement local à l'échelle moléculaire se traduit en une périodicité de 67 nm à l'échelle des fibrilles. Cette périodicité est causée par la répétition successive de deux zones adjacentes le long de l'axe longitudinal des fibrilles : (i) les zones de « gap » dépourvues de la partie hélicale de collagène (zone de trous en Français) ; et (ii) les zones « d'overlap » riches en partie hélicale de collagène (zones de chevauchement en Français). Cet empilement spécifique des chaînes de collagène est décrit d'après le modèle de Hodge et Petruska [29], dans lequel ce décalage périodique de 67 nm est appelé distance D. Ainsi, la longueur de 300 nm d'une molécule de collagène correspond à 4,4 fois la distance D. C'est pourquoi ce modèle est également appelé « quarter-stagger overlap », étant donné que la distance D périodique correspond ainsi à peu près au quart de la longueur totale d'une molécule de collagène. De plus, les zones de gap (d'une longueur de $67 \times 5 - 300 = 35$ nm ou 0,52 D) sont, contrairement à ce que leur nom indique, occupées par les petits fragments de chaînes linéaires des extrémités N et C télépeptidiques. D'un autre côté, au sein des zones d'overlap (d'une longueur de $300 - 67 \times 4 = 32$ nm ou 0,48 D) intervient un chevauchement complet des parties hélicales de toutes les chaînes de collagène (cf. **Figure 8**). Cette alternance zones de gap/zones d'overlap conduit à une striation transverse observable en MET sur un tendon minéralisé de dinde (cf. **Figure 9**) : laquelle apparaît comme une succession de zones claires (zones de gap) ; et d'autres plus foncées correspondant aux zones d'overlap (dont la somme des deux est la distance D de 67 nm).

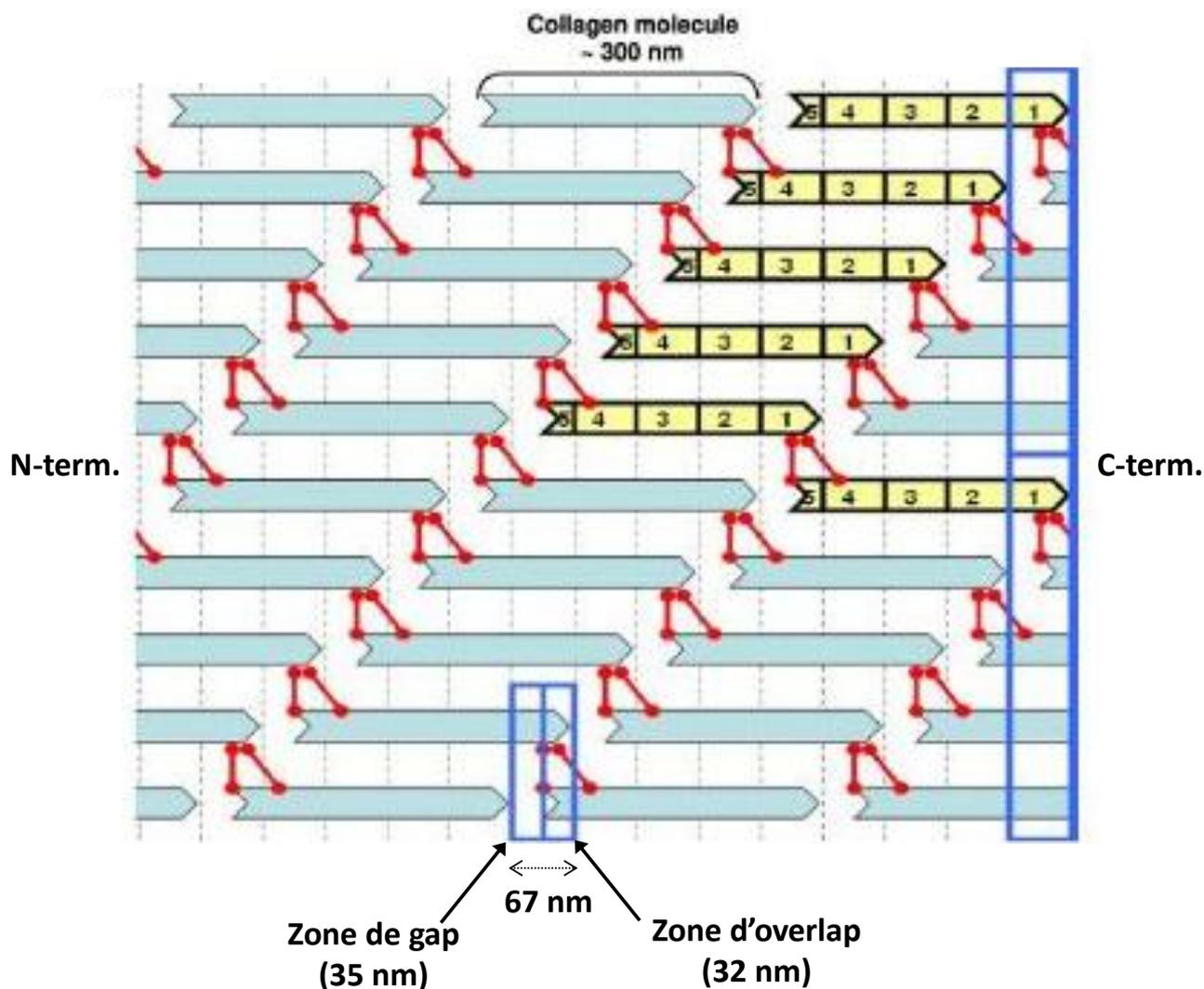


Figure 8. Schéma d'un réseau fibrillaire de collagène, indiquant la façon avec laquelle les triples hélices de collagène (bâtonnets bleus) sont réticulés les unes avec les autres via des liaisons croisées pyridinolines (traits rouges). Cela se fait via un empilement uniaxial des molécules de collagène avec un léger décalage entre deux molécules adjacentes. Le tout conduit à une périodicité structurale le long de l'axe longitudinal des fibrilles, laquelle correspond à la succession des zones de « gap » et des zones « d'overlap ». Image reproduite d'après Meyers et al. [15].

Par ailleurs, le tendon de dinde est fréquemment utilisé comme un modèle du tissu osseux nouvellement formé, puisqu'il est composé de fibrilles parallèles de collagène minéralisées [18], [19], [30], [31]. De plus, il est évident que la fibrillogénèse ne s'induit jamais de manière strictement « parfaite » *in vivo*, ce qui va conduire en une distribution de la valeur de cette distance D : de 63 à 73 nm dans l'os, ou bien même de 55 à 80 nm dans la peau par exemple [32]. Cependant, l'importance de cette variation dans la physiologie et la biologie des tissus n'est pas clairement identifiée à ce jour [32].

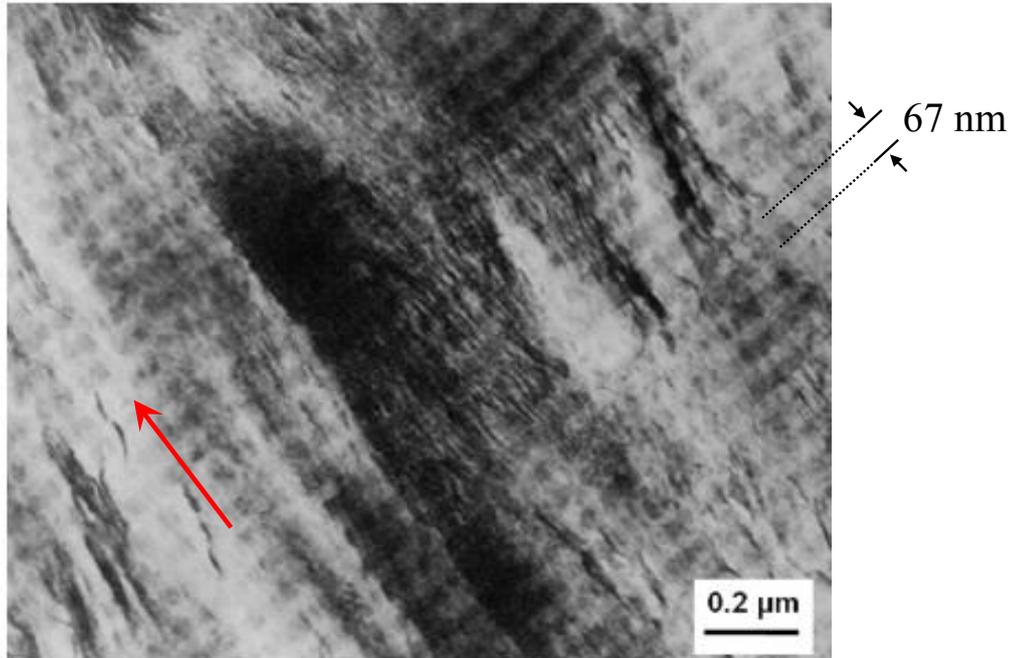


Figure 9. Cliché MET d'une coupe d'un tendon minéralisé provenant de la patte d'une dinde (vieille de 21 semaines). La coupe a été faite de façon parallèle par rapport à la surface du tendon, de manière à l'observer le long de l'axe longitudinal des fibrilles de collagène de type I (flèche rouge). Les zones claires correspondent aux zones de gap, tandis que les zones plus sombres correspondent aux zones d'overlap, et ces deux zones ensemble correspondent à la distance D de 67 nm. Image reproduite d'après Weiner et al. [18].

Pour résumer, dans le cas des collagènes de type fibreux comme le collagène de type I, l'assemblage uniaxial de plusieurs chaînes de collagène (d'un diamètre de 1,5 nm chacune) donne naissance à des fibrilles (cf. **Figures 8 & 9**). Ces fibrilles ont des diamètres variables en fonction du tissu dans lequel elles sont incorporées, c'est-à-dire, environ 30 nm dans la cornée [25], d'une centaine de nanomètres dans l'os, et jusqu'à 300 nm dans les tendons [19]. Une fois ces fibrilles formées, elles s'organisent également de façon uniaxiale, et forment une structure de taille plus conséquente appelée fibre de collagène (cf. **Figure 10**). Là encore, la taille des fibres va dépendre du tissu : de 0,1 à 3 μm de diamètre dans l'os, jusqu'à un record dans les tendons où certaines fibres peuvent constituer le tendon dans l'intégralité de sa longueur (quelques centimètres) avec un diamètre pouvant atteindre 500 μm . Ainsi, comme évoqué précédemment, ces fibres de collagène se retrouvent au sein de l'os cortical (agencées en lamelles concentriques et circonférentielles denses) ainsi qu'au sein de l'os spongieux (formant un réseau interconnecté poreux). Alors que la fibrillogénèse est induite par une réticulation chimique intercaténaire des molécules de collagène, il est proposé que la condensation des fibrilles est induite par une réticulation à l'aide de certaines protéines non-collagéniques (les protéoglycanes dont la décorine par exemple), le tout

favorisé par le biais d'interactions hydrophobes. Cependant, le niveau de compréhension actuel concernant cet assemblage moléculaire des fibrilles en fibres est encore très mince [33].

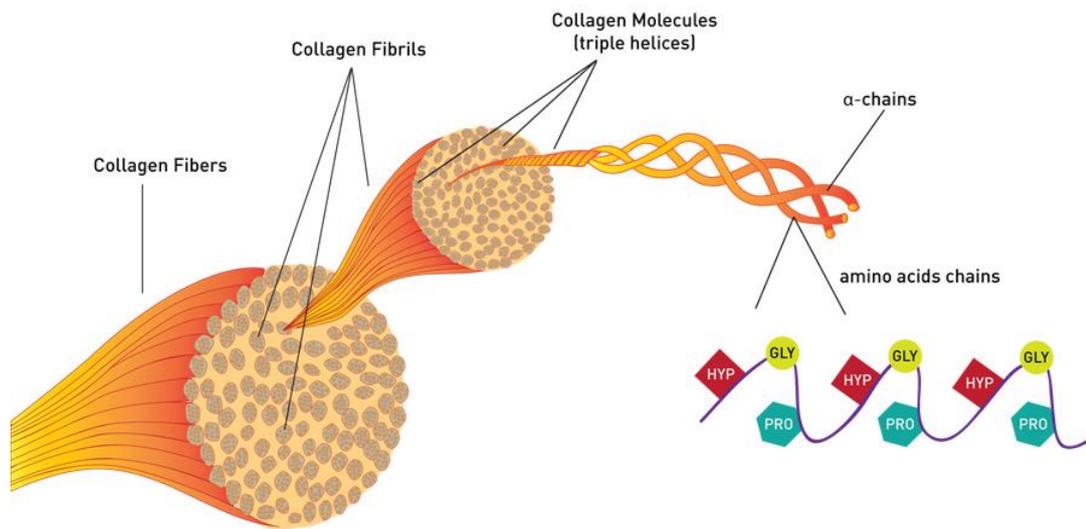


Figure 10. Croquis montrant la façon avec laquelle les chaînes polypeptidiques de collagène (grossièrement schématisées par la répétition Gly-Pro-Hyp, avec Gly = Glycine, Pro = Proline et Hyp = Hydroxyproline) s'assemblent les unes avec les autres. Premièrement en simple hélice- α , puis en triple hélice de collagène (d'un diamètre de 1,5 nm et d'une longueur de 300 nm), puis en fibrille (d'un diamètre de 30 à 300 nm et d'une longueur de l'ordre du μm), et finalement en fibres (d'un diamètre de 100 à 500 μm et d'une longueur de l'ordre du mm voire du cm).

Toutes les caractéristiques énumérées ci-dessus ont montré que l'organisation multi-échelle du tissu osseux est étroitement liée à celle du collagène. En effet, les sept niveaux hiérarchiques du tissu osseux sont concernés, de la fibrille isolée, aux fibres, aux ostéons, et à la ségrégation os cortical/os spongieux conduisant à la morphologie finale de l'organe. De plus, il faut noter que toute contrainte mécanique qui s'exerce sur un organe osseux va se répartir sur tous les niveaux hiérarchiques [33]. De ce fait, la réponse mécanique de l'organe osseux est étroitement liée à l'organisation tridimensionnelle du collagène. Il se pose dès lors la question des contributions individuelles de chaque niveau hiérarchique aux propriétés mécaniques finales du tissu (ainsi que des potentielles synergies qui existent entre elles). C'est pourquoi, à l'aide d'approches expérimentales et théoriques, de grands efforts ont été entrepris afin de comprendre la relation structure/propriétés mécaniques du collagène à chaque échelle [34]. En particulier, il a été montré que les édifices de collagène ont des propriétés mécaniques anisotropes. En effet, ils sont généralement plus résistants dans la direction des fibres que dans la direction perpendiculaire. Ceci est transposable directement au tendon, dont les fibres parallèles qui le composent sont disposées dans sa longueur le rendant

résistant au déchirement. Le collagène s'organise donc en fonction des impératifs demandés par le tissu dans lequel il est incorporé. C'est également le cas dans l'os, mais ce cas de figure est bien plus complexe. En effet, de par sa structure sophistiquée, en raison de fibres possédant des orientations extrêmement variables (particulièrement au sein des ostéons, *cf. Figure 3*), et du fait de la présence de zones de densité de fibrilles très différentes (*cf. Figure 2, niveau 6*), les liens entre morphologie et propriétés mécaniques sont délicats à déterminer [33], [34]. En définitive, le collagène est connu pour apporter intégrité structurale, stabilité mécanique et élasticité au tissu osseux (de par son module de Young, de 8 à 24 GPa pour l'os cortical par exemple) [15]. De son côté, l'apatite (module de Young de 130 GPa) est connue pour accroître la rigidité de l'ensemble [15].

I-3 / Le minéral : l'apatite biologique

I-3-1) Généralités

Au même titre que le collagène, l'apatite est un minéral ubiquitaire. Effectivement, on trouve l'apatite comme composante minérale au sein de nombreux tissus minéralisés, tels : l'os [35], l'émail et la dentine [36] ; mais également le tendon minéralisé chez la dinde [18] ; la défense de certains mammifères comme l'ivoire chez l'éléphant [37] ou bien les bois de cerf [38] ; les pattes ravisseuses de certains crustacés comme la squille *odontodactylus scyllarus* [39] ; l'écaille de certains poissons comme celles des requins [40]... L'apatite se retrouve également sous la forme de calcifications pathologiques, comme par exemple dans les calculs rénaux ou les plaques de Randall [41]. Mais l'apatite n'est pas seulement rencontrée au sein du vivant puisqu'il s'agit également d'un minéral géologique, qui peut être à la fois de source volcanique ou sédimentaire. Ainsi, pour les amateurs de lithothérapie, une apatite géologique telle l'apatite bleue est supposée posséder diverses vertus, comme accroître la communication et la solidarité de son détenteur.

Il faut savoir également que d'autres phases de phosphate de calcium ont été suspectées par le passé de rentrer dans la composition du minéral osseux mature. Une chose est néanmoins certaine aujourd'hui, c'est que la biominéralisation osseuse conduit uniquement à l'apatite. Ce résultat n'est pas forcément intuitif puisque le fluide extracellulaire au sein du tissu osseux est en sursaturation à l'égard de nombreuses phases cristallines [42]. Ceci inclut l'apatite, mais également d'autres phosphates de calcium (tel le phosphate octocalcique, OCP, de formule $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ou bien même des carbonates de calcium (telle la calcite, un polymorphe de CaCO_3) par exemple. Attention toutefois, puisque le concept de sursaturation n'est valable seulement que dans le cas d'un mécanisme de croissance par nucléation homogène.

I-3-2) Structure cristalline

Le minéral osseux cristallise sous la forme d'une structure d'apatite, laquelle appartient à une vaste famille de composés ionocovalents de formule générique :



dans laquelle Me est un cation bivalent, XO_4 un anion trivalent et Y un anion monovalent. Concernant l'apatite osseuse, Me est un cation calcium, XO_4 un anion orthophosphate, et Y

un anion hydroxyle ; ce qui conduit à la formule suivante : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La présence d'ions hydroxyles donne son nom plus distinctif à la structure de ce minéral osseux : l'hydroxyapatite. Et c'est à cette dernière que fera référence le terme apatite dans toute la suite de ce manuscrit. De leur côté, les apatites géologiques sont composées également d'ions fluorures (fluorapatite) et d'ions chlorures (chlorapatite). On sait depuis 1926 grâce aux travaux par analyse chimique et surtout par diffraction des rayons X de De Jong, que le minéral osseux cristallise sous cette phase d'apatite [35] bien qu'il n'avait pas la certitude à l'époque qu'il s'agisse de la seule phase cristalline présente.

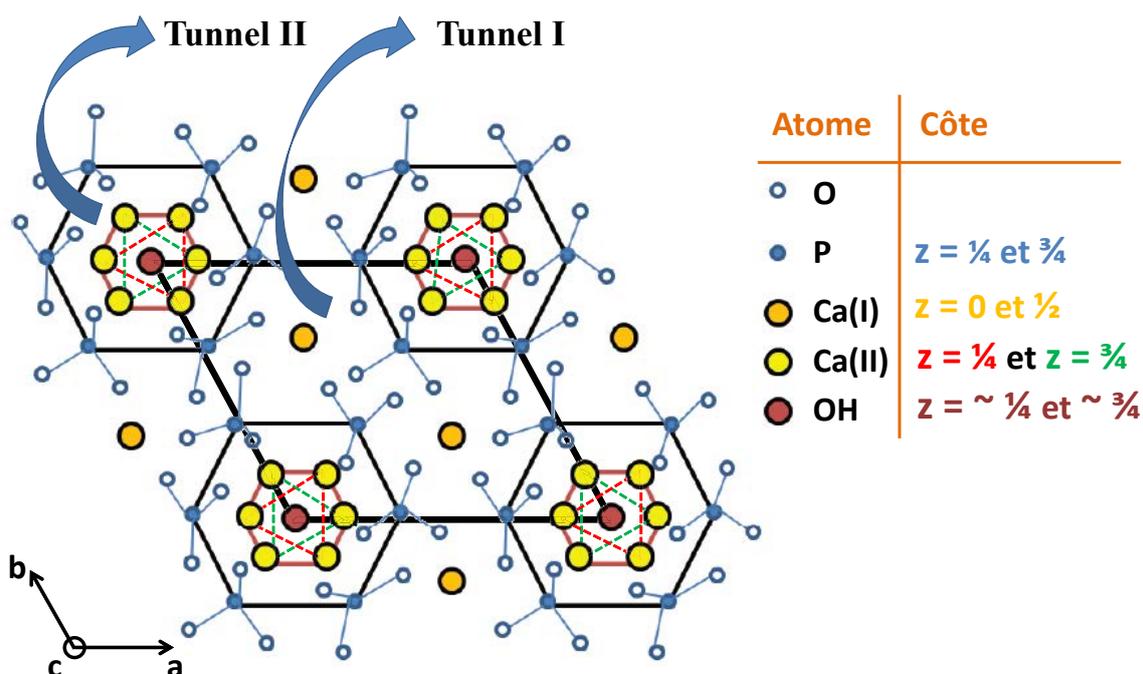


Figure 11. Projection structurale de la maille hexagonale de l'apatite (groupe d'espace $P6_3/m$) de formule brute $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ selon le plan (001), laissant apparaître la présence de deux types de tunnels colinéaires avec l'axe cristallographique c du réseau (les tunnels I et II). Image reproduite d'après Beuvelot [43].

Cette apatite osseuse cristallise selon une maille hexagonale [44] (groupe d'espace $P6_3/m$) dont la projection selon le plan (001) est décrite au sein de la **Figure 11**. Les paramètres cristallographiques d'une telle maille hexagonale d'apatite [45] sont $a = b \sim 9.4 \text{ \AA}$ et $c \sim 6.9 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ et $\gamma = 120^\circ$. Les 10 atomes de calcium par maille occupent 2 sites cristallographiques distincts, les 6 atomes de phosphore sont équivalents, les ions hydroxyles n'occupent qu'un seul site, et les 24 atomes d'oxygène des espèces PO_4^{3-} occupent 3 sites distincts (cf. **Figure 11**). La structure peut être décrite comme un empilement d'hexagones réguliers (formés par les espèces PO_4^{3-}) disposés en strates, au nombre de 2 par maille aux

cotes $z = 1/4$ et $3/4$. Ces strates de PO_4^{3-} s'empilent en se juxtaposant les unes sur les autres, ce qui va engendrer la création de deux tunnels colinéaires à l'axe cristallographique c du réseau (c'est-à-dire les tunnels I et II, cf. **Figure 11**). Le tunnel I est occupé par 4/10 des ions calcium, les Ca(I), lesquels sont alignés entre eux le long du tunnel et disposés aux cotes 0 et 1/2. Le tunnel II est occupé par les 6/10 d'atomes de calcium restants, les Ca(II), lesquels forment des triangles équilatéraux centrés autour du cœur du tunnel (voir les triangles rouges et verts de la **Figure 11**). Dans une maille, ces triangles de calcium sont au nombre de 2 par tunnel, dont l'un est à la cote 1/4 et l'autre à la cote 3/4 (c'est-à-dire au même niveau que les strates de PO_4^{3-}). C'est à l'intérieur de ces tripodes de Ca(II), au cœur du tunnel II, que prennent place des colonnes d'ions hydroxyles.

Il se trouve par ailleurs que ces tunnels II sont un endroit privilégié pour l'implantation d'un grand nombre de substitutions ioniques [46]. C'est largement le cas au sein de l'apatite osseuse, ce qui va engendrer un désordre structural des ions hydroxyles [47], [48]. Ceci a pour conséquence que les ions OH^- n'ont pas de position, ni d'orientation fixe au sein de la maille. Il existe en effet un désordre statistique, et ces derniers sont localisés parfois au-dessus et parfois en dessous des tripodes de Ca(II), avec des orientations fluctuantes de la liaison O-H [48] (cette dernière restant néanmoins toujours parallèle aux tunnels II et donc à l'axe cristallographique c du réseau). Cependant, la synthèse de certaines chlorapatites ou de certaines apatites stœchiométriques très pures peut conduire en une structure particulière stabilisée à basse température. Dans une telle structure, tous les ions OH^- d'un tunnel sont placés du même côté du tripode de Ca(II) et possèdent tous la même orientation de la liaison O-H [48]. Les ions OH^- du tunnel adjacent sont eux placés de l'autre côté du tripode, et l'orientation de la liaison O-H s'effectue dans le sens contraire [48]. Il en résulte une structure très ordonnée avec un doublement du paramètre cristallographique a , qui est dorénavant décrite par une maille monoclinique (groupe d'espace $\text{P2}_1/\text{b}$) et non plus hexagonale.

I-3-3) Substitutions ioniques

L'apatite osseuse précipite à partir du liquide interstitiel du tissu osseux, lequel est un fluide extracellulaire d'un pH proche de 7,4 qui est riche en espèces ioniques provenant du plasma sanguin. Ces espèces ioniques possèdent des concentrations diverses, qui vont d'une centaine de mM (Na^+ , Cl^-), à quelques mM (HCO_3^- , K^+ , Ca^{2+}), voir moins de l'ordre de 1 mM (HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , SO_4^{2-}), jusqu'à des traces de l'ordre du ppm comme pour Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} ,

Pb^{2+} et Sr^{2+} (dont certaines sont des espèces toxiques ingérées qui se retrouvent dans l'organisme). D'autre part, il se trouve que l'apatite possède une incroyable aptitude à s'accommoder d'un grand nombre de substitutions aussi bien anioniques que cationiques sur tous ses sites cristallographiques, et ceci sans que sa structure en soit notablement modifiée [44]. Cette aptitude ne se limite pas aux ions du plasma sanguin puisque qu'il se trouve que la structure de l'apatite peut s'accommoder de la substitution de près de la moitié des éléments du tableau périodique [49], [50]. Ainsi, dans le cas du tissu osseux, toutes les espèces ioniques du plasma sanguin vont se retrouver incorporées dans le minéral en des proportions plus ou moins importantes. Ces incorporations d'espèces ioniques « étrangères » sont connues pour affecter la formation ainsi que les propriétés physico-chimiques de l'apatite osseuse, et ceci potentiellement de façon multifactorielle [51]. Ainsi, le fait qu'une partie du vivant ait choisi l'apatite pour constituer son endosquelette est loin d'être un hasard. En effet, cette aptitude peut être reliée directement aux besoins de l'organisme de stocker certaines espèces toxiques (tel le Plomb par exemple), afin de les empêcher de nuire à certains processus physiologiques. Mais ceci est également très lié aux propriétés métaboliques du tissu osseux puisque cela permet dans un premier temps de stocker certaines espèces ioniques (ceci concerne non seulement des impuretés mais également les ions calcium et orthophosphates par exemple), puis par la suite de pouvoir les libérer en temps voulu lors du remodelage afin de répondre à certaines fonctions biologiques de l'organisme. Une telle libération programmée assure l'homéostasie du fluide extracellulaire, à travers un contrôle de l'osmolarité (incluant la calcémie, la natrémie...), ou bien même le pH *via* la libération de carbonates et d'orthophosphates. De plus, ces substitutions ioniques affectent également la formation ainsi que les propriétés globales de l'apatite. Ainsi, à titre d'exemple, le magnésium (de l'ordre de 1 % massique dans l'os) est connu pour sa capacité à stabiliser certaines phases métastables comme le carbonate de calcium amorphe (ACC) [52] ou même le phosphate de calcium amorphe (ACP) [53]. Ainsi, si la croissance de l'apatite osseuse passe par l'intermédiaire d'une phase précurseur d'ACP, comme cela a été montré pour les arêtes de la nageoire caudale des poissons zèbres [54], [55], le magnésium pourrait favoriser la formation de précurseurs amorphes. De son côté, le strontium, même présent sous forme de traces, a un rôle avéré dans le renforcement de l'os puisqu'il conduit à la diminution de la résorption osseuse [56]. C'est pourquoi ce dernier est utilisé comme agent thérapeutique chez les patients ostéopéniques (c'est-à-dire un patient qui présente une diminution de sa masse osseuse).

La substitution la plus importante en masse est celle des ions carbonates, laquelle peut atteindre une quantité allant d'environ 3 % massique dans l'émail à environ 8 % massique dans l'os humain (*cf.* **Tableau 3**). Cette substitution en ions carbonates est de première importance puisqu'elle a plusieurs répercussions connues sur l'apatite, comme d'augmenter la solubilité ou encore de diminuer la taille des cristaux [57]. **De plus, il a été montré récemment que les CO_3^{2-} avaient également un rôle crucial dans la formation d'une couche particulière en surface des cristaux d'apatite [58], dont la caractérisation structurale et chimique, ainsi que le rôle *in vivo*, seront au cœur des préoccupations de cette thèse (*cf.* Chapitres II, III & IV).**

Cette substitution en ions carbonates peut s'effectuer en lieu et place des espèces orthophosphates (appelée substitution de type B), ou bien en lieu et place des ions hydroxyles (appelée substitution de type A). Cependant, il a été établi que, pour aussi bien l'apatite osseuse ou dentaire, que pour ses analogues de synthèse obtenus à température ambiante (à part de rares exceptions), la substitution de type B est majoritaire [50] (de l'ordre de 90 % dans l'émail humain par exemple [59]). Au contraire, les apatites qui présentent une substitution de type A majoritaire sont généralement des apatites de synthèses obtenues à l'abri de l'humidité, à haute température et à haute pression [60]. Quoi qu'il en soit, il est à noter qu'une apatite substituée en carbonate est rarement 100% de type A ou bien 100% de type B, mais plutôt souvent de type A/B où les deux substitutions coexistent l'une avec l'autre (dont l'une est majoritaire). Cette coexistence d'une substitution de type A/B peut se produire au sein d'une même maille ; et il envisageable que les mécanismes entrepris par la structure afin de s'y adapter peuvent conduire à un désordre important au sein de plusieurs mailles adjacentes. Au final, ces ions carbonates sont après les ions calcium et orthophosphates, le troisième constituant le plus abondant en masse au sein du minéral osseux. C'est pourquoi en parlant d'apatite osseuse, le terme d'apatite carbonatée est souvent évoqué.

Par ailleurs, il se trouve que la substitution en ions carbonates est aisément accomplie lors de synthèses *in vitro*. Voilà pourquoi, dans la grande majorité des cas dans la littérature, les résultats d'analyse du minéral osseux sont comparés à ceux d'apatites carbonatées de synthèse (qui sont appelées apatites biomimétiques, et qui sont des modèles synthétiques des apatites osseuses). Ainsi, les points communs entre les apatites biologiques et biomimétiques sont : (i) leur taille nanométrique et leur morphologie plaquettaire (observée par MET) ; (ii) une incorporation importante en ions carbonates (vérifiée par spectroscopie

vibrationnelle telle l'infrarouge ou le Raman et analyse élémentaire) ; ainsi que (iii) une faible cristallinité (caractérisé par des diffractogrammes de rayons X avec des raies de Bragg larges). Néanmoins, l'utilisation de ces apatites biomimétiques en tant que modèle du minéral osseux a ses limites, puisqu'il n'est pas pris en compte l'influence de toutes les substitutions ioniques (autres que les CO_3^{2-}). C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris la synthèse d'une apatite biomimétique possédant potentiellement autant de substitutions ioniques que le minéral osseux, en la précipitant à partir d'une solution de SBF (pour « Simulated Body Fluid », une solution synthétique qui mime la composition ionique du plasma sanguin), cf. **chapitre II**.

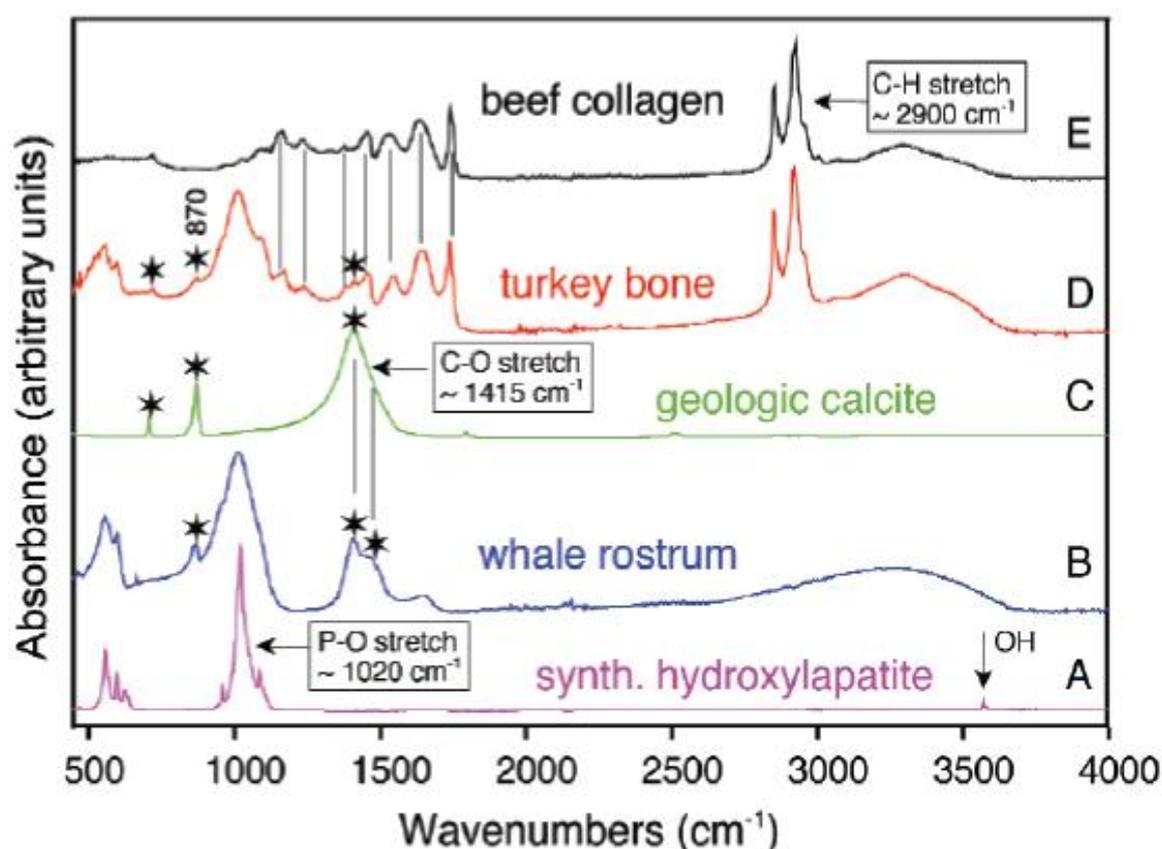


Figure 12. Spectres infrarouge de différents échantillons : (A) Apatite nanométrique de synthèse dont la finesse de la bande d'élongation des espèces PO_4^{3-} à $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$ reflète l'ordre local important ; (B) Os provenant du museau de baleine dont la bande d'élongation des espèces PO_4^{3-} à $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$ est grandement élargie par rapport à celle de l'apatite cristalline de synthèse. Cet élargissement provient notamment du désordre structural causé par l'incorporation d'ions carbonates, incorporation avérée à la vue des bandes d'élongation C-O vers 1415 cm^{-1} . A noter qu'aucun signal provenant du collagène n'est observable confirmant ainsi son très fort taux de minéral ($\sim 96 \%$) ; (C) Calcite géologique permettant de confirmer l'attribution des bandes vers 1415 cm^{-1} aux élongations C-O de l'espèce CO_3^{2-} ; (D) Tendon minéralisé de dinde qui présente à la fois des signaux provenant du collagène (à comparer avec (E)) et des signaux provenant de l'apatite. Image reproduite d'après Pasteris et al. [50].

En ce qui concerne le minéral osseux, les substitutions ioniques y sont très variées : (i) les sites cristallographiques du Ca^{2+} peuvent accueillir des ions Na^+ , Pb^{2+} , Ba^{2+} voire Sr^{2+} ... ; (ii) le site cristallographique des PO_4^{3-} peut quant à lui accueillir des ions HPO_4^{2-} ou CO_3^{2-} ; alors que (iii) celui des OH^- peut accueillir des ions comme Cl^- , F^- , CO_3^{2-} ... Ces substitutions se font donc de manière assez anarchique, sans respecter ni la forme du polyèdre, ni la taille, ni même la charge des espèces initiales qu'elles remplacent. Chacune de ces substitutions sont donc autant de contraintes qui vont s'exercer sur le réseau, lesquelles pouvant ainsi potentiellement modifier l'ordre à courte et à moyenne distance [44]. Cela se reflète en diffraction des rayons X ou bien à l'aide de diverses techniques spectroscopiques (RMN, infrarouge, Raman), où respectivement, les raies de diffraction et les pics de résonances d'une apatite substituée se retrouvent élargies par rapport à celles d'une apatite stœchiométrique (*cf.* **Figure 12**). Des mécanismes sont proposés pour prédire les conséquences de ces substitutions au sein de la structure [57]. Lorsque celles-ci s'effectuent par des ions de charge différente par rapport aux espèces initiales, cela nécessite une compensation locale des charges afin de conserver l'électroneutralité du solide. Ceci peut se traduire par la création d'un ou plusieurs types de lacunes, ou bien par un effet coopératif impliquant la création d'une lacune ainsi que d'une substitution supplémentaire. De plus, des substitutions couplées peuvent également avoir lieu. Ci-dessous sont détaillés quelques exemples de ces mécanismes :

Substitutions par des ions carbonates :

- **Type A** : $\text{OH}^- \blacktriangleright \text{CO}_3^{2-} + \square(\text{OH}^-)$
- **Type B** : $\text{PO}_4^{3-} \blacktriangleright \text{CO}_3^{2-} + \square(\text{Ca}^{2+}) + \square(\text{OH}^-)$
 $\text{PO}_4^{3-} \blacktriangleright \text{CO}_3^{2-} + \square(\text{Ca}^{2+}) + \text{Na}^+$
- **Type A/B** : $\text{PO}_4^{3-} + \text{OH}^- \blacktriangleright 2\text{CO}_3^{2-}$ (*i.e.* un CO_3^{2-} en site A + un CO_3^{2-} en site B)

Substitutions par des ions hydrogénophosphates :

- $\text{PO}_4^{3-} \blacktriangleright \text{HPO}_4^{2-} + \square(\text{OH}^-) + \square(\text{Ca}^{2+})$

Il est à noter qu'aucune lacune du site occupé par les ions PO_4^{3-} n'a jamais été mise en évidence. L'occupation de ces sites, lesquels composent en quelque sorte le squelette du réseau, semble donc primordiale afin s'assurer la stabilité de la structure [57].

I-3-4) Composition chimique

Toutes ces substitutions font qu'il est difficile de donner une formule chimique intrinsèque précise de l'apatite osseuse. C'est de toute manière totalement antinomique avec le fait que l'os est un organe vivant. La composition du minéral varie en fonction des espèces, de leur âge, de leur régime alimentaire, et également de la localisation de la pièce osseuse considérée. Pour un individu donné, la composition de l'apatite osseuse peut être également hétérogène au sein même d'une unique pièce osseuse. En effet, la composition du minéral dépend de l'activité métabolique de l'individu, qui elle-même répond parfois à des impératifs très locaux, comme la réparation d'une microfracture ou bien la présence d'une inflammation bactérienne par exemple. De plus, il faut aussi considérer l'âge du cristal lui-même, qui n'aura pas la même composition s'il vient tout juste d'être généré par le tissu ou bien alors s'il s'agit d'un cristal mature [61]. Les conséquences engendrées par le vieillissement des cristaux d'apatite osseuse seront précisées ultérieurement (*cf.* I-4-6). Néanmoins, il est possible de donner des compositions chimiques moyennes obtenues par analyse chimique élémentaire. De telles compositions sont récapitulées au sein du **Tableau 3** pour les trois types de tissus minéralisés humain : c'est-à-dire l'os, la dentine et l'émail. Il apparaît clairement d'après ces résultats que, les apatites biologiques ont des compositions variables en fonction du tissu dans lequel elles sont incorporées.

Elément (% massique)	Os	Dentine	Email	Apatite stœchiométrique
Ca	34,80	35,10	36,50	39,60
P	15,20	16,90	17,70	18,50
Na	0,90	0,60	0,50	-
Mg	0,72	1,23	0,44	-
K	0,03	0,05	0,08	-
C inorganique	1,48	1,12	0,7	-
F	0,03	0,06	0,01	-
Cl	0,13	0,01	0,30	-

Tableau 3. Compositions chimiques moyennes en pourcentage massique de l'os, de la dentine et de l'émail humain (individu d'un âge indéterminé), ainsi que d'une apatite stœchiométrique de synthèse ; le tout obtenu par analyse chimique élémentaire. Tableau reproduit d'après Dorozhkin [62].

La différence la plus notable est celle qui concerne la substitution en ions carbonates, laquelle est très importante dans l'os (jusqu'à 8 % en masse), alors qu'elle est beaucoup moindre dans l'émail (de l'ordre de 3 % massique). Les autres types de substitution

sont également concernés et se retrouvent également à des taux inférieurs au sein de l'émail. Le faible taux de substitution au sein de l'émail comparé à celui important au sein de l'os, induit des différences notables concernant leurs structures cristallines ainsi que leurs réactivités respectives au sein de leurs tissus.

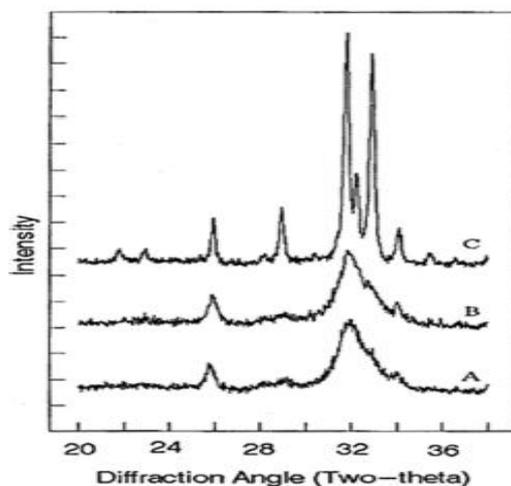


Figure 13. Diffractogrammes de rayons X obtenus avec la raie $K\alpha_1$ du Cu de : (A) une apatite osseuse ; (B) une apatite de la dentine ; (C) une apatite de l'émail. Les raies de diffraction de l'apatite de l'émail sont fines et bien définies, alors que celles de l'apatite de l'os et de la dentine sont élargies. Image reproduite d'après LeGeros [36].

Leurs réponses respectives en diffraction des rayons X illustrent ces différences. En effet, le diffractogramme de rayons X du minéral osseux possède des raies de diffraction élargies par rapport à celles du minéral de l'émail (*cf.* **Figure 13**). Cependant, le désordre engendré par les substitutions n'est pas la seule raison expliquant ce fort élargissement des raies. En effet, il y a également un effet dû à la taille des cristallites : alors que les cristaux de l'apatite osseuse sont de très petite taille (d'une épaisseur allant de 1,5 à 4 nm et d'une longueur de ~30 à ~50 nm) ; ceux de l'apatite de l'émail sont bien plus conséquents (pouvant atteindre environ 2 μm de longueur).

Les formules brutes moyennes du minéral de l'émail et de l'os bovin proposées par Legros et al. dès 1987 [63] sont encore souvent reprises dans la littérature :

Email :



Os :



Ces formules ont été établies en négligeant les substitutions qui sont mineures en nombre, telles que celles par les ions sodium et magnésium par exemple. Néanmoins, on se rend compte à nouveau que le minéral de l'émail est moins substitué que le minéral osseux. Les substitutions principales du minéral osseux sont celles en ions carbonates et hydrogénophosphates. Il est proposé que, afin d'assurer l'électroneutralité du solide, ces substitutions engendrent la présence de nombreuses lacunes de calcium et d'hydroxyle. C'est pourquoi l'apatite osseuse est considérée comme une apatite carbonatée déficiente en calcium et en hydroxyle. Une telle composition est en accord avec le ratio Ca/P d'apatites osseuses mesuré dans la littérature (soit entre 1,3 et 1,6), valeurs sensiblement inférieures à celle de 1,67 d'une apatite stœchiométrique.

Par ailleurs, il se trouve que le minéral osseux est tellement déficitaire en hydroxyle, qu'une controverse importante a eu lieu durant plusieurs années quant à leur réelle présence ou non au sein de la structure [64]. Ceci vient du fait que leur présence n'est pas détectable sur un échantillon d'os frais ou déprotéiné, et ceci ni par spectroscopie infrarouge [64] et Raman [65], ni par RMN du ^1H simple impulsion [64] ; alors qu'elle l'est aisément dans les mêmes conditions dans le cas d'une apatite stœchiométrique. La détection de ces hydroxyles dans l'os a finalement été rendue possible grâce à l'utilisation d'une technique RMN ^1H - ^{31}P bidimensionnelle [66], [67], dont nous reparlerons dans le **chapitre II**. De plus, cette déficience en ions OH^- a pu être estimée. Il a ainsi été montré que les ions OH^- n'occupaient leur site cristallographique que seulement dans 20% des cas au sein d'une apatite osseuse [66].

Au final, le caractère lacunaire important de l'apatite osseuse est connu pour accroître sa solubilité [36], lui permettant ainsi d'assurer plus aisément ses fonctions métaboliques. Ceci est tout le contraire de l'apatite de l'émail, connue pour être une apatite plus proche de la stœchiométrie, qui a besoin d'être le moins soluble possible pour faire face aux attaques acides des aliments ou des bactéries [57]. A noter également que la taille nanométrique des cristaux de l'apatite osseuse ($\sim 1,5\text{-}4 \times \sim 10\text{-}20 \times \sim 30\text{-}50 \text{ nm}^3$) leur confère une très grande surface spécifique, ce qui va de pair avec leur vitesse de dissolution rapide [50], permettant ainsi d'assurer le remodelage du tissu. A l'inverse, l'apatite de l'émail composée de cristaux de taille micrométrique et de faible surface spécifique, n'est jamais remodelée par l'organisme [50]. Tout ceci met en exergue la forte adaptabilité de l'apatite afin de répondre au mieux à ses fonctions biologiques.

I-4 / Biominéralisation osseuse

La biominéralisation est le processus par lequel un organisme vivant va induire la formation d'un minéral. Néanmoins, même si cela a été un sujet d'étude majeur depuis de nombreuses années, toute la lumière n'a pas encore été faite sur les mécanismes de biominéralisation du tissu osseux. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il n'est jamais aisé de caractériser des objets de taille nanométrique tels que les cristaux d'apatite, et ceci était encore plus vrai par le passé sans les techniques plus performantes dont nous disposons aujourd'hui. Ensuite, lors de sa croissance, le minéral est imbriqué de manière très intime du début à la fin du processus avec la matrice organique, ce qui complique fortement son observation et donc l'étude de sa formation et de son organisation 3D. De plus, comme déjà évoqué, la déposition du minéral s'effectue au sein d'un tissu vivant, continuellement synthétisé et résorbé par l'organisme. Il en découle des conséquences importantes, lesquelles sont très bien résumées par la formule de Melvin Glimcher, à savoir que « les propriétés physico-chimiques du minéral sont hétérogènes dans le temps et l'espace » [2].

I-4-1) Morphologie des cristaux du minéral osseux

La morphologie des cristaux d'apatite osseuse, sous forme de plaquettes, peut être observée directement sur un échantillon d'os brut à partir d'un cliché de MEB (*cf.* **Figure 14**, correspondant à la surface fracturée d'un os cortical de babouin [68]).

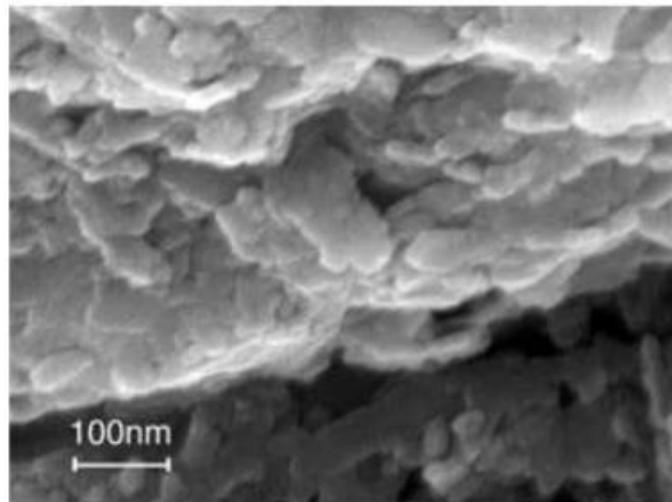


Figure 14. Cliché de MEB d'une surface fracturée d'un os cortical de babouin, laissant apparaître la morphologie plaquettaire adoptée par les cristaux d'apatite osseuse, lesquels sont disposés en strates. Image reproduite d'après Reznikov, Shahar, et Weiner [68].

L'autre solution consiste à observer les cristaux isolés par MET, lesquels sont préalablement extraits de leur charpente organique à l'aide d'un traitement chimique (en solution aqueuse de NaOH concentré [69], d'hydrazine [70] ou bien de NaClO [71]), ou thermique (à l'état sec incinéré sous une torche à plasma, cf. **Figure 15** [72]). Ainsi, un cristal isolé d'apatite osseuse se trouve sous la forme d'une plaquette de forme irrégulière et de taille nanométrique, ici ~15 nm de largeur et ~30 nm de longueur pour les plus grandes (pour un os de bovin adulte). Par ailleurs, toujours pour un os cortical de bovin adulte, une étude poussée par AFM (« Atomic Force Microscopy »), a montré qu'approximativement 98% des plaquettes d'apatite osseuse avaient une épaisseur inférieure à 2 nm (jusqu'à une valeur minimale de $\sim 0,6 \pm 0,2$ nm, soit une maille cristalline) [73] ; mais une potentielle altération de ces dernières durant leur extraction est difficile à exclure.

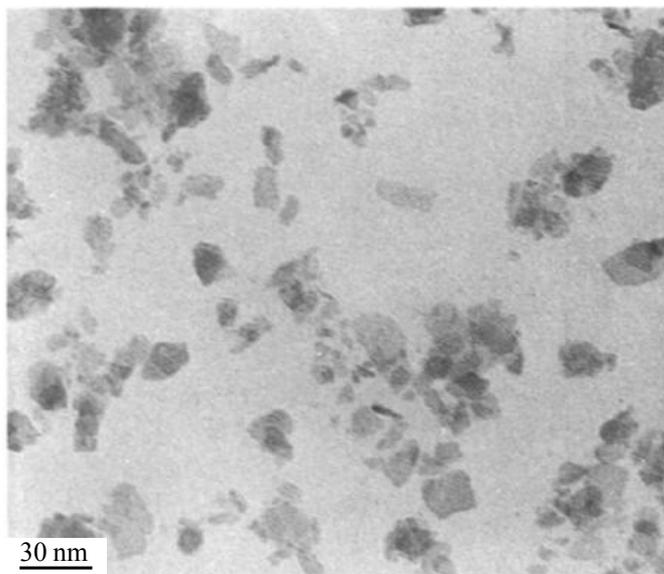


Figure 15. Cliché MET de cristaux isolés provenant d'un os cortical de bovin, où la matière organique fut totalement dégradée suite à son incinération sous une lampe à plasma. Image reproduite d'après Kim, Rey et Glimcher [72].

Il est à noter qu'une telle morphologie plaquettaire est inattendue, puisque les synthèses *in vitro* conduisent généralement en une morphologie sous forme d'aiguilles ou de bâtonnets. De la même manière, la cristallographie prédit que la morphologie adoptée par les cristallites soit sous la forme de bâtonnets. En effet, l'apatite osseuse cristallise selon une maille hexagonale (groupe d'espace $P6_3/m$, cf. **Figure 11**), où les directions (h00) et (0k0) sont strictement équivalentes, ce qui est défavorable à une croissance cristalline sous la forme de plaquettes.

I-4-2) Déposition au sein de la MEC & Organisation 3D du minéral osseux

I-4-2-a) Nucléation homogène au sein des vésicules matricielles

L'un des objectifs majeurs des études portant sur la biominéralisation osseuse est de comprendre où et comment se déroule la déposition du minéral (ou calcification) au sein de la MEC ; alors que dans le même temps, aucun minéral ne se dépose au sein des tissus non-minéralisés (à l'exception des calcifications pathologiques). Cette question se pose à juste titre car les tissus minéralisés (os, dent...) et les tissus non-minéralisés (le tissu pulmonaire par exemple) sont tous baignés par le même fluide extracellulaire [2], lequel est sursaturé à l'égard de nombreuses phases cristallines dont l'hydroxyapatite [6].

Les premières hypothèses émises à partir des années 1920-1930 afin de décrire la déposition du minéral osseux, se sont orientées vers une possible activité cellulaire propre au tissu osseux *via* les ostéoblastes [74]. Plus précisément, il fut proposé que la nucléation de l'apatite se produit à l'intérieur de vésicules extracellulaires (appelées vésicules matricielles) provenant de la membrane plasmique externe des ostéoblastes [75], [76]. En effet, l'activité biologique à l'intérieur de ces dernières conduit à l'augmentation locale de la concentration en précurseurs ioniques du minéral (Ca^{2+} , PO_4^{3-} ...), qui serait telle qu'elle conduirait en une sursaturation élevée pouvant induire spontanément la nucléation homogène de l'apatite [74]. Dans les faits, dans le cas des phosphates, cette augmentation de la concentration vient de la transformation de phosphates organiques en phosphates inorganiques (résultante de l'hydrolyse d'esters phosphoriques contenus dans le sang sous l'action de certaines enzymes, telle que la phosphatase alcaline [77]–[79]). Dans le cas des ions calcium qui sont principalement extracellulaires, leur acheminement au sein de la vésicule matricielle est supposé être favorisé par des canaux élaborés par des protéines transmembranaires, telles que les annexines [80]. Enfin, suite à l'augmentation de la taille des germes devenus cristaux, les vésicules matricielles vont se dégrader. Ces cristaux seraient ainsi expulsés au sein du fluide extracellulaire, et viendraient finalement se déposer sur la matrice extracellulaire [75].

I-4-2-b) Localisation & Organisation 3D

Dans les années qui suivirent, bien aidées par les progrès réalisés en microscopie, de nouvelles hypothèses virent le jour. En effet, dès les années cinquante, des observations très fines effectuées en MET ont pu être réalisées directement sur des fragments d'os

compact. Ces observations ont permis pour la première fois de localiser les cristaux d'apatite au sein des fibrilles de collagène [81]–[83]. Plus précisément, il s'est avéré qu'ils sont principalement concentrés à l'intérieur des zones de gap et d'overlap le long de l'axe des fibrilles, adoptant ainsi la même répétition périodique d'environ 67 nm que les fibrilles de collagène. En parallèle, des résultats obtenus par diffraction des rayons X ainsi que par diffraction électronique, ont permis de déterminer l'orientation adoptée par les cristaux d'apatite [83]. Il s'est avéré que ces derniers étaient tous coalignés entre eux selon leur axe cristallographique c , ainsi que selon l'axe longitudinal de la fibrille de collagène dans laquelle ils sont incorporés [83] (*cf.* **Figure 16**). Il est ainsi proposé que cette façon qu'ont les plaquettes d'apatite à s'organiser en 3D les unes avec les autres, est une des origines des propriétés mécaniques du tissu osseux, et notamment sa forte résistance aux fractures [84], [85]. **Cette organisation 3D des cristaux d'apatite sera ainsi étudiée en détail lors du chapitre IV de ce manuscrit, à l'aide d'observations par cryo-MET, ainsi que par des analyses WAXD (pour « Wide-angle X-ray Diffraction »).**

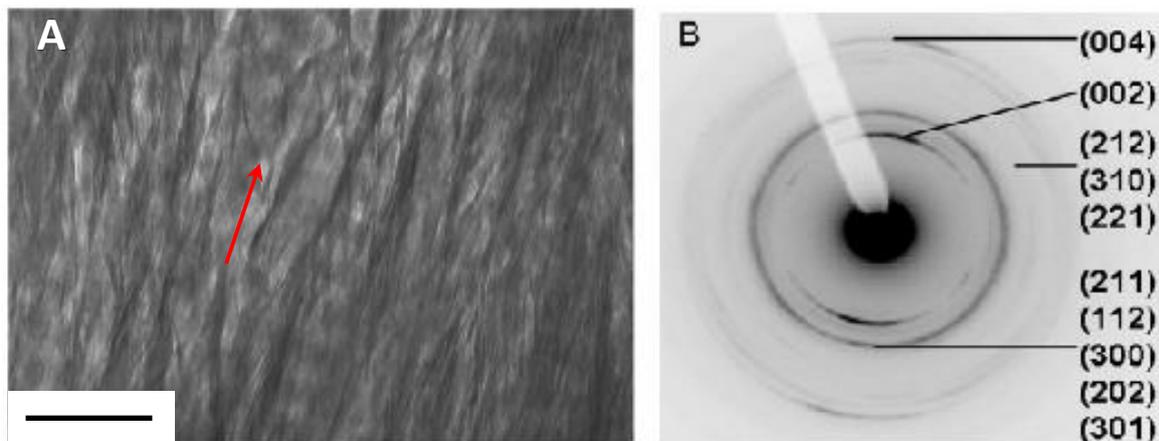


Figure 16. (A) Cliché obtenu par microscopie à champ lumineux d'un échantillon d'os de fémur humain (coupe parallèle à l'axe long du fémur) ; la flèche rouge indique l'orientation des fibrilles de collagène. Les zones plus contrastées correspondent aux cristaux d'apatite, et les striations périodiques correspondent aux zones de gap et d'overlap. (B) Cliché de diffraction électronique de la zone observée en (A), dont le renforcement des plans (002) et (004) indiquent le coalignement des cristaux d'apatite le long de leur axe cristallographique c , ainsi que selon l'axe longitudinal des fibrilles de collagène. Echelle égale à 200 nm. Image reproduite d'après Arsenault et al. [86].

I-4-2-c) Nucléation hétérogène au sein des fibrilles de collagène

Suite aux observations des cristaux d'apatite au sein même des fibrilles de collagène, l'hypothèse d'un mécanisme par nucléation hétérogène a ainsi été proposé

[87] ; ceci donc au détriment d'un mécanisme par nucléation homogène au sein des vésicules matricielles envisagé auparavant. Melvin Glimcher définit la nucléation hétérogène comme étant : « l'induction d'une phase solide à partir d'une solution métastable à la surface d'autres phases solides, dont la structure interatomique reflète étroitement celle de la phase solide qui vient d'être nucléée » [2]. Dans ce cas de figure, un ou plusieurs résidus peptidiques au sein des fibrilles de collagène servirait comme template vis-à-vis des précurseurs ioniques en solution, permettant d'initier la nucléation puis la croissance du minéral au sein même des fibrilles [31].

Afin de vérifier cette hypothèse de nucléation hétérogène au sein des fibrilles, de nombreuses études de minéralisation *in vitro* de fibrilles ont été réalisées [74], [83]. Ces fibrilles proviennent dès lors de tissus animaux non-minéralisés (comme les tendons), ou bien minéralisés mais décalcifiés au préalable, lesquelles ont toutes été purifiées dans le but d'en extraire toutes les protéines non-collagéniques ainsi que les cellules (permettant ainsi de déceler seulement l'impact du collagène). On obtient de cette façon ce que l'on appelle des fibrilles de collagène natives. Ainsi, une fois baignées dans une solution métastable sursaturée à l'égard de l'apatite (avec des concentrations en précurseurs ioniques similaires à celles rencontrées *in vivo*), il a été proposé par le passé que de telles fibrilles natives étaient capables à elles seules d'initier la nucléation hétérogène de l'apatite [83], [87]. Cependant, des études plus récentes tendent à montrer le contraire [88].

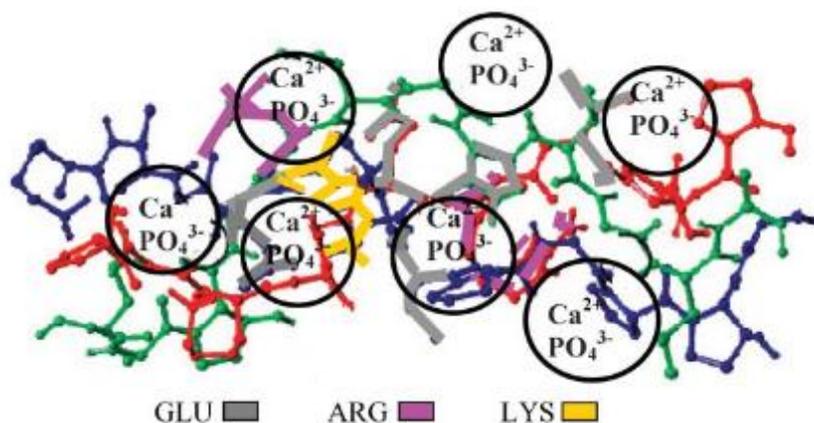


Figure 17. Modèle moléculaire des régions C-terminales et N-terminales des molécules de collagène au sein des zones de gap. Ce modèle révèle la présence de certains résidus d'acides aminés tels que : GLU (le glutamate), ARG (l'arginine) et LYS (la lysine). Les chaînes latérales de la lysine et de l'arginine sont chargées positivement et sont ainsi capables de fixer dans leur voisinage des anions orthophosphates par le biais d'interactions coulombiennes. Les chaînes latérales des résidus glutamate chargés négativement vont au contraire plutôt fixer des cations calcium. Image reproduite d'après Landis [31].

Quoi qu'il en soit, des observations par microscopie électronique [89], [90], ainsi que des études par diffraction des rayons X et diffraction des neutrons [91], [92], ont montré que la déposition initiale des germes d'apatite se faisait en des endroits bien précis le long de l'axe longitudinal des fibrilles, et plus précisément au sein des zones de gap [93], [94]. Ces zones de gap, qui sont limitrophes à la fois aux régions C-terminales et N-terminales des molécules de collagène, seraient ainsi un site privilégié pour la nucléation de l'apatite. De plus, d'après Melvin Glimcher, ce site serait « favorable en terme de volume, de structure, de composition chimique, et voire même de distribution de charges électriques provenant de résidus d'acides aminés spécifiques » afin d'initier la nucléation hétérogène des germes d'apatite [74]. Dans ce sens, des modèles moléculaires de ces régions C-terminales et N-terminales du collagène ont été proposés, et ont montré la présence de certains résidus d'acides aminés tels le glutamate, l'arginine et la lysine [31] (*cf.* **Figure 17**).

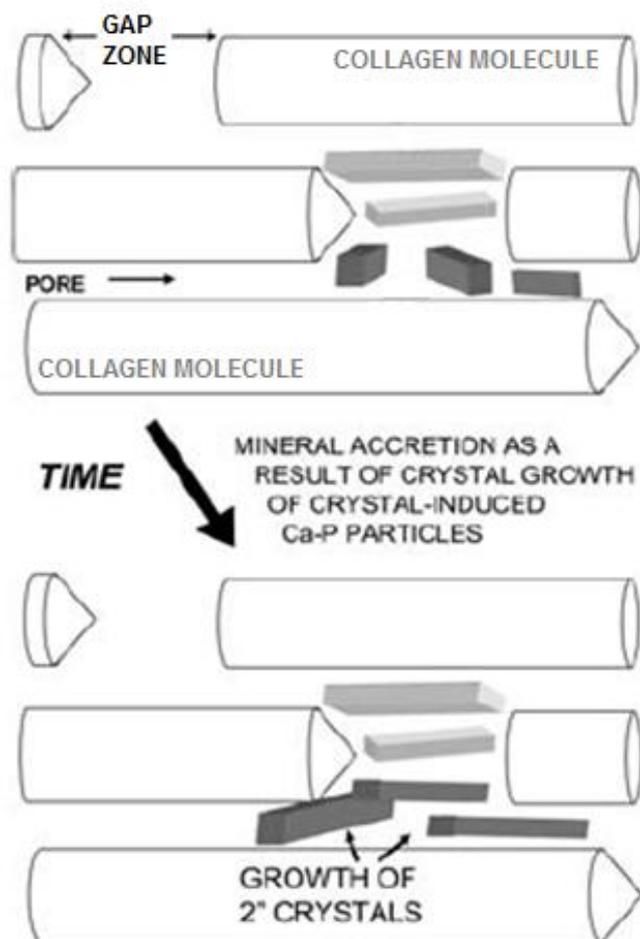


Figure 18. Schéma du mécanisme de la minéralisation de fibrilles de collagène : avec premièrement la déposition de cristaux d'apatite au sein des zones de gap ; puis ensuite leur expansion au sein des espaces intermoléculaires entre les fibrilles de collagène (zones d'overlap). Image reproduite d'après Glimcher [83].

Ces résidus d'acides aminés sont connus pour être théoriquement capable de fixer des ions calcium et orthophosphates dans leur voisinage [31], et servir ainsi de template pour la nucléation future de l'apatite. Une fois nucléée, cette apatite va croître jusqu'à former des cristaux qui vont remplir tout l'espace disponible au sein des zones de gap (d'un diamètre de ~2 à ~6 nm), lesquels vont ainsi s'étendre légèrement pour s'en accommoder [95]. Une fois ceci accompli, la minéralisation continue et des cristaux vont venir se déposer au sein des espaces intermoléculaires entre les fibrilles de collagène [83], correspondant aux zones d'overlap (*cf.* **Figure 18**). Ces zones d'overlap sont parfois aussi appelées « pore zone » [96], [97], et auraient un diamètre d'environ 0,6 nm [98]. **C'est durant ces étapes de croissance que s'effectuerait la propagation ordonnée des cristaux** (avec leurs larges faces (100) parallèles les unes aux autres, et leurs axes cristallographiques *c* parallèles à l'axe longitudinal des fibrilles, *cf.* **Figure 18**); **mais la nature et les fonctions des composés qui la gouvernent restent une question fondamentale de la biominéralisation osseuse.**

La théorie de nucléation hétérogène du minéral sur des sites particuliers au sein des fibrilles de collagène est néanmoins sujette à questionnement. En effet, cela n'explique pas le fait qu'aucune déposition de minéral n'est observée au sein d'autres tissus, pourtant également composés de fibrilles de collagène de type I (comme les tendons, à l'exception de certains tendons minéralisés chez la dinde [92]). De son côté, la théorie de la nucléation homogène à l'intérieur de vésicules matricielles provenant des ostéoblastes, paraît antagoniste avec une déposition du minéral au sein des fibrilles de collagène. En effet, les vésicules matricielles et les fibrilles de collagène sont deux entités qui sont spatialement séparées l'une de l'autre. De plus, un mécanisme de nucléation homogène aurait *a priori* tendance à entraîner une apparition des germes de façon aléatoire au sein de la MEC, et non périodiquement en des endroits bien précis au sein des zones de gap des fibrilles de collagène.

Ce paradoxe peut tout d'abord s'expliquer par le fait que l'arrangement tridimensionnel particulier des fibrilles de collagène (selon le modèle de Hodge et Petruska), aurait également son importance lors de la nucléation des germes d'apatite [30]. En effet, même si cet arrangement conduit à la création des zones de gap où la présence de certains résidus d'acides aminés rend théoriquement possible la nucléation de l'apatite, il y aurait également une contrainte stérique à prendre en compte. Il a ainsi été montré que l'espace intermoléculaire (ou pore) entre les fibrilles de collagène au sein de tendons de queue de rat était plus étroit que celui de l'os. Cet espace serait tellement étroit que cela empêcherait

l'acheminement des ions orthophosphate jusqu'aux zones de gap, inhibant de cette manière toute déposition de minéral [96], [98].

I-4-3) Rôles des protéines non-collagéniques

Il faut cependant rappeler que le tissu osseux n'est pas seulement composé d'une composante minérale de cristaux d'apatite et d'une charpente organique de fibrilles de collagène. En effet, environ deux-cents macromolécules appelées protéines non-collagéniques (PNCs) sont également présentes au sein de la MEC [11].

Il se trouve par ailleurs que la présence de ces PNCs est intrinsèque aux tissus osseux puisqu'elles sont sécrétées spécifiquement par les ostéoblastes ; bien que certaines d'entre elles se retrouvent également chez d'autres tissus minéralisés, telle la DMP-1 (pour Dentin Matrix Protein-1) que l'on retrouve également au sein la dentine par exemple [99]. Au fil des années, le séquençage de plusieurs de ces PNCs a décelé la présence d'une grande diversité de résidus d'acides aminés [8] : sérine, phosphosérine, thréonine, phosphothréonine, arginine, lysine, acide glutamique, acide aspartique... De nombreuses études tendent à montrer que les fonctions chimiques qui se trouvent sur les chaînes latérales de ces résidus, sont capables d'interagir de façon spécifique avec : *(i)* les composés de la MEC (fibrilles de collagène et cristaux d'apatite) ; *(ii)* les cellules osseuses ; ainsi que *(iii)* les précurseurs ioniques en solution (Ca^{2+} , HPO_4^{2-} ...). Ces PNCs sont donc au contact de tous les acteurs de la minéralisation osseuse, et sont ainsi fort logiquement suspectées de jouer un rôle majeur à chaque étape de l'ostéogénèse, incluant : *(i)* la déposition du minéral (à savoir la nucléation et la croissance) ; *(ii)* le contrôle de la morphologie des cristaux ; *(iii)* l'inhibition de la croissance du minéral ; et enfin *(iv)* le coalignement des cristaux [8], [9]. La biochimie de ces PNCs est d'une incroyable complexité et touche ainsi de nombreux aspects. Elle est dès lors très difficile à décrire dans son ensemble. C'est pourquoi, dans ce manuscrit, seulement quelques exemples ont été rapportés afin de décrire succinctement les rôles de quelques unes de ces PCNs lors du processus de biominéralisation.

Le rôle de certaines PNCs est schématiquement représenté au sein de la **Figure 19**, d'après le mécanisme de minéralisation proposé par Anne George et Arthur Veis [8]. Tout d'abord, certaines PNCs synthétisées par les ostéoblastes en même temps que le tissu ostéoïde vont venir se fixer sur ce dernier, comme par exemple : la BSP (pour Bone SialoProtein) ; la DMP-1 (pour Dentin Matrix Protein-1) ; ou encore l'OPN (pour ostéopontine) [100], [101].

Cette fixation s'effectue spécifiquement au sein des zones de gap du collagène, et serait, par exemple, gouvernée par des forces électrostatiques dans le cas de DMP-1 [102], [103]. La BSP, la DMP-1 et l'OPN font toutes trois partie de la famille des glycoprotéines, et plus particulièrement partie de la sous famille des SIBLINGs (pour Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins).

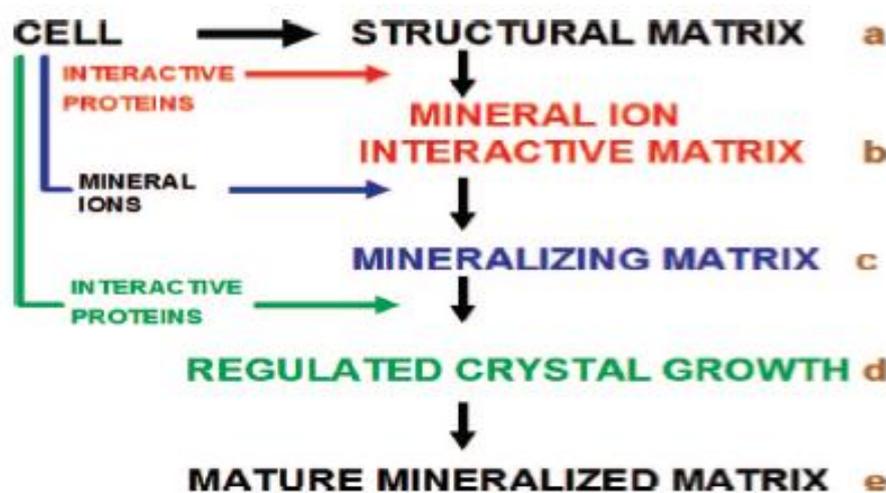


Figure 19. Mécanismes de minéralisation du tissu osseux impliquant certaines protéines non-collagéniques (PNCs) : (a) « Activation » de la matrice organique de collagène suite à l'adhésion de PNCs à sa surface ; (b) Accumulation des précurseurs ioniques sur ces PNCs ; (c) Nucléation hétérogène puis croissance du minéral conduisant à la minéralisation de la matrice organique de collagène ; (d) Addition de nouvelles PNCs responsables de la régulation de la taille et de la forme des cristaux, afin d'obtenir une matrice de collagène minéralisée mature (e). Image reproduite d'après Veis et George [8]

Ces SIBLINGs possèdent notamment le point commun d'avoir une composition riche en résidus chargés négativement (tels des résidus glutamate et aspartate, constituant environ 30 à 36 % du nombre total de résidus à eux deux [10]), et riche en résidus de phosphosérine (ce dernier provenant de la phosphorylation post-traductionnelle de la sérine) [8]. Il se trouve qu'il existe une forte affinité des fonctions carboxylates (provenant des résidus glutamate et aspartate) ainsi que des groupements phosphates (provenant des résidus phosphosérine) envers les ions calcium [74], [104]–[107]. Par ailleurs, certaines études menées *in vitro* tendent à montrer qu'une augmentation modérée de la concentration de ces SIBLINGs entraînait une accélération de la vitesse de nucléation des cristaux d'apatite [108]. Tous ces indices accréditent clairement l'hypothèse que ces SIBLINGs peuvent promouvoir la nucléation hétérogène de l'apatite (en utilisant des concentrations en précurseurs ioniques similaires à celles rencontrées *in vivo*).

Afin de décrire ces phénomènes, deux modèles de mécanismes sont décrits au sein de la **Figure 20**. Les SIBLINGs sont donc suspectées d'interagir avec les cations métalliques en solution, et principalement le calcium *via* leurs chaînes latérales anioniques. La concentration de ces cations métalliques est donc accrue localement au voisinage des SIBLINGs, ce qui conduirait à la nucléation puis à la croissance du minéral. Afin de comprendre ce processus, des études *in vitro* sont menées, où les SIBLINGs sont souvent remplacées par des polyélectrolytes modèles de synthèse (lesquels sont également riches en résidus acides tel l'acide polyaspartique). Il est proposé que l'association des ions calcium avec les chaînes chargées de ces polyélectrolytes forme un intermédiaire réactionnel appelé PILP (pour Polymer-Induced Liquid Precursor) [109]–[111]. Ce PILP permettrait tout d'abord la complexation des précurseurs ioniques. Puis, étant donné son caractère liquide, il permettrait l'acheminement des ions ainsi formés au sein des zones de gap et d'overlap des fibrilles de collagène [111], le tout suivi par la formation d'un précurseur sous forme de particules de minéral amorphe.

Cependant, il est intéressant de remarquer qu'en fonction de sa concentration, une même PNC peut avoir un rôle d'initiateur de la nucléation, ou bien plutôt un rôle d'inhibiteur de la croissance cristalline [22]. Autre fait frappant, une PNC telle la DMP-1 par exemple, est suspectée de posséder différents domaines au sein de sa chaîne polypeptidique. Il est proposé que certains soient initiateurs, alors que d'autres soient plutôt inhibiteurs de la croissance cristalline [112], [113]. Cette poly-fonctionnalité de certaines PNCs explique l'obtention de résultats parfois contradictoires dans la littérature. Au final, l'absence de minéral dans les tissus autres que l'os et la dent peut s'expliquer par la présence en quantité adéquate de PNCs spécifiques. Lesquelles seraient ainsi chargées d'en inhiber totalement la nucléation et la croissance, tels certains protéoglycanes ou bien la MGP (Matrix GLA Protein) par exemple [114], [115]. Une étude particulièrement convaincante allant dans ce sens a été réalisée, et a consisté à implanter des fibrilles de collagène natives au sein d'un tissu physiologiquement non minéralisé. Ces fibrilles de collagène natives, dépourvues de toutes PNCs, ont pu être minéralisées au bout d'environ 2 semaines suite à leur introduction au sein de la peau de lapin [116].

Il est également proposé que certaines PNCs puissent se charger de moduler la morphologie des cristaux d'apatite sous forme de plaquette *via* des interactions sélectives à la surface de cette dernière (*cf.* **Figure 20-C**). En effet, dans la grande majorité des cas, les

synthèses *in vitro* d'apatite, aussi bien avec ou sans adjuvants organiques, conduisent à l'obtention de cristaux sous forme d'aiguilles ou de bâtonnets. De plus, une fois le minéral déposé, sa croissance doit être inhibée afin d'en empêcher une déposition incontrôlée, laquelle deviendrait ainsi potentiellement une calcification pathologique. Là encore, les PNCs sont suspectées de jouer ce rôle d'inhibiteur de croissance cristalline [22], [74]. Dans ce sens, des études *in vitro* ont permis de montrer que certaines PNCs comme l'ostéocalcine et l'ostéopontine inhibent la minéralisation ; alors que d'autres comme la BSP, et la DMP-1 auraient plutôt tendance à augmenter le taux de minéral formé [117]–[121]. Il est parfois aussi proposé que certaines PNCs telle la fétuine, laquelle est trop volumineuse pour s'insérer à l'intérieur des fibrilles de collagène, soit un inhibiteur de croissance extrafibrillaire [122], [123].

Enfin, concernant l'organisation du minéral, il est proposé que si la protéine servant de template ne possède pas une structure tridimensionnelle organisée, alors la nucléation des germes d'apatite, puis leur croissance se ferait de façon aléatoire (*cf.* **Figure 20-A**). Ceci paraît donc antagoniste avec le coalignement entre les cristaux d'apatite observé au sein du tissu osseux. De ce fait, il est proposé que la nucléation des germes d'apatite doive être contrôlée, pour permettre ensuite une propagation ordonnée des cristaux d'apatite selon leur axe cristallographique c (potentiellement par le biais d'un mécanisme de croissances épitaxiales successives, *cf.* **Figure 20-B**). Pour ce faire, il est requis que la protéine template adopte une structure tridimensionnelle régulière et périodique. De telles structures protéiques régulières pourrait premièrement provenir de la façon particulière avec laquelle les protéines template s'immobilisent au sein des zones de gap du collagène [8]. Ensuite, et à titre d'exemple, une protéine telle la DMP-1 est connue pour adopter une structure tridimensionnelle régulière sous forme de feuillets β une fois au contact d'ions calcium [8], [112]. **Jusqu'à présent, seules certaines PNCs ont été proposées comme agent structurant du minéral au sein du tissu osseux afin d'y favoriser le coalignement des cristaux** (telle la DMP-1 [124]).

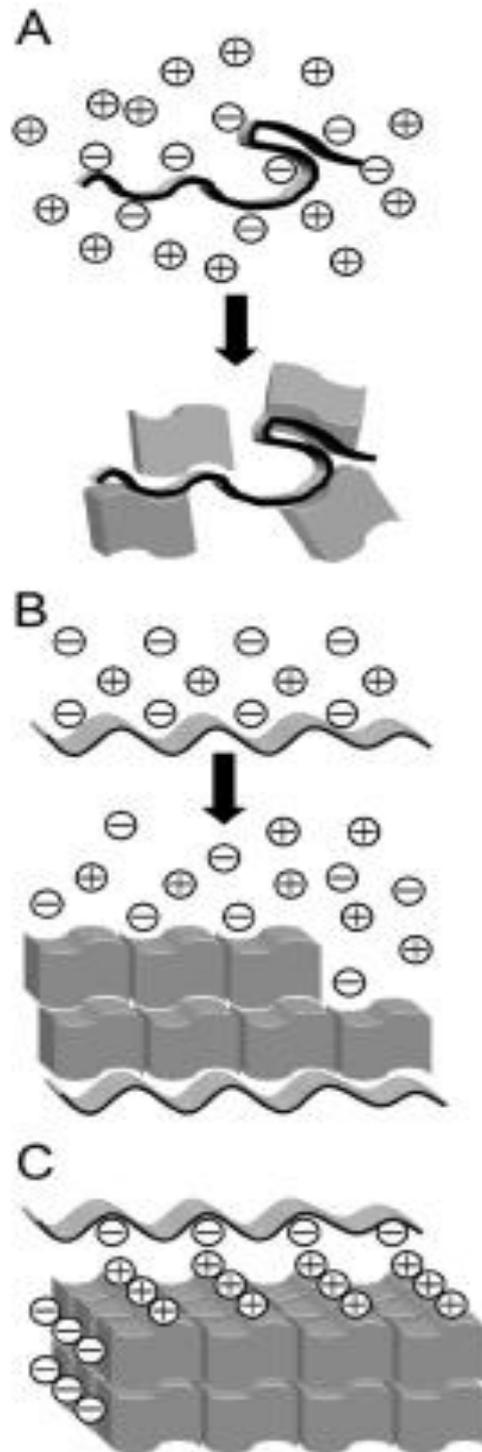


Figure 20. Modèles des mécanismes de la déposition du minéral impliquant des protéines non-collagéniques (PNCs) : (A) Nucléation puis croissance aléatoire du minéral sur une PNC template qui possède une structure tridimensionnelle désordonnée ; (B) Nucléation périodique puis croissance orientée par épitaxie du minéral sur une PNC template qui possède une structure tridimensionnelle ordonnée et périodique ; (C) Interactions sélectives de certaines PNCs à la surface des cristaux en formation afin de moduler leur morphologie finale sous forme de plaquette. Image reproduite d'après Beniash [22].

Néanmoins, lors de travaux antérieurs effectués au laboratoire, il a été observé qu'il était possible d'obtenir des cristaux d'apatite de morphologie plaquettaire (et allongés selon l'axe c) en l'absence d'aditifs organiques, lorsque leur formation est contrôlée par des paramètres thermodynamiques plutôt que cinétiques [69]. La caractérisation structurale et chimique de ces apatites de synthèse, ainsi que leur comparaison avec le minéral osseux, seront détaillées en profondeur au sein des **chapitres II & III**.

De plus, lors d'une thèse effectuée récemment au laboratoire, il a été montré que la croissance confinée de cristaux d'apatite à l'intérieur de fibrilles de collagène peut être réalisée *in vitro* en absence de toute PNC (en utilisant des concentrations en précurseurs ioniques bien plus importantes que celles du fluide extracellulaire) [125]. Par ailleurs, cette croissance confinée conduit alors à une organisation 3D similaire à celle observée dans l'os (où les plaquettes d'apatites sont coalignées entre elles, et où l'axe c des cristaux est coaligné avec l'axe longitudinal des fibrilles de collagène).

Ces résultats questionnent le rôle des PNCs sur le contrôle de la morphologie et de l'organisation 3D des plaquettes d'apatite *in vivo* tout en proposant néanmoins qu'elles concentrent localement au niveau des zones de gap les précurseurs ioniques du minéral afin d'y permettre la nucléation.

I-4-4) Mécanismes de nucléation/croissance du minéral osseux

Le ou les mécanismes de croissance qui permettent aux précurseurs ioniques en solution de s'assembler pour former des cristaux matures d'apatite osseuse sont encore très méconnus. En effet, il n'existe pas de technique permettant d'observer la croissance *in situ* et *in vivo* du minéral. Cependant, plutôt qu'une limitation due à la technique, le fait que le renouvellement osseux des mammifères s'effectue de manière globale sur l'organe, et non pas au sein d'un lieu spécifique résolu spatialement, est l'obstacle majoritaire qui freine la compréhension des phénomènes de formation du minéral. Dans le paragraphe I-4-3, il a été discuté du fait qu'il est communément proposé que la nucléation des premiers germes d'apatite ait lieu à l'aide d'interactions spécifiques avec certaines PNCs *in vivo* (ou avec des polyélectrolytes de synthèse *in vitro*) ; avant une croissance le long de l'axe des fibrilles de collagène, d'abord au sein des zones de gap puis d'overlap des fibrilles de collagène (*cf.* **Figure 21**). Enfin, rappelons également que les travaux de W. Landis ont permis de proposer également de la nucléation extra fibrillaire même si ce n'est pas un consensus dans la littérature [126].

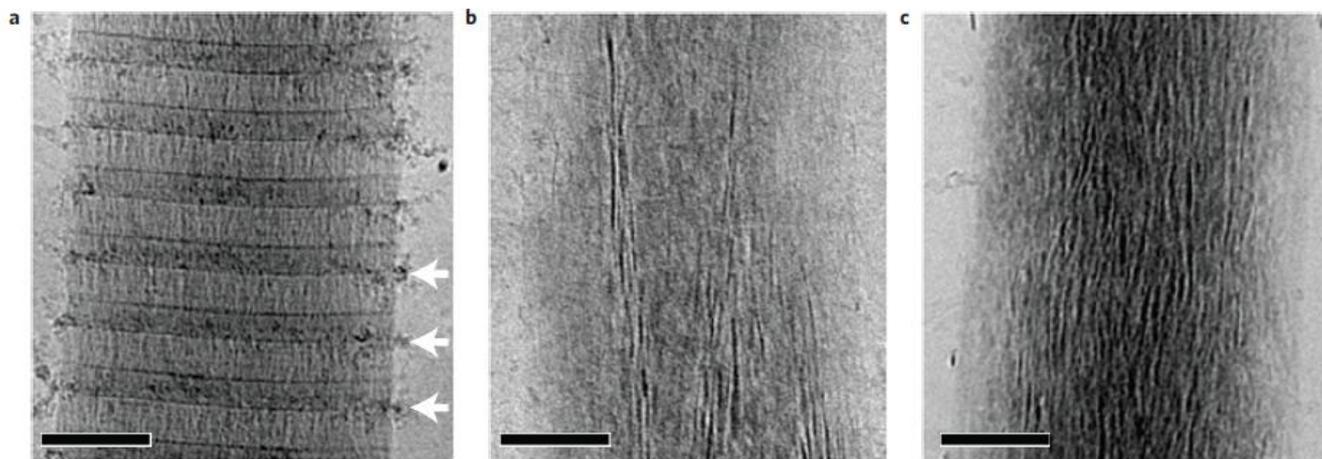


Figure 21. Clichés Cryo-MET d'une fibrille de collagène à différentes étapes de sa minéralisation *in vitro* (en présence d'acide polyaspartique) : **(a)** minéralisé pendant 24 heures ; **(b)** minéralisée pendant 48 heures ; et **(c)** minéralisée pendant 72 heures. Échelle égale à 100 nm. Image reproduite d'après Nudelman et al. [113].

I-4-4-a) Nucléation

Cependant, même si le lieu où se déroule la nucléation semble connu, nul ne connaît avec exactitude le mécanisme de nucléation/croissance précis, et plusieurs modèles existent. Tout d'abord, la nucléation dite « classique », décrit l'assemblage coopératif des précurseurs ioniques pour former un unique cluster de taille critique. C'est sur ce cluster de

taille critique que va nucléer la phase cristalline d'apatite, laquelle va finalement croître *via* un apport ion par ion à sa surface jusqu'à former le cristal mature (cf. **Figure 22-A**) [127].

Cependant, une seconde théorie alternative prédit plutôt la présence de clusters de prénucléation de très petite taille (de l'ordre de 10 Å) ; c'est à dire des clusters stables qui existent en solution avant l'étape de nucléation (cf. **Figure 22-B**) [127]. Dans cette théorie, ces clusters de prénucléation s'agrègent les uns avec les autres pour former un nucléus de plus grande taille, nucléus métastable qui possède potentiellement une structure différente de celle de l'apatite. Il est parfois proposé que ces clusters de prénucléation possèdent une structure similaire aux « clusters de Posner ». Ceux-ci correspondraient à des briques sphériques élémentaires de formule $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ et de diamètre d'environ 9,5 Å dont l'agencement tridimensionnel aléatoire formerait les grains des phases de phosphate de calcium amorphe préparation [128], [129]. La question concernant la présence ou non de ces clusters de prénucléation aux prémices de la formation de l'apatite osseuse se pose à juste titre. En effet, leur présence et leur transformation en cristaux d'apatite a été observée très récemment *in vitro* par cryo-MET au sein d'une solution de SBF (pour « Simulated Body Fluid ») [130], [131]. Au final, le premier modèle (nucléation dite « classique ») n'est proposé formellement que seulement *in vitro* dans le cas de la croissance de certains sels simples.

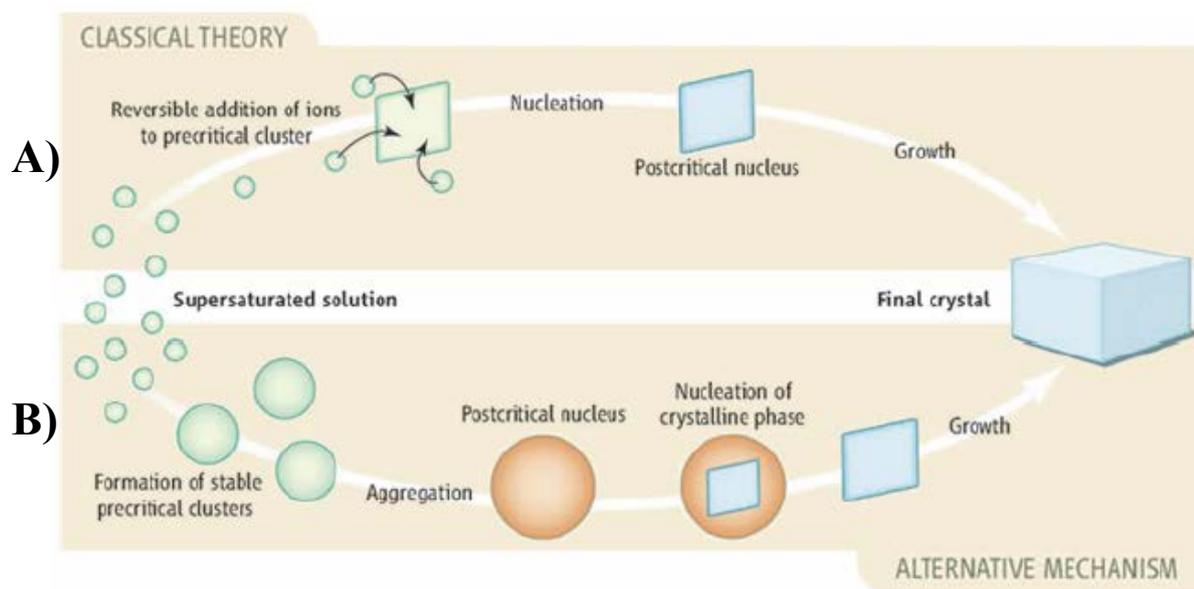


Figure 22. Les deux mécanismes de nucléation du minéral : **A)** la théorie dite « classique » qui prédit l'assemblage coopératif des précurseurs ioniques pour former un unique cluster de taille critique, sur lequel va nucléer la phase cristalline, et dont la croissance est assurée par un apport successif d'ions à sa surface afin de former le cristal final ; **B)** la théorie dite « alternative » qui prédit la présence initiale en solution de clusters de prénucléation stables de très petite taille, dont l'agrégation successive forme un nucléus métastable de plus grande taille, nucléus à partir duquel la croissance cristalline s'initie. Image reproduite d'après Meldrum et Sear [132].

Concernant le tissu osseux, le modèle par l'intermédiaire de clusters de prénucéation est davantage envisagé. De plus, ce dernier prédit la formation de nucléi métastables, et se pose également la question de quelle pourrait être leur structure (cristalline ou amorphe). Formulé autrement, ces nucléi sont-ils des germes d'apatite en croissance, ou bien au contraire des germes d'une phase précurseur intermédiaire qui va se transformer ultérieurement en apatite ?

Cette question se pose de façon légitime, puisque les études sur la croissance *in vitro* de l'apatite ont révélé pléthores de cas de figure où le mécanisme de croissance s'effectuait par le biais de la formation d'une ou plusieurs phases précurseurs, à savoir : (i) du phosphate de calcium amorphe (ACP, de formule de base celle d'un phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, mais contenant également des ions CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} et des molécules d'eau) ; (ii) du phosphate octocalcique (OCP, de formule $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ; et (iii) de la brushite (DCPD, de formule $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [112], [113], [130], [131], [133]–[137]. Les formations coordonnées de ces phases précurseurs métastables permettraient d'abaisser graduellement l'énergie de Gibbs, et ainsi de favoriser finalement la formation de la phase thermodynamiquement la plus stable qu'est l'apatite [138]. La présence de ces mêmes phases précurseurs (ACP, OCP et DCPD) a également été proposée *in vivo*, mais de façon beaucoup plus sporadique du fait des limitations liées à la complexité accrue de l'étude du vivant. Ainsi, l'ACP a été proposé comme phase précurseur de l'apatite lors de la minéralisation : (i) des arêtes de la nageoire caudale chez les poissons zèbres [54], [55] ; (ii) de la dentine chez la souris [139] ; (iii) du fémur [140] ainsi que du cartilage du tibia [141] chez le rat ; et (iv) de la dent de chiton (*i.e* un petit mollusque) [142]. Une phase précurseur de structure cristalline proche de celle de l'OCP a aussi été proposée lors de la minéralisation des os du crâne chez le rat [143]. Enfin, une phase précurseur sous forme de brushite a été proposée lors de la minéralisation osseuse d'embryons de poussins et de bovins [144]. Par ailleurs, il a été montré que ces phases précurseurs métastables, et notamment l'ACP, pourraient être stabilisées de façon transitoire suite à l'adsorption de certaines PNCs à leur surface [22]. Au final, aucun consensus n'émerge concernant la présence de telle ou telle phase précurseur lors de la minéralisation osseuse, et rien n'indique que le mécanisme de croissance soit identique pour toutes les espèces.

I-4-4-b) Croissance

Il est à noter que certains auteurs proposent que l'observation d'ACP aux prémices de la formation osseuse serait en fait un artefact qui serait causé par la nature très

désordonnée des cristaux d'apatite néoformés [144]. En effet, il a été mis en évidence que les premiers cristaux d'apatite formés au sein d'un embryon de poussin avaient une réponse en diffraction des rayons X voisine de celle d'une phase amorphe (*cf.* **Figure 23-A**) ; et plus l'individu grandit, plus celle-ci va évoluer plus distinctement vers la structure de l'apatite (*cf.* **Figure 23-C**) [74]. Pour expliquer ce phénomène, il est proposé que les cristaux d'apatite osseuse néoformés possèdent des tailles de domaines cristallin très petites et qu'ils soient mal cristallisés car : *(i)* pauvres en ions hydroxyles [65], [145] (avec une quantité potentiellement inférieure à celle de 20 % trouvée dans le cas d'un os cortical d'un humain adulte, quantité calculée par rapport à la quantité attendue au sein d'une apatite stœchiométrique [66]) ; mais surtout *(ii)* riches en environnements chimiques désordonnés très dissemblables de ceux de l'apatite cristallisée [144].

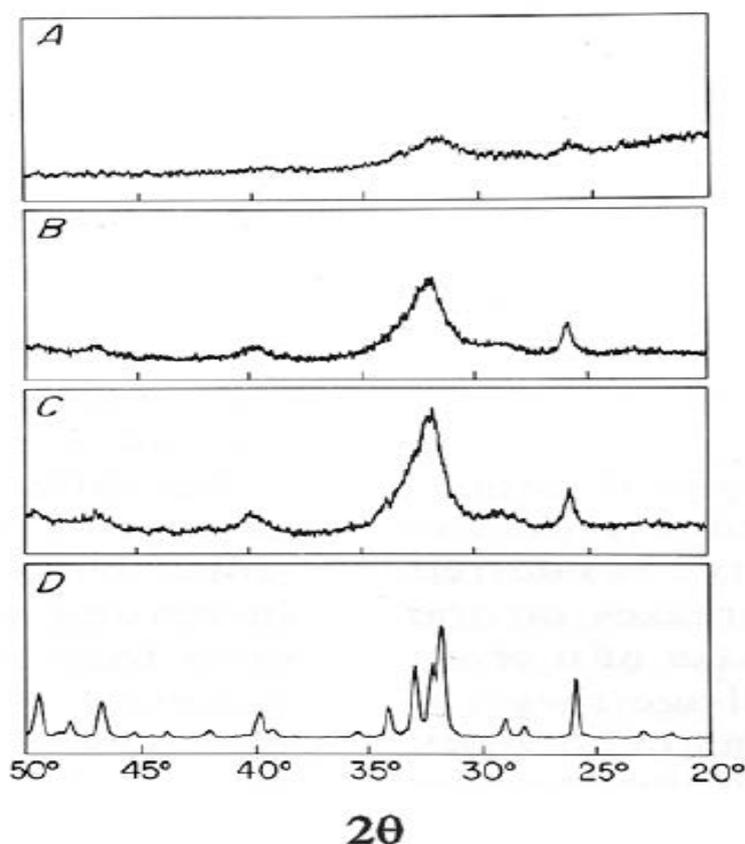


Figure 23. *Diffractogrammes de rayons X avec la raie $K\alpha_1$ du Cu de différents fragments d'os provenant de : (A) un embryon de poussin de 17 jours ; (B) un poussin 5 semaines après son éclosion ; (C) une poule âgée de 2 ans ; ainsi qu'une apatite hautement cristalline de synthèse pour comparaison (D). Ceci montre la maturation des cristaux d'apatite, lesquels possèdent une structure proche d'un amorphe au départ de la calcification, et évoluent vers une apatite de plus en plus cristalline lors du vieillissement de l'individu. Image reproduite d'après Glimcher [74].*

I-4-5) Surface des cristaux d'apatite carbonatée

Il est proposé que ces environnements chimiques désordonnés forment un domaine en surface des cristaux de certaines apatites biologiques (notamment de la dentine de rat [146]), ainsi que certaines apatites carbonatées de synthèse [147], [148]. Ainsi, les modèles de la littérature décrivent les cristaux d'apatites biologiques et biomimétiques comme étant composés deux domaines distincts : (i) le premier dans le cœur de la particule, cristallisé sous forme d'apatite, donc là où sont localisés les ions OH^- et PO_4^{3-} ; et (ii) le second formant une couche désordonnée en surface de la particule, laquelle serait riche en espèces HPO_4^{2-} et en molécules d'eau [61], [149]–[151] (cf. **Figure 24**).

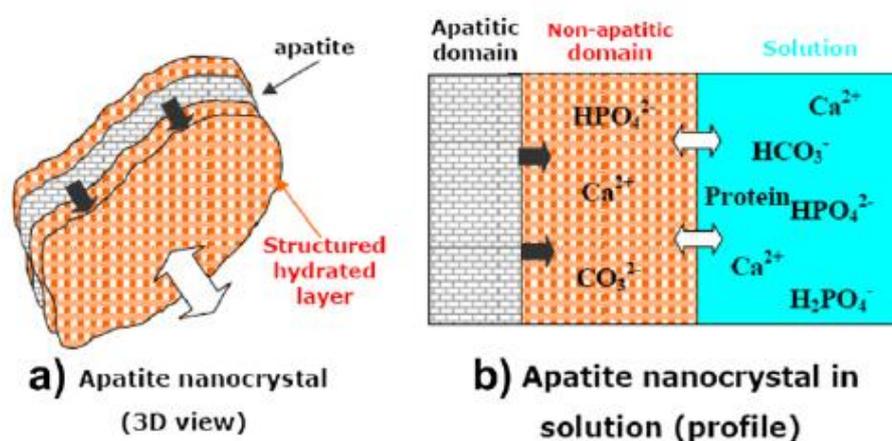


Figure 24. (a) Schéma en trois dimensions d'une apatite osseuse ou biomimétique, qui adopte une morphologie plaquettaire, et qui est composée d'un domaine de cœur cristallisé sous forme d'apatite, et d'un domaine désordonné en surface (ou couche hydratée) ; (b) Schéma du profil en deux dimensions d'une plaquette d'apatite osseuse, mettant en évidence les interactions de la couche de surface désordonnée avec les composés du fluide extracellulaire. Image reproduite d'après Eichert et al. [152].

Il est fait référence à cette couche de surface sous différentes appellations dans la littérature, à savoir : couche désordonnée [147], couche amorphe [146], couche hydratée [150], [151], ou encore environnements/domaine non-apatitique [150]. **Cette appellation de « domaine non-apatitique » est utilisée car ces environnements possèdent une signature spectroscopique (RMN [147] et infrarouge [150], [151]) distincte de celle de l'apatite, dont celle obtenue en RMN sera détaillée en profondeur lors du chapitre II de ce manuscrit.**

Par ailleurs, des études réalisées sur des apatites osseuses [153], ainsi que sur des apatites carbonatées de synthèse [150], [154], [155], ont montré que les ions qui composent ce domaine non-apatitique étaient labiles. Ainsi, étant localisés en surface de la particule et donc accessibles, des échanges ioniques réversibles (si aucun temps de maturation n'est appliqué) avec d'autres espèces ioniques en solution sont possibles : (i) les ions HPO_4^{2-} peuvent être remplacés par des ions CO_3^{2-} , et les ions Ca^{2+} peuvent être remplacés par des ions Mg^{2+} ou Sr^{2+} par exemple [152], [156]. Il est ainsi envisageable de penser que, dans le cas des apatites biologiques, une telle dynamique d'échanges ioniques incessants en surface des cristaux pourrait réguler l'osmolarité ainsi que le pH du fluide extracellulaire.

Cependant, à l'exception de ses capacités d'échanges ioniques, ce domaine non-apatitique est très peu connu, et particulièrement celui des apatites biologiques puisque leur étude est plus délicate. Néanmoins, son rôle ne doit pas être négligé d'autant plus qu'une couche amorphe de surface est également proposé pour d'autres biominéraux comme la nacre où une interface organo-minérale est aussi présente. Les **chapitres II & III** de ce manuscrit seront ainsi consacrés à **l'étude de ce domaine non-apatitique chez une apatite osseuse de brebis, afin notamment de vérifier si cette dernière concorde avec le modèle de la littérature (cf. Figure 24)**. Ensuite, le **chapitre IV** sera consacré à **l'étude d'un rôle totalement original joué par ce domaine non-apatitique *in vivo***.

I-4-6) Phénomène de maturation du minéral osseux

Le phénomène de maturation concerne l'évolution que subit une apatite biologique lors de son vieillissement, laquelle correspond à une diminution de la proportion en environnements chimiques non-apatitiques, et au contraire à une augmentation de la proportion en environnements chimiques cristallisés sous forme d'apatite [150], [151].

Afin de mettre en lumière cette évolution naturelle des apatites biologiques, citons les travaux de Nicolas Vandecandelaere, Christian Rey et Christophe Drouet, qui ont mimé expérimentalement cette évolution en introduisant des apatites carbonatées de synthèse en solution aqueuse entre 20 min et 20 jours [154]. En décomposant, puis en intégrant les spectres infrarouge enregistrés à partir des différents échantillons obtenus, ils se sont rendus compte que : (i) la proportion en ions HPO_4^{2-} (qui composent le domaine non-apatitique désordonné) avait largement tendance à diminuer au cours du temps ; alors que (ii) la

proportion en ions OH^- (qui composent le domaine apatitique) avait au contraire tendance à fortement augmenter (cf. **Figure 25-A**). Par ailleurs, cette diminution progressive du taux d'ions HPO_4^{2-} a également été mise en évidence lors du vieillissement d'apatites osseuses (provenant de fémurs de rats) [63], [140]. Cette tendance rend clairement compte de la transformation progressive du domaine désordonné vers une structure cristalline apatitique plus stable (cf. **Figure 25-B**) ; ce qui pourrait expliquer le gain substantiel de cristallinité des cristaux d'apatite osseuse au cours du temps (cf. **Figure 23**).

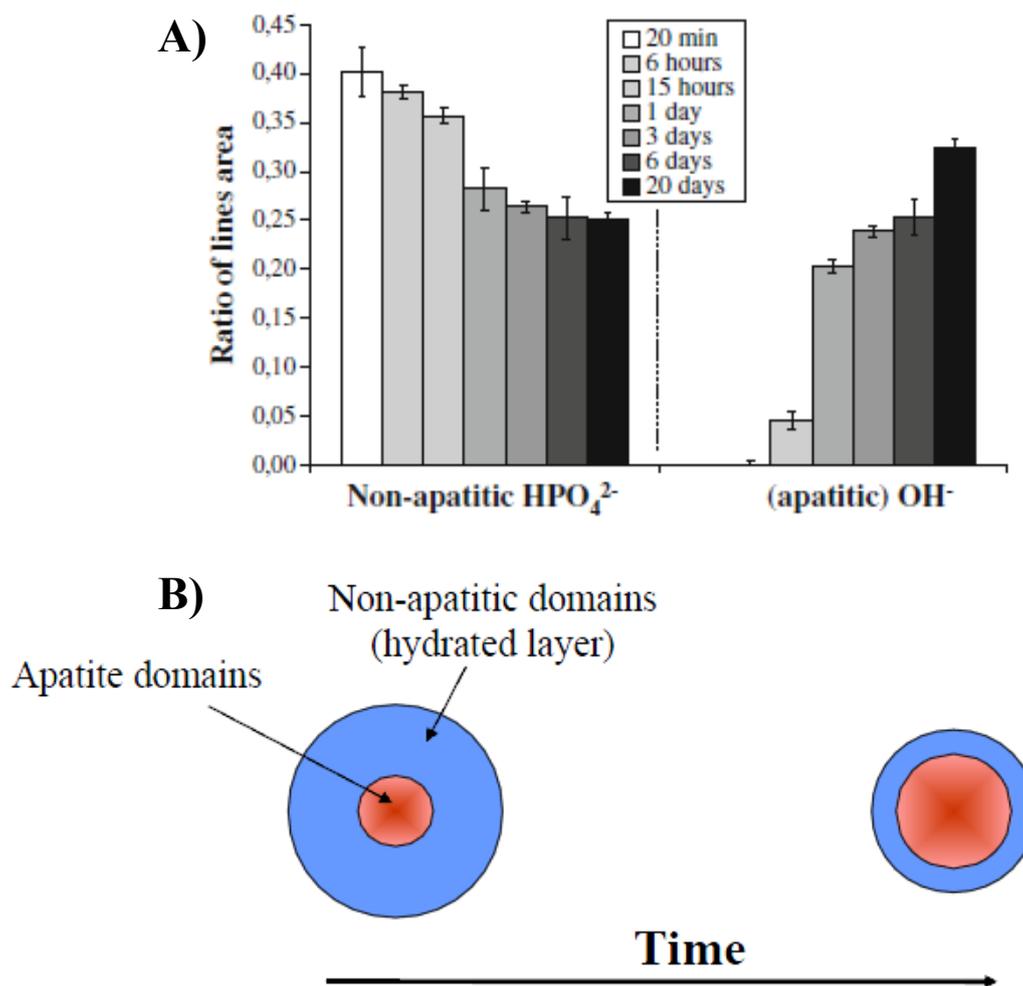


Figure 25. (A) Etude du vieillissement d'une apatite carbonatée de synthèse en fonction de son temps de maturation en solution aqueuse, laquelle révèle : (i) la forte diminution de la proportion du domaine non-apatitique (composé d'ions HPO_4^{2-}) ; et (ii) au contraire la forte augmentation de celle du domaine apatitique (composé d'ions OH^-) ; le tout basé sur une analyse des spectres infrarouge. (B) Schématisation de la maturation des cristaux d'apatite osseuse, qui laisse apparaître la diminution du domaine non-apatitique (bleu) au profit du domaine apatitique (rouge) au cours du temps. Images reproduites d'après Drouet, Rey et Vandecandelaere [154].

De plus, il est proposé que ce phénomène de maturation des cristaux d'apatite osseuse conduise à l'augmentation du taux de carbonate, l'augmentation légère de la taille des cristaux, ainsi qu'à l'augmentation du ratio molaire Ca/P [63]. Or, ce ratio molaire Ca/P est un indicateur très régulièrement employé afin de décrire un échantillon donné (biogénique ou synthétique), afin de le comparer par rapport au ratio idéal provenant des phases de phosphate de calcium connues. Ainsi, ce ratio Ca/P a une valeur de 1,67 pour une apatite stœchiométrique idéale (de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), de 1,33 pour l'OCP (de formule $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), et de 1 pour la brushite (de formule $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). La valeur moyenne rencontrée dans la littérature pour une apatite osseuse se trouve entre 1,3 et 1,6 ; et celle-ci semble progressivement augmenter vers les valeurs hautes lors du vieillissement de l'individu [63], [140], [145].

I-5 / L'eau

L'eau est le troisième constituant du tissu osseux en terme de proportion massique (~9 %), derrière les deux composés majoritaires que sont l'apatite (~64 %) et le collagène (~22 %). De plus, en terme de volume, l'eau atteint un taux encore plus important qui va de 15 à 20 % ; contre un taux de 33 à 43 % pour l'apatite, et de 32 à 44 % pour le collagène [157]. Il est connu que l'arrangement tridimensionnel des fibrilles de collagène, l'association de ces dernières avec le minéral, l'innervation et la vascularisation, conduisent à la création de nombreux pores de tailles variables au sein du tissu osseux [2]. Ainsi, 4 catégories de pores peuvent y être distinguées d'après la classification proposée par Stephen Cowin [158] (dont les 3 premiers apparaissent au sein de la **Figure 26**) :

(i) La « porosité vasculaire » (ou PV), qui correspond à l'espace créé lors de l'excavation des tunnels de Havers et de Volkmann afin de permettre la vascularisation du tissu. Cette porosité correspond au diamètre de ces tunnels (de l'ordre de 40 μm), et est la plus importante en taille au sein de l'os cortical.

(ii) La « porosité lacuno-canaliculaire » (ou PLC), correspond aux espaces lacunaires à l'intérieur de la matrice osseuse minéralisée, où prennent place : (a) les cellules ostéocytes (lesquelles sont des ostéoblastes différenciés) ; ainsi que (b) les fins canalicules creusés par les ostéocytes afin de former des jonctions communicantes. Cette porosité correspond donc au diamètre des canalicules (environ 0.2 μm).

(iii) La « porosité collagène-apatite » (ou PCA), est l'espace très étroit qui existe entre les fibrilles de collagène et les cristaux d'apatite ; porosité la plus petite en taille, soit quelques nanomètres au maximum [158]–[160].

(iv) La « porosité de l'espace intertrabéculaire », correspond aux espaces vacants qui existent au sein de l'os spongieux, provenant de l'arrangement très aléatoire des fibrilles de collagène. Cette porosité peut atteindre une taille élevée, de l'ordre de 1 mm de diamètre.

Les 3 premières catégories de porosités (i), (ii) et (iii) se retrouvent aussi bien au sein de l'os cortical que l'os spongieux, alors que la dernière (iv) est propre à l'os spongieux. Les molécules d'eau provenant du fluide extracellulaire s'infiltrent à l'intérieur de ces pores. Ainsi, l'eau baigne le tissu osseux dans sa globalité puisque les canaux et les canalicules forment un réseau interconnecté. A noter que le fluide à l'intérieur des nerfs et des vaisseaux n'est pas considéré ici, bien qu'il soit échangeable avec le fluide extracellulaire [158].

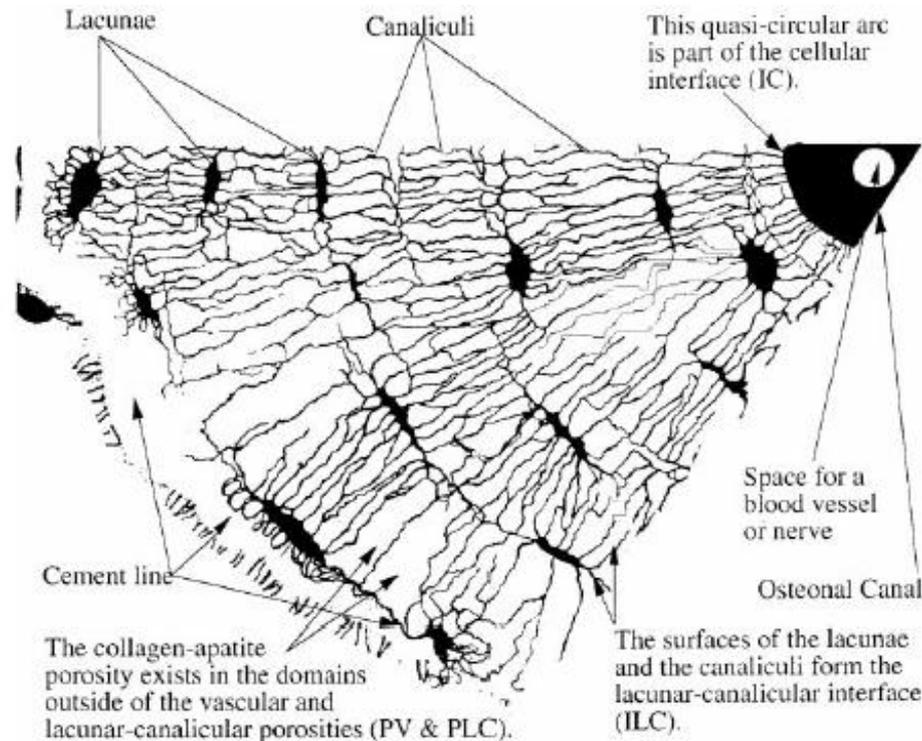


Figure 26. Les 3 catégories de porosités retrouvées au sein de l'os cortical (ici le schéma partiel d'une coupe longitudinale d'un ostéon) à l'intérieur desquelles s'infiltré le fluide extracellulaire, d'après la classification de Stephen Cowin : la porosité vasculaire (PV, ici appelée « osteonal canal ») ; la porosité lacuno-canaliculaire (PLC, ici appelée « lacunae » et « canaliculi ») ; et la porosité collagène-apatite (PCA). Image reproduite d'après Stephen Cowin [158].

Du fait de la grande taille des tunnels de Havers et de Volkmann (qui composent la « porosité vasculaire ») et des canalicules (qui composent la « porosité lacuno-canaliculaire »), l'eau qui s'y infiltre peut ainsi circuler librement aux alentours de la matrice osseuse minéralisée. Cette eau, dite « eau libre », permet ainsi la diffusion des nutriments et des ions, ainsi que l'évacuation des déchets cellulaires (et est ainsi parfois appelé sérum [161]). De plus, cette « eau libre » compose la majorité de l'eau présente au sein du tissu osseux. Cette idée est consolidée par de très anciennes études faites dans les années 1950 par Edelman *et al.*, qui ont montré que la quasi-totalité de l'eau au sein d'os de chien était peu liée au tissu car échangeable par des molécules de D_2O au bout de quelques heures seulement [162]. Cependant, à la même période, W. F. Neuman & M. W. Neuman *et al.* ont proposé qu'une proportion de l'eau au sein du tissu osseux était peu mobile car fortement physisorbée à la surface des cristaux d'apatite (nommée la « coquille d'hydratation ») [155], [161]. Ceci est corroboré par des études plus récentes comme celles de Fernández-Seara *et al.*, effectuées par échange H_2O/D_2O et par des expériences RMN de diffusion de spin, lesquelles ont montré

qu'une proportion non négligeable (~30 %) de l'eau au sein d'os de lapin s'échangeait de façon beaucoup plus lente que l'eau libre [163]. Il est ainsi suspecté que cette eau moins accessible prenne place au sein des interstices de petites tailles provenant de la « porosité collagène-apatite ».

Ce second type de molécules d'eau, appelée « eau interstitielle », a été retrouvée aussi bien dans l'os cortical [164] que dans l'os spongieux [165]. Erin Wilson *et al.* proposent que, au contraire de l'eau libre, la perte de l'eau interstitielle suite à une déshydratation à température ambiante soit irréversible [164] (*cf.* **Figure 27**).

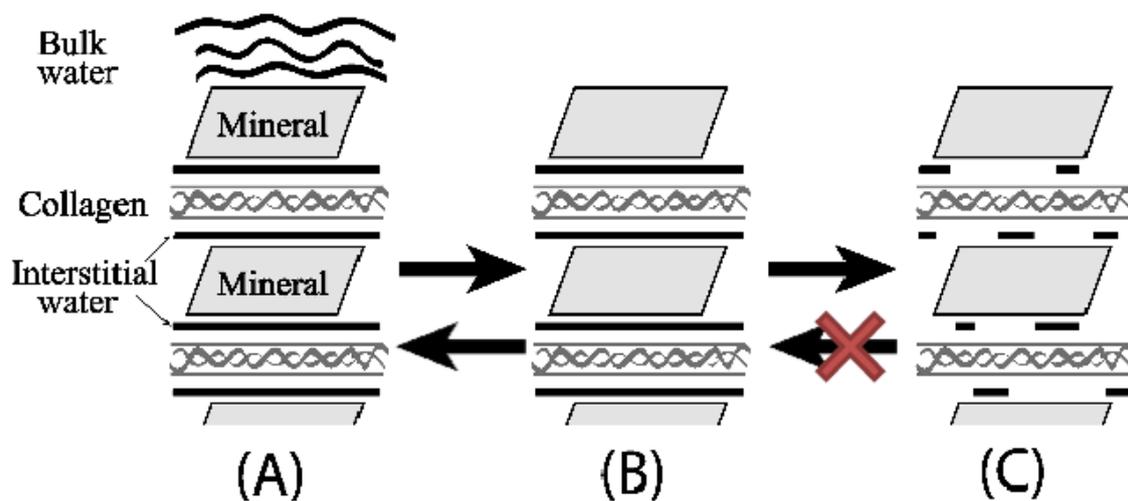


Figure 27. Modèle proposé afin de décrire les comportements des deux catégories d'eau (i.e. l'eau « libre » et l'eau « interstitielle ») lors de la déshydratation d'un échantillon de tissu osseux. (A) Échantillon d'os hydraté avec la coexistence de l'eau libre (appelé ici « bulk water ») et de l'eau interstitielle. Sous un séchage modéré, l'évaporation rapide et réversible de l'eau libre conduit à (B), où seule reste l'eau interstitielle. Un séchage prolongé engendre la perte irréversible de l'eau interstitielle entre la matrice organique et la matrice inorganique (C). Image reproduite d'après Wilson *et al.* [164].

Par ailleurs, ils ont décrit cette eau interstitielle comme étant sous la forme « d'une couche d'eau ordonnée à la surface des cristaux du minéral osseux » [164]. Ils en ont donc conclu que cette dernière pouvait agir telle un agent interfacial entre les matrices organiques et inorganiques du tissu osseux, dont la perte pourrait ainsi modifier drastiquement les interactions organo-minérales. Ceci est corroboré par l'étude réalisée par Jitin Samuel *et al.*, qui ont trempé des échantillons d'os dans différents solvants (avec des constantes diélectriques, des tailles de molécules, et des capacités à créer des liaisons H distinctes), avant d'en étudier les propriétés mécaniques [160]. Ils en ont conclu que les molécules d'eau de la porosité collagène-apatite pourraient participer aux propriétés mécaniques de l'os, en

favorisant l'adhésion entre la matrice organique et la matrice inorganique par le biais : *(i)* d'un réseau de liaisons H ; et *(ii)* des interactions de van Der Waals [160]. **De plus, la capacité du minéral osseux à fortement adsorber des molécules d'eau à sa surface sera étudiée de manière approfondie lors du chapitre II de ce manuscrit. Les conséquences que cela implique sur l'interface minéral-minéral seront elles étudiées lors du chapitre IV.**

Il est à noter qu'une troisième catégorie d'eau existe également : l'eau incorporée à l'intérieur du réseau cristallin de l'apatite. Cette dernière a été observée pour une grande variété d'apatites : *(i)* les apatites osseuses et celles de la dent [166]–[168] ; *(ii)* les apatites géologiques [166] ; *(iii)* les apatites carbonatées de synthèse [169] ; et même *(iv)* les apatites lunaires et les apatites provenant d'astéroïdes [170], [171]. Concernant les apatites biologiques et les apatites géologiques terrestres, la présence d'une telle eau de structure n'est pas surprenante, puisqu'il est connu que la plupart des minéraux du manteau supérieur de la planète Terre sont hydratés [172]. Par ailleurs, cette incorporation d'eau au sein du réseau cristallin des minéraux peut parfois modifier drastiquement leurs propriétés physico-chimiques [172]. C'est pourquoi, cette problématique se retrouve donc logiquement être une préoccupation importante dans le domaine de l'étude du minéral osseux [173]. Il est proposé que ces molécules d'eau de structure soient positionnées principalement au sein des sites lacunaires des ions hydroxyles, ainsi que ceux des ions calcium à l'intérieur des tunnels de type II (*cf.* **Figure 11**) [168], [174]. Ainsi, il est suspecté qu'elles permettent la stabilité chimique et mécanique de la structure apatitique, en comblant des sites lacunaires et en créant ainsi de potentielles liaisons H avec les ions voisins [168].

I-6 / Problématiques & Plan du manuscrit

I-6-1) Problématiques

Ce chapitre a relaté quelques problématiques de la biominéralisation osseuse, lesquelles concernent principalement la formation de la phase minérale.

Parmi elles, rappelons tout d'abord qu'il n'existe aucun consensus concernant les mécanismes de nucléation/croissance des apatites osseuses, lesquels font l'objet de nombreuses spéculations : *(i)* existence ou non de clusters de prénucléation ; *(ii)* nucléation homogène ou hétérogène (si hétérogène, implication de quelles PNCs ou de quels résidus du collagène ?) ; *(iii)* croissance par association d'ions en solution ou bien à travers la formation d'une phase précurseur (si oui laquelle ? peut-être l'ACP).

Ensuite, l'autre question fondamentale de la biominéralisation osseuse concerne la nature ainsi que les fonctions des composés qui permettent aux cristaux d'apatite d'être coalignés à longue distance. Le consensus actuel est que seules les composantes organiques (biomolécules templates et/ou interfaciales) dirigent cette organisation.

Par ailleurs, l'autre énigme à propos des cristaux du minéral osseux concerne leur surface. Cette dernière est atypique à bien des égards, notamment parce qu'il est pressenti que sa structure n'est pas de l'hydroxyapatite à proprement parler mais plutôt celle d'un phosphate de calcium désordonné et hydraté. Puisque c'est cette surface particulière qui est exposée aux autres composants de la MEC ainsi qu'aux cellules, c'est de cette dernière dont va dépendre une grande partie des processus chimiques et biologiques associés aux apatites osseuses. Ces processus incluent particulièrement : *(i)* sa capacité d'adsorption de molécules d'eau ; *(ii)* sa solubilité sous l'action des ostéoclastes ; ou bien encore *(iii)* sa capacité à agir comme réservoir ionique *via* la labilité des espèces ioniques la constituant. Cependant, son existence et les rôles et *in vivo* d'une telle surface sont encore largement débattus, bien que son implication dans les propriétés métaboliques de l'os paraisse évidente.

I-6-2) Plan du manuscrit

La toile de fond du prochain chapitre traitera ainsi de l'étude du domaine de surface du minéral osseux. Cependant, étudier ce dernier est un véritable défi, notamment car son épaisseur est extrêmement faible (et sera calculée comme étant inférieure à 1 nm). Cela

nécessite donc l'utilisation de techniques puissantes et locales, telle la résonance magnétique nucléaire à l'état solide (RMN).

Le **chapitre II** débutera ainsi avec un rapide état de l'art, lequel précisera comment la RMN à l'état solide s'est avéré être un outil précieux pour analyser finement les phases de phosphates de calcium en général, dont l'hydroxyapatite et le minéral osseux en particulier. Nous détaillerons également comment elle a permis par le passé de détecter ce domaine de surface du minéral osseux, appelé aussi domaine non-apatitique. Dans cette optique, la comparaison entre une apatite osseuse et une apatite stœchiométrique de synthèse (laquelle ne possède pas de domaine non-apatitique) s'avèrera particulièrement éloquente.

Ensuite, les travaux de cette thèse visant la caractérisation détaillée de la surface du minéral osseux seront présentés, analysés, puis interprétés. L'originalité de ces derniers par rapport à la majorité de ceux trouvés dans la littérature, réside dans l'utilisation d'un échantillon de tissu osseux frais et intact. Ceci a permis d'étudier le minéral osseux dans des conditions voisines de celles rencontrées *in vivo* (*ex vivo*). Cette approche expérimentale rigoureuse a rendu possible, à travers l'étude des interfaces par RMN, l'analyse des propriétés d'hydrophilie de la surface du minéral osseux. Dans cette perspective, des analogues de synthèse du minéral osseux ont également été étudiés.

Une fois les propriétés d'hydrophilie de la surface du minéral osseux discutées, d'autres aspects de cette dernière seront également étudiés en détails lors du **chapitre III**. En effet, la RMN est un outil particulièrement efficace pour l'étude d'un large panel de problématiques concernant la surface du minéral osseux. Ainsi, la caractérisation structurale ainsi que l'analyse de la composition chimique de cette dernière seront présentées. Cependant, la RMN se trouvant être une technique peu sensible à l'égard de certains noyaux (notamment ^{43}Ca , ^{13}C), l'utilisation d'analogues de synthèse enrichis en ces isotopes respectifs s'est avérée indispensable.

Une fois la structure, la composition chimique, ainsi que les propriétés d'hydrophilie de la surface du minéral osseux décrites, cela a permis une meilleure description des interfaces minéral/minéral au sein du tissu osseux. Ainsi, le **chapitre IV** a consisté à étudier l'implication de la couche de surface dans le coalignement des cristaux d'apatite osseuse. Pour ce faire, des observations par cryo-MET ainsi que des analyses par

WAXD ont été réalisées. Cependant, devant la difficulté d'obtenir des cristaux d'apatite osseuse intacts et dépourvus de matière organique, des analogues de synthèse ont dû être utilisés.

Références bibliographiques

- [1] S. Weiner et H. D. Wagner, « The material bone: structure-mechanical function relations », *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, n° 1, p. 271–298, 1998.
- [2] M. J. Glimcher, « Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation », *Rev. Mineral. Geochem.*, vol. 64, n° 1, p. 223–282, janv. 2006.
- [3] R. S. Taichman, « Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche », *Blood*, vol. 105, n° 7, p. 2631–2639, avr. 2005.
- [4] R. Zapanta LeGeros, « Apatites in biological systems », *Prog. Cryst. Growth Charact.*, vol. 4, n° 1, p. 1–45, 1981.
- [5] X. Lu et Y. Leng, « Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid », *Biomaterials*, vol. 26, n° 10, p. 1097–1108, avr. 2005.
- [6] G. H. Nancollas, M. Lore, L. Perez, C. Richardson, et S. J. Zawacki, « Mineral phases of calcium phosphate », *Anat. Rec.*, vol. 224, n° 2, p. 234–241, 1989.
- [7] C. J. Rosen, R. Bouillon, J. E. Compston, et V. Rosen, *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Wiley, 2013.
- [8] A. George et A. Veis, « Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 11, p. 4670–4693, nov. 2008.
- [9] A. L. Boskey, « Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization », *Bone Miner.*, vol. 6, n° 2, p. 111–123, 1989.
- [10] J. P. Gorski, « Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 50, n° 5, p. 391–396, 1992.
- [11] P. D. Delmas, R. P. Tracy, B. L. Riggs, et K. G. Mann, « Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 36, n° 1, p. 308–316, 1984.
- [12] P. A. Price, A. A. Otsuka, J. W. Poser, J. Kristaponis, et N. Raman, « Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 73, n° 5, p. 1447–1451, 1976.
- [13] G. Karsenty et M. Ferron, « The contribution of bone to whole-organism physiology », *Nature*, vol. 481, n° 7381, p. 314–320, janv. 2012.
- [14] F. Oury, G. Sumara, O. Sumara, M. Ferron, H. Chang, C. E. Smith, L. Hermo, S. Suarez, B. L. Roth, P. Ducy, et G. Karsenty, « Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 796–809, mars 2011.
- [15] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, et Y. Seki, « Biological materials: Structure and mechanical properties », *Prog. Mater. Sci.*, vol. 53, n° 1, p. 1–206, janv. 2008.
- [16] J. D. Currey, *Bones: structure and mechanics*. Princeton University Press, 2002.
- [17] C. Gans, *Biology of the reptilia*. Academic Press, 1992.
- [18] W. Traub, T. Arad, et S. Weiner, « Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, n° 24, p. 9822–9826, 1989.
- [19] W. J. Landis, « A study of calcification in the leg tendons from the domestic turkey », *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, vol. 94, n° 3, p. 217–238, 1986.
- [20] M.-M. Giraud-Guille, « Liquid crystalline order of biopolymers in cuticles and bones », *Microsc. Res. Tech.*, vol. 27, n° 5, p. 420–428, 1994.
- [21] M. M. Giraud-Guille, « Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 42, n° 3, p. 167–180, 1988.

- [22] E. Beniash, « Biominerals-hierarchical nanocomposites: the example of bone », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 3, n° 1, p. 47-69, janv. 2011.
- [23] S. Vigier, « Matrices fibrillaires denses de collagène : matériaux pour la réparation osseuse et l'étude d'ostéoblastes en trois dimensions », UPMC Paris 06, 2008.
- [24] L. Wang, Q. Liang, Z. Wang, J. Xu, Y. Liu, et H. Ma, « Preparation and characterisation of type I and V collagens from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) », *Food Chem.*, vol. 148, p. 410-414, avr. 2014.
- [25] D. F. Holmes, C. J. Gilpin, C. Baldock, U. Ziese, A. J. Koster, et K. E. Kadler, « Corneal collagen fibril structure in three dimensions: structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, n° 13, p. 7307-7312, 2001.
- [26] H. Lodish, J. E. Darnell, et C. François, *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Université, 1997.
- [27] P. M. Gallop, O. O. Blumenfeld, et S. Seifter, « Structure and metabolism of connective tissue proteins », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 41, n° 1, p. 617-672, 1972.
- [28] G. Durand et J. L. Beaudeau, *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives*. Médecine Sciences Publications, 2011.
- [29] A. J. Hodge et J. A. Petruska, *Aspects of Protein Structure and Function*. Academic Press: London, 1963.
- [30] S. Lees et E. A. Page, « A study of some properties of mineralized turkey leg tendon », *Connect. Tissue Res.*, vol. 28, n° 4, p. 263-287, 1992.
- [31] W. J. Landis, F. H. Silver, et J. W. Freeman, « Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues », *J. Mater. Chem.*, vol. 16, n° 16, p. 1495, 2006.
- [32] M. Fang, « Type I Collagen Nanomorphology in Relation to Disease, Tissue Hierarchy, and Fibrillogenesis », The University of Michigan, 2013.
- [33] A. Gautieri, S. Vesentini, A. Redaelli, et M. J. Buehler, « Hierarchical Structure and Nanomechanics of Collagen Microfibrils from the Atomistic Scale Up », *Nano Lett.*, vol. 11, n° 2, p. 757-766, févr. 2011.
- [34] P. Fratzl, in *Collagen : Structure and Mechanics, an Introduction*, Springer US, 2008.
- [35] W. F. de Jong, « La Substance Minérale Dans les Os », *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, vol. 45, n° 6, p. 445-448, 1926.
- [36] R. Z. LeGeros, « Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 11, p. 4742-4753, nov. 2008.
- [37] V. Jantou-Morris, M. A. Horton, et D. W. McComb, « The nano-morphological relationships between apatite crystals and collagen fibrils in ivory dentine », *Biomaterials*, vol. 31, n° 19, p. 5275-5286, juill. 2010.
- [38] M. H. Crigel, M. Balligand, et E. Heinen, « Les bois de cerf: revue de littérature scientifique », *Ann Méd Vét*, vol. 145, p. 25-38, 2001.
- [39] J. C. Weaver, G. W. Milliron, A. Miserez, K. Evans-Lutterodt, S. Herrera, I. Gallana, W. J. Mershon, B. Swanson, P. Zavattieri, E. DiMasi, et D. Kisailus, « The Stomatopod Dactyl Club: A Formidable Damage-Tolerant Biological Hammer », *Science*, vol. 336, n° 6086, p. 1275-1280, juin 2012.
- [40] R. Z. LeGeros, « Biological apatites in modern and fossil shark teeth and in calcified fish scales », *Bulletin de l'Institut océanographique*, p. 247, 1994.
- [41] D. Bazin et M. Daudon, « Nouvelles méthodes d'étude des calculs et plaques de Randall », *Actual. Néphrologiques JHamburger Maison Chim.*, p. 75-98, 2010.
- [42] M. Bohner et J. Lemaître, « Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? », *Biomaterials*, vol. 30, n° 12, p. 2175-2179, avr. 2009.
- [43] J. Beuvelot, « Biomimétisme, Cytocompatibilité et Cytodynamique », Université d'Angers, 2010.

- [44] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. ELSEVIER SCIENCE & TECHNOLOGY, 1994.
- [45] M. I. Kay, R. A. Young, et A. S. Posner, « Crystal Structure of Hydroxyapatite », *Nature*, vol. 204, n° 4963, p. 1050-1052, déc. 1964.
- [46] M. Mathew et S. Takagi, « Structures of biological minerals in dental research », *J. Res.-Natl. Inst. Stand. Technol.*, vol. 106, n° 6, p. 1035-1044, 2001.
- [47] O. Hochrein, R. Kniep, et D. Zahn, « Atomistic Simulation Study of the Order/Disorder (Monoclinic to Hexagonal) Phase Transition of Hydroxyapatite », *Chem. Mater.*, vol. 17, n° 8, p. 1978-1981, avr. 2005.
- [48] G. Ma et X. Y. Liu, « Hydroxyapatite: Hexagonal or Monoclinic? », *Cryst. Growth Des.*, vol. 9, n° 7, p. 2991-2994, juill. 2009.
- [49] J. M. Hughes et J. Rakovan, « The Crystal Structure of Apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{OH},\text{Cl})$ », *Rev. Mineral. Geochem.*, vol. 48, n° 1, p. 1-12, janv. 2002.
- [50] J. D. Pasteris, B. Wopenka, et E. Valsami-Jones, « Bone and tooth mineralization: Why apatite? », *Elements*, vol. 4, n° 2, p. 97-104, 2008.
- [51] N. J. Lakhkar, I.-H. Lee, H.-W. Kim, V. Salih, I. B. Wall, et J. C. Knowles, « Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses », *Bionics - Biol. Inspired Smart Mater.*, vol. 65, n° 4, p. 405-420, avr. 2013.
- [52] Y. Politi, D. R. Batchelor, P. Zaslansky, B. F. Chmelka, J. C. Weaver, I. Sagi, S. Weiner, et L. Addadi, « Role of Magnesium Ion in the Stabilization of Biogenic Amorphous Calcium Carbonate: A Structure-Function Investigation », *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 1, p. 161-166, janv. 2010.
- [53] A. L. Boskey et A. S. Posner, « Magnesium stabilization of amorphous calcium phosphate: A kinetic study », *Mater. Res. Bull.*, vol. 9, n° 7, p. 907-916, juill. 1974.
- [54] J. Mahamid, A. Sharir, L. Addadi, et S. Weiner, « Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 35, p. 12748-12753, 2008.
- [55] J. Mahamid, B. Aichmayer, E. Shimoni, R. Ziblat, C. Li, S. Siegel, O. Paris, P. Fratzl, S. Weiner, et L. Addadi, « Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 14, p. 6316-6321, avr. 2010.
- [56] P. J. Marie, P. Ammann, G. Boivin, et C. Rey, « Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 69, n° 3, p. 121-129, sept. 2001.
- [57] COMBES C. et REY C., « Biomimétisme et biocéramiques », *Actual. Chim. Paris 1973*, n° 7, p. 16-26, 2003.
- [58] Y. Wang, S. Von Euw, G. Laurent, C. Crevant, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, N. Nassif, et T. Azais, « Impact of collagen confinement vs. ionic substitutions on the local disorder in bone and biomimetic apatites », *Mater. Horiz.*, vol. 1, n° 2, p. 224-231, 2014.
- [59] J. C. Elliott, D. W. Holcomb, et R. A. Young, « Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 37, n° 4, p. 372-375, 1985.
- [60] M. E. Fleet et X. Liu, « Carbonate apatite type A synthesized at high pressure: new space group and orientation of channel carbonate ion », *J. Solid State Chem.*, vol. 174, n° 2, p. 412-417, sept. 2003.
- [61] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, et M. J. Glimcher, « Bone mineral: update on chemical composition and structure », *Osteoporos. Int.*, vol. 20, n° 6, p. 1013-1021, juin 2009.

- [62] S. V. Dorozhkin, « Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine », *Materials*, vol. 2, n° 2, p. 399-498, avr. 2009.
- [63] R. Legros, N. Balmain, et G. Bonel, « Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 41, n° 3, p. 137-144, 1987.
- [64] C. Rey, J. L. Miquel, L. Facchini, A. P. Legrand, et M. J. Glimcher, « Hydroxyl groups in bone mineral », *Bone*, vol. 16, n° 5, p. 583-586, mai 1995.
- [65] J. D. Pasteris, B. Wopenka, J. J. Freeman, K. Rogers, E. Valsami-Jones, J. A. M. van der Houwen, et M. J. Silva, « Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials », *Biomaterials*, vol. 25, n° 2, p. 229-238, janv. 2004.
- [66] G. Cho, « Detection of Hydroxyl Ions in Bone Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy », *Science*, vol. 300, n° 5622, p. 1123-1127, mai 2003.
- [67] R. A. Santos, R. A. Wind, et C. E. Bronnimann, « ¹H CRAMPS and ¹H-³¹P HetCor Experiments on Bone, Bone Mineral, and Model Calcium Phosphate Phases », *J. Magn. Reson. B*, vol. 105, n° 2, p. 183-187, oct. 1994.
- [68] N. Reznikov, R. Shahar, et S. Weiner, « Bone hierarchical structure in three dimensions », *Acta Biomater.*, vol. 10, n° 9, p. 3815-3826, sept. 2014.
- [69] N. Nassif, F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, et M. M. Giraud-Guille, « In Vivo Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite », *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 12, p. 3653-3663, juin 2010.
- [70] J. D. Termine, E. D. Eanes, D. J. Greenfield, M. U. Nysten, et R. A. Harper, « Hydrazine-deproteinated bone mineral », *Calcif. Tissue Res.*, vol. 12, n° 1, p. 73-90, 1973.
- [71] S. Weiner et P. A. Price, « Disaggregation of bone into crystals », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 39, n° 6, p. 365-375, 1986.
- [72] H.-M. Kim, C. Rey, et M. J. Glimcher, « Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature », *J. Bone Miner. Res.*, vol. 10, n° 10, p. 1589-1601, 1995.
- [73] S. J. Eppell, W. Tong, J. L. Katz, L. Kuhn, et M. J. Glimcher, « Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 19, n° 6, p. 1027-1034, nov. 2001.
- [74] M. J. Glimcher, « Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation », *Rev. Mineral. Geochem.*, vol. 64, n° 1, p. 223-282, janv. 2006.
- [75] H. C. Anderson, « Molecular biology of matrix vesicles », *Clin. Orthop.*, n° 314, p. 266-280, mai 1995.
- [76] E. E. Golub, « Role of matrix vesicles in biomineralization », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1790, n° 12, p. 1592-1598, déc. 2009.
- [77] R. Robison, « The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. », *Biochem J*, vol. 17, n° 2, p. 286-0, 1923.
- [78] R. Robison et K. M. Soames, « The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification: Part II. The Phosphoric Esterase of Ossifying Cartilage », *Biochem. J.*, vol. 18, n° 3-4, p. 740-754, 1924.
- [79] L. Hessle, K. A. Johnson, H. C. Anderson, S. Narisawa, A. Sali, J. W. Goding, R. Terkeltaub, et J. L. Millán, « Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, n° 14, p. 9445-9449, 2002.

- [80] B. R. Genge, L. N. Wu, et R. E. Wuthier, « Differential fractionation of matrix vesicle proteins. Further characterization of the acidic phospholipid-dependent Ca²⁺ (+)-binding proteins. », *J. Biol. Chem.*, vol. 265, n° 8, p. 4703–4710, 1990.
- [81] R. A. Robinson, « An electron-microscopic study of the crystalline inorganic component of bone and its relationship to the organic matrix », *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.*, vol. 34-A, n° 2, p. 389, 1952.
- [82] Ra. Robinson et M. L. Watson, « Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope », *Anat. Rec.*, vol. 114, n° 3, p. 383–409, 1952.
- [83] M. Glimcher, « Molecular Biology of Mineralized Tissues with Particular Reference to Bone », *Rev. Mod. Phys.*, vol. 31, n° 2, p. 359-393, avr. 1959.
- [84] R. O. Ritchie, M. J. Buehler, et P. Hansma, « Plasticity and toughness in bone », *Phys. Today*, vol. 62, n° 6, p. 41-47, juin 2009.
- [85] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, et P. Zioupos, « Mechanical properties and the hierarchical structure of bone », *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, n° 2, p. 92-102, mars 1998.
- [86] E. A. McNally, H. P. Schwarcz, G. A. Botton, et A. L. Arsenault, « A Model for the Ultrastructure of Bone Based on Electron Microscopy of Ion-Milled Sections », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 1, p. e29258, janv. 2012.
- [87] M. J. Glimcher, A. J. Hodge, et F. O. Schmitt, « Macromolecular aggregation states in relation to mineralization: the collagen-hydroxyapatite system as studied in vitro », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 43, n° 10, p. 860, 1957.
- [88] F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. J. Hilbers, G. de With, et N. A. J. M. Sommerdijk, « The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors », *Nat. Mater.*, vol. 9, n° 12, p. 1004-1009, déc. 2010.
- [89] Glimcher MJ et Krane SM, *The organization and structure of bone, and the mechanism of calcification*, New York: Academic Press Inc. 1968.
- [90] M. J. Glimcher, « Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds », *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 304, n° 1121, p. 479-508, févr. 1984.
- [91] C. Berthet-Colominas, A. Miller, et S. W. White, « Structural study of the calcifying collagen in turkey leg tendons », *J. Mol. Biol.*, vol. 134, n° 3, p. 431-445, nov. 1979.
- [92] S. W. White, D. J. S. Hulmes, A. Miller, et P. A. Timmins, « Collagen–mineral axial relationship in calcified turkey leg tendon by X-ray and neutron diffraction », *Nature*, vol. 266, n° 5601, p. 421-425, mars 1977.
- [93] A. J. Hodge, « Molecular models illustrating the possible distributions of “holes” in simple systematically staggered arrays of type I collagen molecules in native-type fibrils », *Connect. Tissue Res.*, vol. 21, n° 1-4, p. 137-147, 1989.
- [94] W. J. Landis, M. J. Song, A. Leith, L. McEwen, et B. F. McEwen, « Mineral and Organic Matrix Interaction in Normally Calcifying Tendon Visualized in Three Dimensions by High-Voltage Electron Microscopic Tomography and Graphic Image Reconstruction », *J. Struct. Biol.*, vol. 110, n° 1, p. 39-54, janv. 1993.
- [95] M. D. McKee, A. Nanci, W. J. Landis, Y. Gotoh, L. C. Gerstenfeld, et M. J. Glimcher, « Effects of fixation and demineralization on the retention of bone phosphoprotein and other matrix components as evaluated by biochemical analyses and quantitative immunocytochemistry », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 6, n° 9, p. 937-945, sept. 1991.
- [96] E. P. Katz et S. T. Li, « The intermolecular space of reconstituted collagen fibrils », *J. Mol. Biol.*, vol. 73, n° 3, p. 351-369, janv. 1973.

- [97] E. P. Katz et S.-T. Li, « Structure and function of bone collagen fibrils », *J. Mol. Biol.*, vol. 80, n° 1, p. 1-15, oct. 1973.
- [98] E. P. Katz et L. Shu-tung, « The molecular packing of collagen in mineralized and non-mineralized tissues », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 46, n° 3, p. 1368-1373, févr. 1972.
- [99] A. George, B. Sabsay, P. A. Simonian, et A. Veis, « Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization », *J. Biol. Chem.*, vol. 268, n° 17, p. 12624-12630, juin 1993.
- [100] W. J. Landis, C. F. Sanzone, D. Brickley-Parsons, et M. J. Glimcher, « Radioautographic visualization and biochemical identification of O-phosphoserine- and O-phosphothreonine-containing phosphoproteins in mineralizing embryonic chick bone. », *J. Cell Biol.*, vol. 98, n° 3, p. 986-990, 1984.
- [101] M. Weinstock et C. P. Leblond, « Radioautographic visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of the rat incisor », *J. Cell Biol.*, vol. 56, n° 3, p. 838-845, 1973.
- [102] G. He et A. George, « Dentin Matrix Protein 1 Immobilized on Type I Collagen Fibrils Facilitates Apatite Deposition in Vitro », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 12, p. 11649-11656, janv. 2004.
- [103] J. Silvent, J.-Y. Sire, et S. Delgado, « The Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1 (DMP1) in the Light of Mammalian Evolution », *J. Mol. Evol.*, vol. 76, n° 1-2, p. 59-70, févr. 2013.
- [104] S. L. Lee, T. Glonek, et M. J. Glimcher, « ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence for ternary complex formation of fetal dentin phosphoprotein with calcium and inorganic orthophosphate ions », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 35, n° 1, p. 815-818, 1983.
- [105] S. L. Lee et A. Veis, « Cooperativity in calcium ion binding to repetitive, carboxylate-serylphosphate polypeptides and the relationship of this property to dentin mineralization », *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 16, n° 3, p. 231-240, sept. 1980.
- [106] L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, et S. Weiner, « A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 84, n° 9, p. 2732-2736, 1987.
- [107] N. R. Joseph, « The dissociation constants of organic calcium complexes », *J. Biol. Chem.*, vol. 164, n° 2, p. 529-541, 1946.
- [108] M. J. Glimcher, « Mechanism of calcification: Role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo », *Anat. Rec.*, vol. 224, n° 2, p. 139-153, juin 1989.
- [109] L. B. Gower et D. J. Odom, « Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process », *J. Cryst. Growth*, vol. 210, n° 4, p. 719-734, mars 2000.
- [110] A. S. Schenk, H. Zope, Y.-Y. Kim, A. Kros, N. A. J. M. Sommerdijk, et F. C. Meldrum, « Polymer-induced liquid precursor (PILP) phases of calcium carbonate formed in the presence of synthetic acidic polypeptides—relevance to biomineralization », *Faraday Discuss.*, vol. 159, p. 327, 2012.
- [111] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, et L. B. Gower, « Bone structure and formation: A new perspective », *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, vol. 58, n° 3-5, p. 77-116, nov. 2007.
- [112] G. He, T. Dahl, A. Veis, et A. George, « Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1 », *Nat. Mater.*, vol. 2, n° 8, p. 552-558, août 2003.

- [113] F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. J. Hilbers, G. de With, et N. A. J. M. Sommerdijk, « The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors », *Nat. Mater.*, vol. 9, n° 12, p. 1004-1009, déc. 2010.
- [114] A. L. Boskey, M. Maresca, A. L. Armstrong, et M. G. Ehrlich, « Treatment of proteoglycan aggregates with physal enzymes reduces their ability to inhibit hydroxyapatite proliferation in a gelatin gel », *J. Orthop. Res.*, vol. 10, n° 3, p. 313-319, mai 1992.
- [115] G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee, G. J. Pinero, E. Loyer, R. R. Behringer, et G. Karsenty, « Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein », *Nature*, vol. 386, n° 6620, p. 78-81, mars 1997.
- [116] S. E. Mergenhagen, G. R. Martin, A. A. Rizzo, D. N. Wright, et D. B. Scott, « Calcification in vivo of implanted collagen », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 43, p. 563-565, 1960.
- [117] G. Hunter, P. Hauschka, A. Poole, L. Rosenberg, et H. Goldberg, « Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. », *Biochem J*, vol. 317, p. 59-64, 1996.
- [118] L. Silverman et A. L. Boskey, « Diffusion Systems for Evaluation of Biomineralization », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 75, n° 6, p. 494-501, déc. 2004.
- [119] A. L. Boskey, M. Maresca, W. Ullrich, S. B. Doty, W. T. Butler, et C. W. Prince, « Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel », *Bone Miner.*, vol. 22, n° 2, p. 147-159, 1993.
- [120] P. H. Tartaix, M. Doulaverakis, A. George, L. W. Fisher, W. T. Butler, C. Qin, E. Salih, M. Tan, Y. Fujimoto, L. Spevak, et A. L. Boskey, « In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 18, p. 18115-18120, avr. 2004.
- [121] G. K. Hunter et H. A. Goldberg, « Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, n° 18, p. 8562-8565, sept. 1993.
- [122] P. A. Price, D. Toroian, et J. E. Lim, « Mineralization by Inhibitor Exclusion: THE CALCIFICATION OF COLLAGEN WITH FETUIN », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 25, p. 17092-17101, juin 2009.
- [123] F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. J. Hilbers, G. de With, et N. A. J. M. Sommerdijk, « The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors », *Nat. Mater.*, vol. 9, n° 12, p. 1004-1009, déc. 2010.
- [124] E. Beniash, A. S. Deshpande, P. A. Fang, N. S. Lieb, X. Zhang, et C. S. Sfeir, « Possible role of DMP1 in dentin mineralization », *J. Struct. Biol.*, vol. 174, n° 1, p. 100-106, avr. 2011.
- [125] Y. Wang, T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif, « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite », *Nat. Mater.*, vol. 11, n° 8, p. 724-733, juill. 2012.
- [126] W. J. Landis, K. J. Hodgens, M. J. Song, J. Arena, S. Kiyonaga, M. Marko, C. Owen, et B. F. McEwen, « Mineralization of Collagen May Occur on Fibril Surfaces: Evidence from Conventional and High-Voltage Electron Microscopy and Three-Dimensional Imaging », *J. Struct. Biol.*, vol. 117, n° 1, p. 24-35, juill. 1996.
- [127] D. Gebauer et H. Cölfen, « Prenucleation clusters and non-classical nucleation », *Nano Today*, vol. 6, n° 6, p. 564-584, 2011.

- [128] F. Betts et A. S. Posner, « An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate », *Mater. Res. Bull.*, vol. 9, n° 3, p. 353-360, mars 1974.
- [129] A. S. Posner et F. Betts, « Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure », *Acc. Chem. Res.*, vol. 8, n° 8, p. 273-281, août 1975.
- [130] A. Dey, P. H. H. Bomans, F. A. Müller, J. Will, P. M. Frederik, G. de With, et N. A. J. M. Sommerdijk, « The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization », *Nat. Mater.*, vol. 9, n° 12, p. 1010-1014, déc. 2010.
- [131] W. J. E. M. Habraken, J. Tao, L. J. Brylka, H. Friedrich, L. Bertinetti, A. S. Schenk, A. Verch, V. Dmitrovic, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, J. Laven, P. van der Schoot, B. Aichmayer, G. de With, J. J. DeYoreo, et N. A. J. M. Sommerdijk, « Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate », *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 1507, févr. 2013.
- [132] F. C. Meldrum et R. P. Sear, « MATERIALS SCIENCE: Now You See Them », *Science*, vol. 322, n° 5909, p. 1802-1803, déc. 2008.
- [133] G. B. Ramírez-Rodríguez, J. M. Delgado-López, et J. Gómez-Morales, « Evolution of calcium phosphate precipitation in hanging drop vapor diffusion by in situ Raman microspectroscopy », *CrystEngComm*, vol. 15, n° 12, p. 2206, 2013.
- [134] T. Tsuji, K. Onuma, A. Yamamoto, M. Iijima, et K. Shiba, « Direct transformation from amorphous to crystalline calcium phosphate facilitated by motif-programmed artificial proteins », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 44, p. 16866-16870, 2008.
- [135] F. Castro, A. Ferreira, F. Rocha, A. Vicente, et J. António Teixeira, « Characterization of intermediate stages in the precipitation of hydroxyapatite at 37°C », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 77, p. 150-156, juill. 2012.
- [136] W. He, P. Kjellin, F. Currie, P. Handa, C. S. Knee, J. Bielecki, L. R. Wallenberg, et M. Andersson, « Formation of Bone-like Nanocrystalline Apatite Using Self-Assembled Liquid Crystals », *Chem. Mater.*, vol. 24, n° 5, p. 892-902, mars 2012.
- [137] Z.-L. Zhang, X.-R. Chen, S. Bian, J. Huang, T.-L. Zhang, et K. Wang, « Identification of dicalcium phosphate dihydrate deposited during osteoblast mineralization in vitro », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 131, p. 109-114, févr. 2014.
- [138] S. Mann, « Mineralization in biological systems », in *Inorganic Elements in Biochemistry*, Springer, 1983, p. 125-174.
- [139] E. Beniash, R. A. Metzler, R. S. K. Lam, et P. U. P. A. Gilbert, « Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel », *J. Struct. Biol.*, vol. 166, n° 2, p. 133-143, mai 2009.
- [140] J. D. Termine et A. S. Posner, « Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions », *Science*, vol. 153, n° 3743, p. 1523-1525, sept. 1966.
- [141] W. J. Landis et M. J. Glimcher, « Electron optical and analytical observations of rat growth plate cartilage prepared by ultracryomicrotomy: the failure to detect a mineral phase in matrix vesicles and the identification of heterodispersed particles as the initial solid phase of calcium phosphate deposited in the extracellular matrix », *J. Ultrastruct. Res.*, vol. 78, n° 3, p. 227-268, 1982.
- [142] H. A. Lowenstam et S. Weiner, « Transformation of amorphous calcium phosphate to crystalline dahillite in the radular teeth of chitons », *Science*, vol. 227, n° 4682, p. 51-53, janv. 1985.
- [143] N. J. Crane, V. Popescu, M. D. Morris, P. Steenhuis, et M. A. Ignelzi, « Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization », *Bone*, vol. 39, n° 3, p. 434-442, sept. 2006.

- [144] M. J. Glimcher, L. C. Bonar, M. D. Grynblas, W. J. Landis, et A. H. Roufosse, « Recent studies of bone mineral: Is the amorphous calcium phosphate theory valid? », *J. Cryst. Growth*, vol. 53, n° 1, p. 100-119, mai 1981.
- [145] B. Wopenka et J. D. Pasteris, « A mineralogical perspective on the apatite in bone », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 25, n° 2, p. 131-143, avr. 2005.
- [146] S.-J. Huang, Y.-L. Tsai, Y.-L. Lee, C.-P. Lin, et J. C. C. Chan, « Structural Model of Rat Dentin Revisited », *Chem. Mater.*, vol. 21, n° 13, p. 2583-2585, juill. 2009.
- [147] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, et M. Epple, « A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite », *Magn. Reson. Chem.*, vol. 44, n° 6, p. 573-580, mai 2006.
- [148] T. Isobe, S. Nakamura, R. Nemoto, M. Senna, et H. Sfihi, « Solid-State Double Nuclear Magnetic Resonance Study of the Local Structure of Calcium Phosphate Nanoparticles Synthesized by a Wet-Mechanochemical Reaction », *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, n° 20, p. 5169-5176, mai 2002.
- [149] Y. Wu, J. L. Ackerman, H.-M. Kim, C. Rey, A. Barroug, et M. J. Glimcher, « Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel, and synthetic hydroxyapatites », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 17, n° 3, p. 472-480, mars 2002.
- [150] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, et A. Barroug, « Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, n° 2, p. 198-205, mars 2007.
- [151] D. Farlay, G. Panczer, C. Rey, P. D. Delmas, et G. Boivin, « Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral », *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 28, n° 4, p. 433-445, juill. 2010.
- [152] C. Eichert, C. Drouet, H. Sfihi, C. Rey, et C. Combes, *Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization*. Biomaterials research advances, Nova Science Publishers, 2007.
- [153] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, et M. J. Glimcher, « Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo », *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 22, n° 4, p. 310-317, 2004.
- [154] N. Vandecandelaere, C. Rey, et C. Drouet, « Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, n° 11, p. 2593-2606, nov. 2012.
- [155] W. F. Neuman, T. Y. Toribara, et B. J. Mulryan, « The Surface Chemistry of Bone. VII. The Hydration Shell », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 75, n° 17, p. 4239-4242, 1953.
- [156] C. Drouet, M.-T. Carayon, C. Combes, et C. Rey, « Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg²⁺ and Sr²⁺: A preamble to the activation of bone repair materials », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, n° 8, p. 1544-1550, déc. 2008.
- [157] J. D. Currey, « Biomechanics of Mineralized Skeletons », in *Short Courses in Geology*, J. G. Carter, Éd. Washington, D. C.: American Geophysical Union, 2013, p. 11-25.
- [158] S. C. Cowin, « Bone poroelasticity », *J. Biomech.*, vol. 32, n° 3, p. 217-238, 1999.
- [159] P. Fantazzini, R. Viola, S. M. Alnaimi, et J. H. Strange, « Combined MR-relaxation and MR-cryoporometry in the study of bone microstructure », *Magn. Reson. Imaging*, vol. 19, n° 3, p. 481-484, 2001.
- [160] J. Samuel, D. Sinha, J. C.-G. Zhao, et X. Wang, « Water residing in small ultrastructural spaces plays a critical role in the mechanical behavior of bone », *Bone*, vol. 59, p. 199-206, févr. 2014.
- [161] W. F. Neuman et M. W. Neuman, *The Chemical Dynamics of Bone.*, University of Chicago Press, Chicago. 1958.

- [162] I. S. Edelman, A. H. James, H. Baden, et F. D. Moore, « Electrolyte composition of bone and the penetration of radiosodium and deuterium oxide into dog and human bone », *J. Clin. Invest.*, vol. 33, n° 2, p. 122, 1954.
- [163] M. A. Fernández-Seara, S. L. Wehrli, et F. W. Wehrli, « Diffusion of exchangeable water in cortical bone studied by nuclear magnetic resonance », *Biophys. J.*, vol. 82, n° 1, p. 522–529, 2002.
- [164] E. E. Wilson, A. Awonusi, M. D. Morris, D. H. Kohn, M. M. Tecklenburg, et L. W. Beck, « Highly Ordered Interstitial Water Observed in Bone by Nuclear Magnetic Resonance », *J. Bone Miner. Res.*, vol. 20, n° 4, p. 625–634, déc. 2004.
- [165] P. Fantazzini, « Two ¹H-nuclear magnetic resonance methods to measure internal porosity of bone trabeculae: By solid–liquid signal separation and by longitudinal relaxation », *J. Appl. Phys.*, vol. 95, n° 1, p. 339, 2004.
- [166] S. Dahm et S. Risnes, « A comparative infrared spectroscopic study of hydroxide and carbonate absorption bands in spectra of shark enameloid, shark dentin, and a geological apatite », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 65, n° 6, p. 459–465, 1999.
- [167] W. F. Neuman et M. W. Neuman, « The nature of the mineral phase of bone. », *Chem. Rev.*, vol. 53, n° 1, p. 1–45, 1953.
- [168] E. E. Wilson, A. Awonusi, M. D. Morris, D. H. Kohn, M. M. J. Tecklenburg, et L. W. Beck, « Three Structural Roles for Water in Bone Observed by Solid-State NMR », *Biophys. J.*, vol. 90, n° 10, p. 3722–3731, mai 2006.
- [169] C. H. Yoder, J. D. Pasteris, K. N. Worcester, et D. V. Schermerhorn, « Structural Water in Carbonated Hydroxylapatite and Fluorapatite: Confirmation by Solid State ²H NMR », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 90, n° 1, p. 60–67, janv. 2012.
- [170] J. W. Boyce, S. M. Tomlinson, F. M. McCubbin, J. P. Greenwood, et A. H. Treiman, « The Lunar Apatite Paradox », *Science*, vol. 344, n° 6182, p. 400–402, avr. 2014.
- [171] Y. Wang et al, « WATER CONTENT, CHLORINE AND HYDROGEN ISOTOPE COMPOSITIONS OF LUNAR APATITE. », in *75th Annual Meteoritical Society Meeting*, 2012, vol. 75, p. 5251.
- [172] D. R. Bell et G. R. Rossman, « Water in Earth's Mantle: The Role of Nominally Anhydrous Minerals », *Science*, vol. 255, n° 5050, p. 1391–1397, mars 1992.
- [173] J. D. Pasteris, C. H. Yoder, et B. Wopenka, « Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key to a better understanding of bone mineral », *Am. Mineral.*, vol. 99, n° 1, p. 16–27, janv. 2014.
- [174] S. J. Joris et C. H. Amberg, « Nature of deficiency in nonstoichiometric hydroxyapatites. II. Spectroscopic studies of calcium and strontium hydroxyapatites », *J. Phys. Chem.*, vol. 75, n° 20, p. 3172–3178, sept. 1971.

Chapitre II /

Le caractère hydrophile du minéral osseux

Chapitre II / Le caractère hydrophile du minéral osseux	84
Introduction	84
II-1 / Etat de l'art : Spectroscopie RMN à l'état solide	91
II-1-1) Caractérisation d'apatites de synthèse et biologique par RMN simple impulsion des noyaux ^1H & ^{31}P	92
II-1-1-a) L'hydroxyapatite	92
II-1-1-b) Le minéral osseux	94
II-1-2) RMN CP MAS 1D du noyau ^{31}P	97
II-1-3) Proposition de l'existence d'un domaine non-apatitique :	97
RMN 2D ^1H - ^{31}P	97
II-2 / Etude de l'os frais : caractère hydrophile du minéral osseux	101
II-2-1) Os frais	102
II-2-1-a) RMN simple impulsion des noyaux ^1H & ^{31}P	102
II-2-1-b) Spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P	103
II-2-1-c) Dynamique de transfert de polarisation croisée ^1H - ^{31}P	106
II-2-1-d) Echange chimique $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	107
II-2-2) Quantification du domaine non apatitique	109
II-2-3) Conclusion	112
II-3 / Continuité entre le domaine apatitique et le domaine non-apatitique	113
II-3-1) Os sec	113
II-3-2) Mélange physique HA + ACP	117
II-3-3) Conclusion	120
II-4 / Propriétés d'hydrophilie de plusieurs phosphates de calcium de référence	121
II-4-1) Les apatites biomimétiques	121
II-4-1-a) Caractérisation standard par DRX, MET et ATG	122
II-4-1-b) Caractérisation par RMN	124
- RMN simple impulsion ^1H & ^{31}P	124
- RMN 2D ^1H - ^{31}P	126
II-4-1-c) Echange d'aimantation ^1H - ^1H par diffusion de spin	129
II-4-1-d) Quantification du domaine non apatitique	129
- CHA	129
- CHA-SBF	131
II-4-1-e) MET-HR	132
- Os déprotéiné	133
- Apatites biomimétiques	134
II-4-2) Apatite stœchiométrique	136
II-4-3) Brushite et monétite	137
II-4-4 / Conclusion & Discussion	139
Références bibliographiques	142

Chapitre II / Le caractère hydrophile du minéral osseux

Introduction

Si les cristaux d'apatites osseuses ont été largement étudiés, nous avons choisi de nous intéresser à leur surface en raison du peu de connaissances disponibles dans la littérature. Cette surface détermine les interactions que développe le minéral osseux avec le milieu biologique (collagène, cellules, protéines non collagéniques, eau...). Ainsi, l'interface qu'elle forme est sans doute déterminante lors de la croissance des cristaux, mais aussi lors de la dissolution du minéral osseux par les ostéoclastes lors du remodelage osseux. Les deux chapitres qui suivent traiteront en profondeur de l'analyse de la surface du minéral osseux, et plus particulièrement de l'étude de ses propriétés d'adsorption, ainsi que de la caractérisation structurale et chimique de cette surface.

Pour ce faire, nous nous sommes tournés vers une spectroscopie qui permet d'obtenir des informations à l'échelle atomique, à savoir la RMN à l'état solide. Nous commencerons par un état de l'art, afin de rappeler les contributions apportées par la spectroscopie RMN à l'étude du minéral osseux. Pour notre part, nous nous sommes tournés vers des expériences mettant en jeu l'interaction dipolaire car celle-ci permet de sonder les proximités entre les espèces ioniques composant la surface, et entre la surface des cristaux et les molécules d'eau adsorbées.

Ce deuxième chapitre concerne la mise en évidence du caractère hydrophile de cette surface. Ceci a été rendu possible grâce à l'analyse d'échantillons de tissu osseux frais et intact. Par frais et intact, nous entendons que les échantillons analysés n'ont pas été broyés et n'ont subi aucun traitement chimique avant analyse. De tels échantillons sont ainsi étudiés dans la foulée de leur extraction de chez l'animal, *i.e.* dans les deux heures après cette dernière. Cette procédure permet de conserver l'état d'hydratation naturel de l'échantillon, au contraire de la majorité des études présentées dans la littérature où l'os est souvent sec ou partiellement déshydraté, et surtout broyé. L'accessibilité des espèces en surface du minéral osseux sera montrée par des expériences d'échange H₂O/D₂O. Enfin, à titre de comparaison, le comportement en milieu aqueux d'apatites de synthèse analogues aux apatites osseuses, des apatites biomimétiques, sera également étudié et comparé à celui du minéral osseux. Dans cette partie, la RMN bidimensionnelle ¹H-³¹P (HetCor) sera la technique de choix. Nous

aborderons ensuite un point peu étudié dans la littérature, à savoir, la continuité cœur apatitique-couche de surface qui sera démontrée *via* l'utilisation de séquences basées sur la diffusion de spin ^1H .

Nom ou Acronyme	Description
Os frais	Echantillon d'os de brebis (2 ans) frais et intact, lequel est de l'os spongieux provenant de l'épiphyse du fémur. Ce dernier a été étudié dans aussitôt après son extraction de chez l'animal, soit moins de 2 heures. Seule une découpe grossière de l'échantillon au scalpel fut réalisée afin d'en obtenir des fragments suffisamment petits, permettant leur insertion dans le rotor.
Os sec	Echantillon d'os de brebis (2 ans), lequel est de l'os spongieux provenant de l'épiphyse du fémur. Ce dernier a été séché à température ambiante dans une hotte à flux laminaire, découpé finement au scalpel, puis broyé en poudre dans un mortier. Aucun traitement chimique ne fut effectué.
Os déprotéiné	Echantillon d'os de brebis (2 ans), provenant de l'épiphyse du fémur. Ce dernier a été traité chimiquement à l'hypochlorite de sodium afin d'en extraire le minéral.
HA	Echantillon d'hydroxyapatite stœchiométrique de synthèse. Ce dernier fut synthétisé sous atmosphère inerte afin de minimiser son taux de carbonatation. HA pour HydroxyApatite.
ACP	Echantillon de phosphate de calcium amorphe. ACP pour "Amorphous Calcium Phosphate".
CHA	Echantillon d'apatite biomimétique. Ce dernier fut synthétisé en présence d'un précurseur ionique en carbonates afin que ces derniers s'incorporent dans sa structure. CHA pour "Carbonated HydroxyApatite".
CHA-SBF	Echantillon d'apatite biomimétique. Ce dernier fut précipité à partir d'une solution de SBF (pour Simulated Body Fluid) afin qu'elle soit potentiellement substituée de la même manière qu'une apatite osseuse. CHA-SBF pour "Carbonated HydroxyApatite" précipité à partir d'une solution de SBF.
OCP	Echantillon de phosphate octocalcique de synthèse. OCP pour "OctaCalcium Phosphate".
Monétite	Echantillon commercial de monétite.
Brushite	Echantillon de brushite de synthèse.

Liste des échantillons utilisés lors de ces travaux de thèse

Les échantillons de tissu osseux nous ont été fournis grâce à une collaboration avec le Docteur Luc Behr de l'Institut Mutualiste Montsouris (IMM). Pour plus de rigueur, les échantillons qui ont été étudiés sont tous similaires. En effet, ces derniers proviennent

toujours de la même zone d'os cortical située dans la tête fémorale de différentes brebis toutes âgées de 2 ans. L'os de brebis fut choisi puisque ce dernier présente de fortes similitudes avec l'os humain [1]. La brebis est ainsi un animal modèle souvent utilisé lors d'essais cliniques dans le domaine de la recherche biomédicale [2]–[4].

La comparaison avec des phosphates de calcium de références s'est avérée essentielle. A ce titre, un effort de synthèse particulier a été fourni puisque nous avons synthétisé et caractérisé : des apatites biomimétiques (CHA et CHA-SBF), une apatite stœchiométrique (HA), un phosphate de calcium amorphe (ACP), un phosphate octocalcique (OCP) et de la brushite. Un descriptif de tous les échantillons utilisés lors de ces travaux apparaît dans le tableau ci-dessus.

De nombreuses techniques ont été utilisées dans la littérature afin d'étudier le minéral osseux, dont des techniques spectroscopiques comme l'infrarouge (*cf.* **Figure 12**), le Raman [5] et la RMN à l'état solide ; mais aussi de la diffraction des rayons X (*cf.* **Figure 13**) et électronique (*cf.* **Figure 14-B**) ; de l'analyse thermogravimétrique [6], ainsi que de la microscopie électronique (*cf.* **Figure 2**).

Parmi toutes ces techniques, nous nous sommes orientés particulièrement vers la RMN à l'état solide. En effet, cette dernière présente de nombreux avantages, comme celui d'être capable de détecter sélectivement un noyau en particulier parmi tous ceux qui composent ce matériau hybride complexe qu'est le tissu osseux, ainsi que celui de pouvoir sonder des proximités spatiales entre différents noyaux. Les principes de cette technique ainsi que les détails expérimentaux des différentes expériences utilisées dans ce manuscrit sont détaillés au sein de la section « Matériels et méthodes ».

Rappelons qu'un noyau est actif en RMN seulement s'il possède un spin nucléaire (I) non nul. La technique de rotation à l'angle magique (magic angle spinning, MAS) a été utilisée pour toutes les expériences RMN de ce manuscrit. Elle permet de supprimer les interactions anisotropes qui engendrent un élargissement spectral, telles que l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique (CSA), les interactions dipolaires homonucléaires et hétéronucléaires, ainsi que l'interaction quadripolaire au 1^{er} ordre. Les spins nucléaires (I), les abondances naturelles, les rapports gyromagnétiques (γ), ainsi que les réceptivités (par rapport

au proton) des principaux noyaux actifs en RMN qui composent le minéral osseux sont regroupés au sein du **Tableau 4**.

Noyau	Spin Nucléaire (I)	Abondance Naturelle (%)	γ ($10^7 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$)	Réceptivité / ^1H
^1H	1/2	99,98	26,75	1
^{31}P	1/2	100	10,83	$6,63.10^{-2}$
^{13}C	1/2	1,11	6,73	$1,76.10^{-4}$
^{43}Ca	7/2	0,15	1,8	$9,28.10^{-6}$
^{17}O	-5/2	0,04	-3,63	$1,08.10^{-5}$

Tableau 4. Les spins nucléaires (I), les abondances naturelles, les rapports gyromagnétiques (γ) ainsi que les réceptivités (par rapport au proton) des principaux noyaux actifs en RMN qui composent le minéral osseux (classés par réceptivité décroissante).

Il apparaît que l'étude des noyaux ^1H et ^{31}P est beaucoup plus accessible que celle des autres noyaux. C'est la raison pour laquelle ils ont historiquement fait l'objet de nombreuses études. L'étude des noyaux ^{13}C , ^{43}Ca et ^{17}O est plus rare, car plus délicate en terme de sensibilité. De plus, dans le cas des noyaux ^{13}C et ^{17}O , il est difficile d'être sélectif vis à vis minéral osseux puisque ces deux noyaux sont abondamment présents au sein de la matrice organique. Ainsi, les études RMN des noyaux ^{13}C , ^{43}Ca et ^{17}O ont souvent été réalisées sur des d'analogues de synthèse. Ceux-ci peuvent être enrichis en ces isotopes respectifs, comme nous le montrerons par la suite dans le cas des noyaux ^{13}C et ^{43}Ca .

Les séquences RMN que nous avons utilisées lors de cette thèse, et qui apparaîtront dans le manuscrit sont les suivantes :

- **Simple impulsion** : principalement utilisée pour les noyaux ^1H et ^{31}P , cette séquence permet d'obtenir des spectres quantitatifs dès lors que le temps de répétition des impulsions (RD) est suffisamment long pour permettre une relaxation longitudinale totale et atteindre l'équilibre thermodynamique. Si pour les échantillons que nous avons étudiés, RD pour le noyau ^1H n'est que quelques secondes, RD pour le noyau ^{31}P a été fixé à 240 s dans le but d'obtenir un spectre quantitatif.

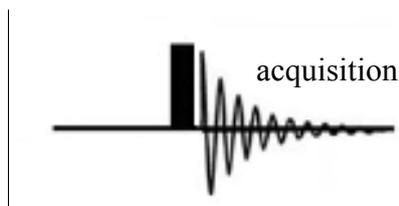


Figure 28. Représentation schématique de la séquence simple impulsion.

- Polarisation croisée 1D (CP MAS) :** généralement, cette séquence permet de transférer l'aimantation des spins abondants ^1H vers les spins rares tels que le ^{13}C de manière à augmenter sensiblement le rapport signal-sur-bruit d'un spectre RMN ^{13}C . Nous l'avons de notre côté utilisé avec les noyaux ^{31}P de manière à sonder la proximité spatiale de ce noyau avec des espèces protonées. En effet, l'efficacité de cette technique dépend du couplage dipolaire qui est proportionnel à $1/r^3$, où r représente la distance internucléaire. Voilà pourquoi le transfert d'aimantation sera d'autant plus efficace que les distances entre les noyaux ^1H et ^{31}P sont courtes. Le temps durant lequel le transfert d'aimantation est effectué est appelé temps de contact (t_{CP}). Une fois le transfert d'aimantation effectué, le signal ^{31}P acquis provient dès lors de l'aimantation des noyaux ^1H voisins. De cette manière, plus le t_{CP} utilisé est court, plus les distances sondées sont courtes.

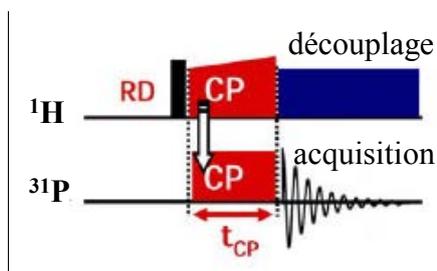


Figure 29 Représentation schématique de la séquence de polarisation croisée (CP) ^1H - ^{31}P .

- Polarisation croisée 2D (la séquence HetCor) :** l'expérience de CP MAS peut être convertie en une expérience bidimensionnelle par l'introduction d'un temps d'évolution t_1 après l'impulsion ^1H (séquence de corrélation hétéronucléaire HetCor). Cette séquence permet de corréler un spectre ^{31}P qui est acquis (voie F2 - axe horizontal), à un spectre ^1H qui est reconstitué (voie F1 - axe vertical). De cette manière, une telle expérience fait office de filtre vis-à-vis du signal ^1H , en permettant potentiellement de s'affranchir des signaux ^1H de la matrice organique (*i.e.* les protons

éloignées du minéral osseux). Ici réside l'énorme avantage de l'expérience HetCor ^1H - ^{31}P pour l'étude du minéral osseux. En effet, elle permet ainsi de s'atteler à l'étude des environnements chimiques des noyaux ^1H et ^{31}P au sein ou à proximité immédiate du minéral osseux de façon *ex vivo*, c'est à dire directement à partir de fragments d'un échantillon d'os intact. Voilà pourquoi cette dernière est un outil de choix largement utilisé pour l'étude des apatites biologiques.

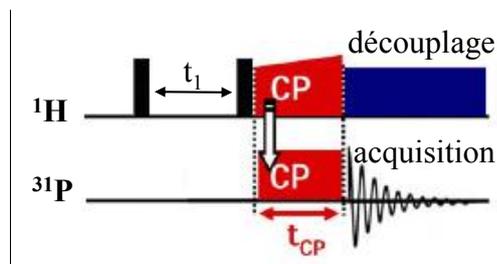


Figure 30. Représentation schématique de la séquence HetCor ^1H - ^{31}P .

- **Double Polarisation croisée de type « aller-retour » (Double CP ^1H - ^{31}P - ^1H) :**
 Cette séquence consiste en deux blocs de transfert CP, d'abord du ^1H vers le ^{31}P après lequel l'aimantation est stockée le long de l'axe z. puis le signal Zeeman ^1H résiduel est éliminé par un pulse de saturation ^1H dont la longueur correspond à la longueur de la signal de précession libre du proton. Après quoi, l'aimantation ^{31}P est basculée dans le plan xy avant le deuxième transfert CP du ^{31}P vers le ^1H . Le premier temps de contact (t_{CP1}) permet d'optimiser l'intensité du signal ^{31}P tandis que le deuxième temps de contact (t_{CP2}) peut-être incrémenté afin de sonder les proximités spatiales et permet une édition spectrale des protons proches des ions phosphates. Cette approche permet d'enregistrer un spectre ^1H du minéral osseux avec un très bon rapport signal-sur-bruit S/B dans un temps raisonnable en s'affranchissant de l'expérience HetCor.

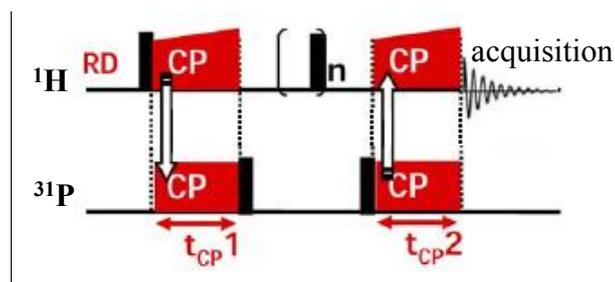


Figure 31. Représentation schématique de la séquence de double CP ^1H - ^{31}P - ^1H .

- **Diffusion de spin ^1H (EXSY et Double CP-EXSY)** : Cette technique est basée sur un échange d'aimantation induit par la diffusion de spin ^1H . Elle permet de sonder des distances plus grandes que la polarisation croisée. La séquence la plus simple est une séquence à trois impulsions mais nous avons choisi de la combiner avec la séquence CP « aller-retour » de façon à sonder les proximités « longues distances » au sein du minéral osseux.

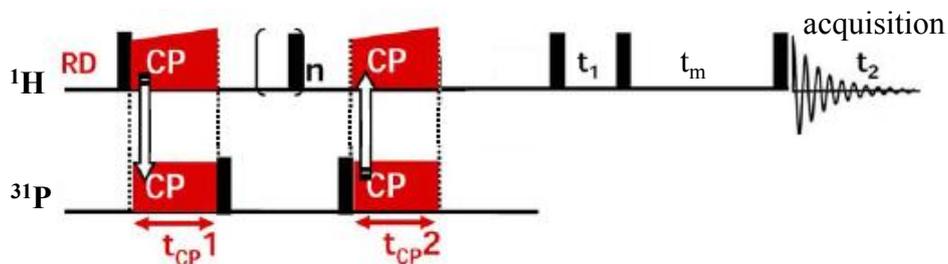


Figure 32. Représentation schématique de la séquence Double CP-EXSY ^1H - ^1H .

- **TRAPDOR** : La séquence TRAPDOR (transfer of population in double resonance) permet de sonder les proximités entre le noyau ^1H et un noyau quadripolaire. Nous l'avons utilisée pour sonder les proximités ^1H - ^{43}Ca . Elle est basée sur l'interaction dipolaire ^1H - ^{43}Ca qui conduit au déphasage des résonances des espèces protonées proches de noyaux ^{43}Ca .

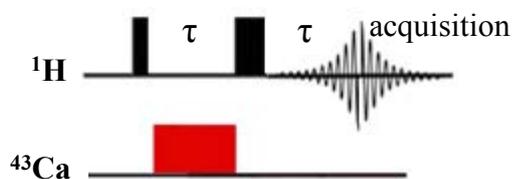


Figure 33. Représentation schématique de la séquence TRAPDOR.

Il est noter que tous les spectres ^{31}P , ^{13}C et ^{43}Ca ont été enregistrés découplés du proton lors de l'acquisition, afin d'éviter un élargissement des résonances dû à l'influence de l'interaction dipolaire avec les protons.

II-1 / Etat de l'art : Spectroscopie RMN à l'état solide

Dans ce paragraphe, nous allons discuter de l'analyse par RMN d'apatites de synthèse et biologiques. Nous illustrerons en partie la discussion en utilisant des spectres d'échantillons d'hydroxyapatite stœchiométrique **HA** et d'**os sec**, qui sont tout à fait représentatifs de ceux trouvés dans la littérature.

L'échantillon d'**os sec** que nous avons étudié est un échantillon d'os séché à température ambiante, découpé finement au scalpel, puis broyé en poudre dans un mortier. C'est principalement sous cette forme que l'os est étudié dans la littérature. De ce fait, il est totalement ou partiellement déshydraté.

Le protocole de synthèse détaillé de l'hydroxyapatite stœchiométrique **HA** est décrit au sein de la section « Matériels et méthodes » en annexe de ce manuscrit. Indiquons seulement ici que **HA** fut synthétisé sous une atmosphère d'azote. Cette précaution permet d'éviter une incorporation trop importante de carbonates par le biais de la solvation du $\text{CO}_{2(g)}$ atmosphérique au sein de la solution réactionnelle.

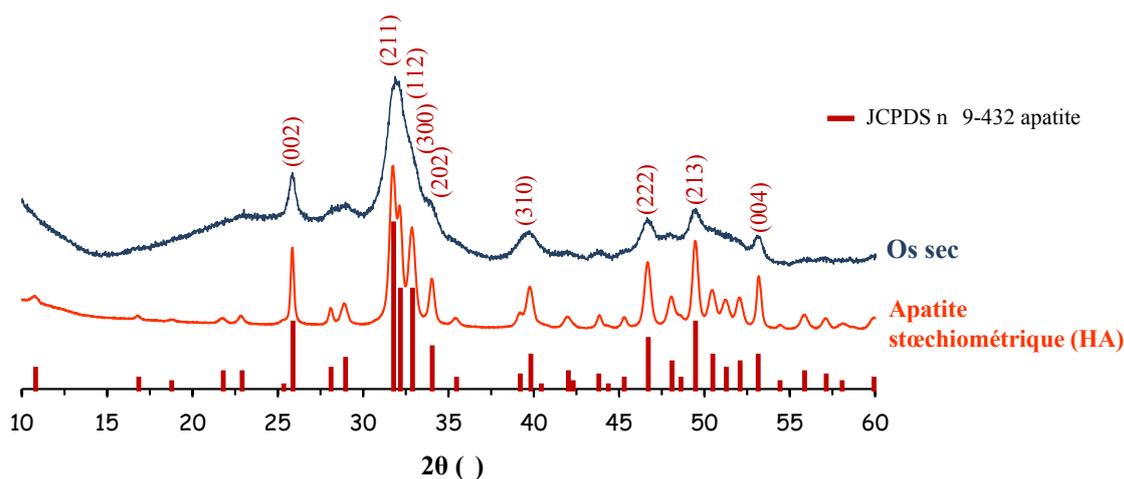


Figure 34. Comparaison entre le diffractogramme de rayons X sur poudre obtenu avec le rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$ d'un échantillon d'os sec, et celui d'une apatite de synthèse proche de la stœchiométrie (HA). En rouge apparaissent la référence standard de l'hydroxyapatite (fiche n° 9-432), ainsi que l'indexation des principales raies de diffraction.

Une étude par DRX de l'**os sec** et de **HA** (cf. **Figure 34**) indique que seule une phase cristalline d'apatite est détectée aussi bien pour l'**os sec** que pour **HA**. Le collagène au sein de l'échantillon d'os sec est observable sous la forme d'un très large signal entre 15° et

30° environ, caractéristique d'une phase amorphe. Les raies de diffraction du minéral osseux apparaissent élargies par rapport à celles de HA. Ceci est particulièrement frappant en ce qui concerne les raies de diffraction (211), (112), (300) et (202) ; lesquelles ne peuvent pas être distinguées individuellement dans le cas de l'échantillon d'os sec. C'est en raison de cet important élargissement, que le minéral osseux est décrit comme étant une apatite « faiblement cristallisée ». Cette faible cristallinité est souvent attribuée à un désordre structural important. Celui-ci serait causé par la présence de nombreuses substitutions (notamment par des ions carbonates), lesquelles engendrent la création de nombreuses lacunes (principalement en ions hydroxyles) au sein du réseau cristallin de l'apatite osseuse (*cf.* I-3-b et I-3-c). Néanmoins, l'élargissement des raies de diffraction du minéral osseux provient aussi sans doute d'une très faible taille des domaines cohérents.

II-1-1) Caractérisation d'apatites de synthèse et biologique par RMN simple impulsion des noyaux ^1H & ^{31}P

II-1-1-a) L'hydroxyapatite

Les premières études par RMN en rotation à l'angle magique des noyaux ^{31}P et ^1H de phases de phosphate de calcium et d'hydroxyapatite en particulier datent des années 80. La RMN MAS du noyau ^{31}P a d'abord été utilisée pour caractériser les ions orthophosphates (PO_4^{3-}), hydrogénophosphates (HPO_4^{2-}) et dihydrogénophosphates (H_2PO_4^-) dans différentes phases de phosphates de calcium (monocalciumphosphate $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, monétite CaHPO_4 , brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, OCP $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, hydroxyapatite), à la fois, par leur déplacement chimique isotrope δ_{iso} et leur anisotropie de déplacement chimique (CSA) [7]. Les chercheurs se sont rapidement rendu compte que le CSA augmente considérablement dès que l'on protonne un ion orthophosphate, et dans le même temps, que le $\delta_{\text{iso}}(^{31}\text{P})$ a tendance à diminuer [8], [9]. Une autre problématique était de savoir si une ou plusieurs phases pouvaient être détectées par RMN ^{31}P dans les apatites carbonatées déficientes en calcium, car elles étaient soupçonnées résulter de la coexistence de plusieurs phases [8].

Les premiers spectres RMN MAS du noyau ^1H , sont apparus plus tard dans la littérature en 1987, lors de l'étude de phases de phosphates de calcium dont de l'hydroxyapatite et une série de fluorapatites. Le but était de caractériser les différents environnements chimiques des ions hydroxyles par leur déplacement chimique [10]. Plus tard,

en 1994, il apparait les premiers spectres ^1H enregistrés avec un découplage homonucléaire ^1H - ^1H de type CRAMPS afin d'améliorer la résolution spectrale [11]. Différentes phases de phosphates de calcium dont de l'hydroxyapatite ont été analysées par cette technique, ainsi que de l'os sec.

D'une manière générale, avant de s'atteler à l'étude d'un matériau complexe comme le minéral osseux, l'étude des réponses RMN d'un échantillon d'apatite stœchiométrique est un bon point de départ car le système est beaucoup simple.

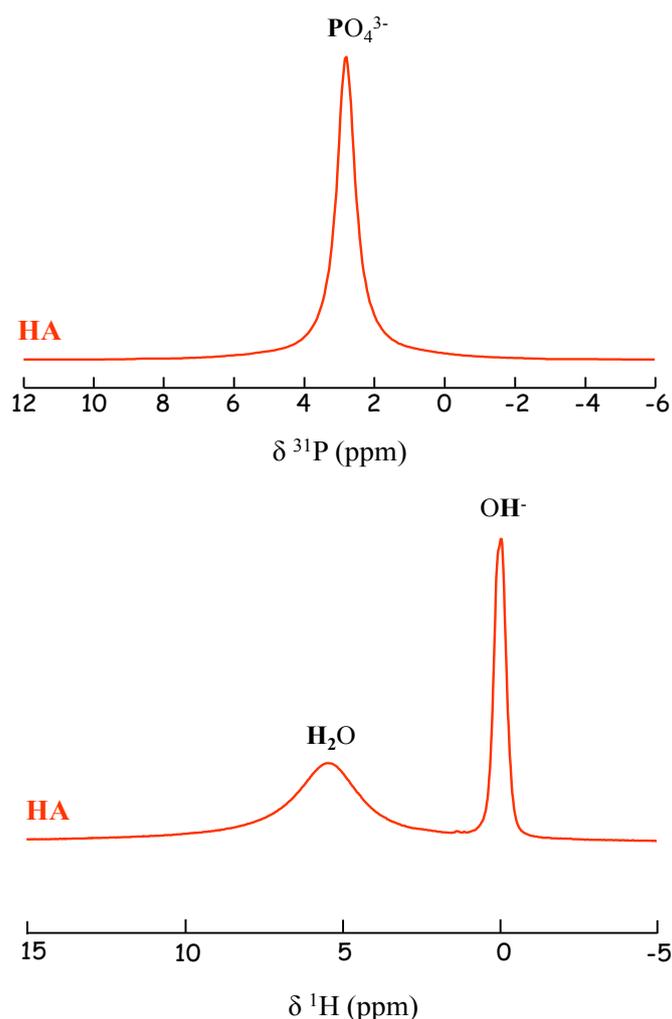


Figure 35. Spectres RMN MAS ^{31}P et ^1H ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz simple impulsion d'un échantillon d'apatite stœchiométrique de synthèse (HA). $B_0 = 7,05$ Tesla

Les spectres RMN MAS simple impulsion des noyaux ^{31}P et ^1H de HA (Figure 35), sont en accord avec la littérature. Le spectre ^{31}P laisse apparaitre une unique résonance attribuée aux ions PO_4^{3-} [7], avec un déplacement chimique centré à $\delta(^{31}\text{P}) = 2,8$ ppm. De son

côté, le spectre ^1H laisse apparaître 2 résonances, l'une très intense et étroite centrée à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, et l'autre peu intense et large centrée à $\delta(^1\text{H}) = 5,5$ ppm. La première est attribuée aux ions OH^- [7], dont la détection s'avère ici aisée. La seconde correspond aux molécules d'eau adsorbées en surface des particules. Ainsi, une seule résonance est détectée pour les ions PO_4^{3-} et OH^- . Ce résultat est en accord avec la cristallographie, laquelle prévoit l'existence d'un unique site cristallographique pour chacun de ces ions (*cf.* **Figure 11**). La signature à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm des ions OH^- localisés dans un environnement chimique cristallisé sous la forme d'apatite est singulière. En effet, ces derniers sont alignés au sein des tunnels II (*cf.* I-3-b). Il se trouve que la distance $\text{OH}\cdots\text{O}$ entre deux ions hydroxyles adjacents au sein de ces tunnels est de $\sim 2,5$ Å. Cette distance importante qui ne permet pas la création de fortes liaisons H, est souvent évoquée pour justifier leur déplacement chimique blindé.

II-1-1-b) Le minéral osseux

De telles caractérisations par RMN MAS simple impulsion des noyaux ^{31}P et ^1H ont également été entreprises pour des échantillons de tissu osseux. Jusqu'à très récemment, les échantillons d'os étudiés par RMN se trouvaient sous forme de poudre sèche. Le plus souvent, ils sont stockés dans de l'azote liquide, puis lyophilisés, et enfin broyés voire cryo broyés [12]–[22]. Comme pour les apatites carbonatées déficientes en calcium, une des motivations de l'étude du minéral osseux mature (os de poulet de 5, 10 semaines, et 1 an) était de savoir si une ou plusieurs phases pouvaient être détectées par RMN ^{31}P [23]. De la même manière, une autre motivation de ces premières études était de détecter les premiers minéraux déposés lors de la biominéralisation osseuse *via* l'étude d'os d'embryons de poulet [23].

La grande majorité des atomes de phosphore du tissu osseux sont localisés au sein du minéral. En effet, étant donné que la proportion massique en minéral au sein du tissu osseux est d'environ 64 % (*cf.* **Tableau 1**, section I-1-a, pour un humain d'âge adulte), et que la proportion massique en phosphore au sein du minéral osseux est d'environ 15 % (*cf.* **Tableau 3**, section I-3-d), alors la proportion massique en phosphore inorganique au sein du tissu osseux atteint la valeur importante d'environ 10 %. Le reste, minoritaire, sont des atomes de phosphores organiques situés au sein de résidus d'acides aminés phosphorylés, ou bien au sein des têtes polaires des phospholipides de la membrane plasmique des cellules. De ce fait, toute expérience de RMN basée sur le noyau ^{31}P effectuée sur un échantillon de tissu osseux, même intact, aura l'avantage d'y détecter majoritairement le minéral.

Le spectre RMN MAS simple impulsion du noyau ^{31}P d'un échantillon d'**os sec** apparaît au sein de la **Figure 36-a**. Ce dernier est en accord avec la littérature, et laisse apparaître une unique résonance avec un déplacement chimique centré à $\delta(^{31}\text{P}) = 3,2$ ppm. Une des particularités de la résonance ^{31}P d'une apatite osseuse est qu'elle est légèrement asymétrique, et présente un léger épaulement sur son flanc gauche (vers $\delta(^{31}\text{P}) \sim 6,0$ ppm, flèche rouge), dont l'origine sera discutée ultérieurement. Cette forme de raie typique (position, largeur et asymétrie) se retrouve pour divers échantillons d'os étudiés dans la littérature: os humain, os bovin et os de rat [12], [22], [24]. Elle semble ainsi être caractéristique du minéral osseux mature *in vivo*.

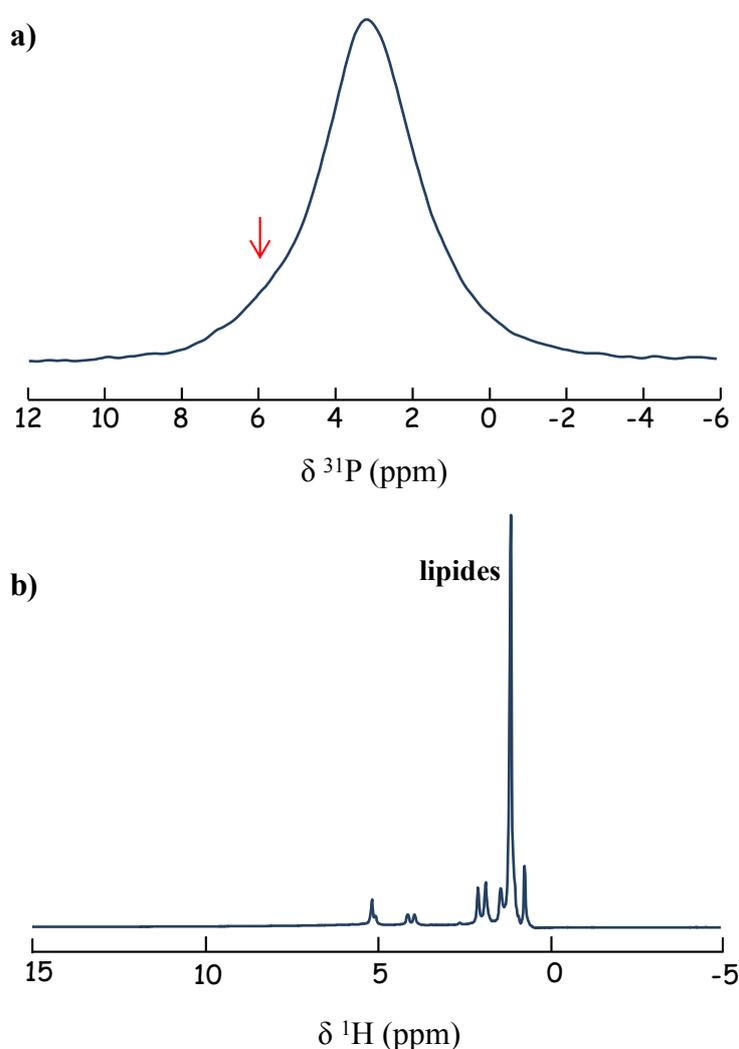


Figure 36. Spectres RMN MAS simple impulsion des noyaux ^{31}P (a) et ^1H (b) d'un échantillon d'**os sec** ($\nu_{rot} = 14$ kHz). $B_0 = 7,05$ Tesla.

Pour rappel, le déplacement chimique ^{31}P de HA est de $\delta(^{31}\text{P}) = 2,8$ ppm. Cette variation du $\delta(^{31}\text{P})$ est la première différence notable qui existe entre le spectre ^{31}P d'une apatite osseuse et celui d'une apatite stœchiométrique. Il a été montré que le déplacement chimique $\delta(^{31}\text{P})$ augmente (de 2,8 à 3,2 ppm), à mesure que croît le taux de carbonatation d'apatites carbonatée de synthèse [8], [13]. Ceci est en adéquation avec les proportions massiques en CO_3^{2-} respectives de ces deux échantillons, puisque le taux de carbonates est bien plus élevé pour l'apatite osseuse d'une brebis âgée de 2 ans (~8,6 % mesurées par ATG) que pour une hydroxyapatite stœchiométrique.

La seconde différence concerne la largeur spectrale des résonances ^{31}P de ces deux échantillons, laquelle est beaucoup plus importante pour l'**os sec** (largeur à mi-hauteur, FWHM, = 360Hz) que pour **HA** (FWHM = 80 Hz). Cela signifie que la distribution des environnements chimiques phosphore au sein de l'apatite osseuse est plus importante que celle au sein de l'échantillon **HA**. La spectroscopie RMN ^{31}P met donc en évidence un désordre structural local pour l'os, qui serait induit par la présence de substitutions ioniques [25].

La RMN du proton a été relativement peu utilisée car les protons du tissu osseux se trouvent majoritairement situés au sein de la matière organique (collagène, protéines non-collagéniques, chaînes aliphatiques des acides gras qui constituent les phospholipides de la membrane plasmique des cellules...), et au sein des molécules d'eau. Ceci est confirmé par l'acquisition du spectre RMN MAS simple impulsion du noyau ^1H d'un échantillon d'**os sec** (*cf.* **Figure 36-b**). En effet, celui-ci est dominé par des signaux très fins provenant principalement des protons situés au sein de lipides ($\delta(^1\text{H})$ entre 0,5 et 2,5 ppm). Par ailleurs, même en agrandissant la zone concernée, aucun signal provenant des ions OH^- du minéral osseux n'est observable à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm. Il est à noter que l'acquisition d'un spectre ^1H enregistré avec un découplage homonucléaire ^1H - ^1H de type CRAMPS afin d'améliorer la résolution spectrale ne permet pas non plus mettre en évidence le signal des ions hydroxyles [11].

Ainsi, l'acquisition d'un spectre RMN MAS simple impulsion du noyau ^1H , à partir d'un échantillon d'os, ne permet pas d'étudier directement les espèces protonées du minéral osseux. De plus, notons qu'il n'est pas possible de distinguer par des expériences

RMN monodimensionnelle des noyaux ^1H et ^{31}P , les contributions individuelles des domaines apatitique et non apatitique évoqués au **chapitre I**.

II-1-2) RMN CP MAS 1D du noyau ^{31}P

Rappelons que les noyaux ^1H et ^{31}P sont présents au sein d'un cristal d'apatite, et qu'ils ne sont éloignés que de quelques angströms seulement (distance la plus courte : 3,85 Å). Il se trouve que la RMN à l'état solide peut tirer profit de cette caractéristique. En effet, ces faibles distances engendrent un fort couplage dipolaire hétéronucléaire ^1H - ^{31}P qui peut être utilisé afin de transférer l'aimantation des noyaux ^1H vers les noyaux ^{31}P par le biais de la technique de polarisation croisée, CP. Ce couplage dipolaire est proportionnel à $1/r^3$, où r représente la distance internucléaire. Voilà pourquoi le transfert d'aimantation sera d'autant plus efficace que les distances entre les noyaux ^1H et ^{31}P sont courtes.

La technique CP ^1H - ^{31}P a été largement employée pour sonder l'environnement protonné des phosphates de calcium et du minéral osseux, et ce dès les années 1980. En particulier, la technique CP (ou des séquences basées sur la CP) a été employée dans le but de caractériser les ions HPO_4^{2-} des phases de phosphates de calcium, mais aussi pour rechercher leur présence dans des apatites carbonatées déficientes en calcium [7], [8], et dans le minéral osseux [23]. Les techniques dérivées de la CP comme le « dipolar suppression » [8], [23], l'IRCP (Inversion Recovery Cross Polarization) [15], [26], ou comme l'analyse de la dynamique de CP *via* la variation du temps de contact [27], en combinaison avec une analyse du déplacement chimique ^{31}P et du CSA, ont permis de proposer la présence d'une quantité non négligeable d'ions HPO_4^{2-} , à la fois au sein d'hydroxyapatites carbonatées déficientes en calcium, qu'au sein du minéral osseux [15]. Il est à noter que ces ions HPO_4^{2-} étaient proposés comme faisant partie de la structure apatitique sous forme de substitutions ioniques.

II-1-3) Proposition de l'existence d'un domaine non-apatitique : RMN 2D ^1H - ^{31}P

Nous avons mentionné auparavant que l'acquisition d'un spectre RMN MAS simple impulsion du noyau ^1H , à partir d'un échantillon d'os, ne permet pas d'étudier directement les espèces protonnées du minéral osseux. Cette impasse apparente peut néanmoins être contournée à l'aide de l'utilisation de la RMN bidimensionnelle. En effet,

l'expérience de polarisation croisée peut être convertie en une expérience bidimensionnelle par l'introduction d'un temps d'évolution t_1 après l'impulsion ^1H (séquence de corrélation hétéronucléaire HetCor décrite dans l'introduction de ce chapitre). Elle permet ainsi de révéler les environnements chimiques des noyaux ^1H et ^{31}P au sein ou à proximité immédiate du minéral osseux de façon *ex vivo*, c'est à dire directement à partir d'un échantillon d'os. Voilà pourquoi cette dernière est un outil de choix largement utilisé pour l'étude des apatites biologiques de l'os ou de la dentine [11], [14], [21], [22], [27], [28], mais également pour celles des matériaux hybrides modèles du tissu osseux [29]–[33].

La **Figure 37** présente le spectre HetCor 2D ^1H - ^{31}P d'un échantillon d'**os sec**. Le spectre est typique de ce qu'on rencontre dans la littérature [12], [14]. Les signaux au centre du spectre 2D sont appelés taches de corrélations. Ces dernières révèlent les corrélations spatiales qui existent entre les différents groupements chimiques qui composent le minéral. Dans la même figure est présenté le spectre 2D ^1H - ^{31}P HetCor de **HA** à titre de comparaison. Un temps de contact de $t_{\text{CP}} = 1$ ms a été choisi afin d'optimiser le rapport S/B de la tache de corrélation (ii).

Une seule tache de corrélation est observée pour **HA**, en accord avec les données de la cristallographie. Par analogie avec l'interprétation des spectre ^{31}P et ^1H monodimensionnels, il s'agit donc de la corrélation spatiale entre les ions PO_4^{3-} ($\delta(^{31}\text{P}) = 2,8$ ppm) et les ions OH^- ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm).

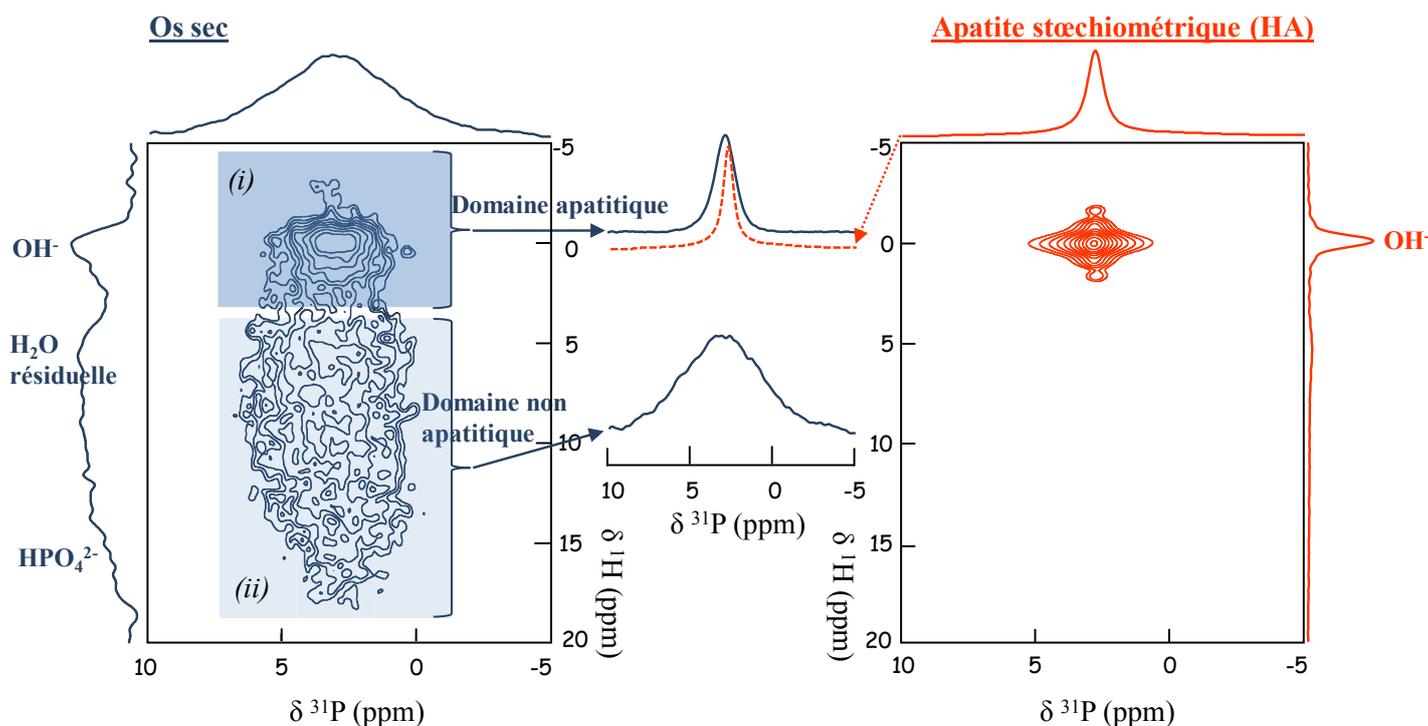


Figure 37. Spectres 2D HetCor ^1H - ^{31}P d'un échantillon d'**os sec** et de **HA** ($v_{\text{rot}} = 14 \text{ kHz}$, $t_{\text{CP}} = 1 \text{ ms}$). (i) la tache de corrélation bleu foncée (domaine apatitique), et (ii) la tache de corrélation bleu claire (domaine non-apatitique). L'intégration de chacune de ces taches selon la voie F2 révèle les résonances ^{31}P des domaines apatitique et non-apatitique du minéral osseux. $B_0 = 7,05 \text{ Tesla}$

En revanche, deux taches de corrélations (i) et (ii) sont observées pour l'échantillon d'**os sec**, mettant en jeu des corrélations spatiales entre noyaux ^1H et ^{31}P distinctes. Par analogie avec la carte 2D de **HA**, la tache de corrélation bleu foncée (i) correspond à un domaine apatitique cristallisé du minéral osseux, où il existe une corrélation spatiale entre les ions OH^- ($\delta(^1\text{H}) = 0 \text{ ppm}$) et les ions PO_4^{3-} ($\delta(^{31}\text{P}) \sim 3,2 \text{ ppm}$). Ainsi, l'expérience HetCor ^1H - ^{31}P permet la détection des ions OH^- au sein du minéral osseux à partir d'un échantillon d'os ni traité thermiquement ni chimiquement. Alors que de leur côté, les spectroscopies plus usuelles (infrarouge [19] ; Raman, et RMN ^1H monodimensionnelle, cf. **Figure 36**) ne le permettent pas. De cette manière, c'est l'utilisation par Charles Bronnimann *et al.* de cette expérience HetCor ^1H - ^{31}P en 1994 qui a permis pour la toute première fois la détection d'ions OH^- au sein du minéral osseux à partir d'un échantillon d'os broyé mais non traité thermiquement [11]. La controverse quant à la présence ou non de ces ions OH^- au sein du minéral osseux fut définitivement close en 2003 grâce aux travaux plus poussés menés par l'équipe de Jerome Ackerman (et ceci toujours à l'aide de l'expérience HetCor ^1H - ^{31}P). Ces derniers ont quantifié les ions hydroxyles du minéral osseux, et conclu

qu'ils étaient présents en sous stœchiométrie (environ 20 % du total attendu dans le cas d'une apatite stœchiométrique) [22].

Par ailleurs, faire la somme des tranches ^{31}P de la tache de corrélation (i) selon la voie F2 permet de recréer le spectre phosphore du domaine apatitique (voir le centre de la **Figure 37**). Celui-ci présente une résonance élargie (FWHM ~ 270 Hz) par rapport à celle de **HA**, signe qu'un désordre structural existe au sein du domaine apatitique cristallisé du minéral osseux.

Quid dorénavant de la seconde tache de corrélation (ii) détectée dans le cas de l'échantillon d'os sec (cf. **Figure 37**) La somme des tranches ^{31}P de cette dernière conduit à une résonance ^{31}P centrée sur le même déplacement chimique ($\delta(^{31}\text{P}) \sim 3.2$ ppm) mais élargie (FWHM ~ 640 Hz), laquelle corrèle avec un signal ^1H qui s'étend de 5 à 18 ppm. Il apparaît ainsi que la distribution chimique de ces espèces est largement plus importante que celle présente dans le domaine apatitique. Ainsi, cette deuxième tache a été attribuée aux espèces localisées dans un second domaine existant au sein du minéral osseux, qui a pris le nom de « domaine non-apatitique » dans la littérature [34] (cf. I-3-g). Charles Bronnimann *et al.* [11] sont les premiers à avoir mis en évidence ce second domaine. Ils l'avaient décrit à l'époque comme étant dû à « un second site phosphore en interaction avec des molécules d'eau de structure » [11]. En effet, par analogie avec des phosphates de calcium de référence (cf. **Figure 60**), le signal étendu de 5 à 18 ppm sur la dimension proton est attribué à des molécules d'eau (~ 5 ppm) et des ions hydrogénophosphates (d'environ 7 à 18 ppm). Ces attributions seront discutées lors du Chapitre III.

Cela signifie que deux domaines peuvent être distingués au sein du minéral osseux grâce à l'expérience HetCor ^1H - ^{31}P .

II-2 / Etude de l'os frais : caractère hydrophile du minéral osseux

Il est connu que certaines molécules d'eau se trouvent au contact des cristaux d'apatite osseuse. Il s'agit de l'eau dite « eau interstitielle », laquelle est infiltrée à l'intérieur de la porosité collagène-apatite (ou PCA, voir section I-4). Dès lors, un des objectifs de ces travaux était d'étudier le minéral osseux dans son état d'hydratation naturel (**os frais**), afin de conserver ces molécules d'eau présentes aux interfaces.

En effet, Erin Wilson *et al.* ont proposé, à partir d'expériences RMN, que la déshydratation d'un échantillon d'os conduisait à la perte de molécules d'eau « interstitielle » se trouvant à la surface des cristaux du minéral osseux, perte qui serait irréversible (*cf.* **Figure 27**) [20]. Ceci pourrait ainsi modifier drastiquement les interactions d'un cristal d'apatite avec ses voisins, ainsi que celles avec la matrice organique (*cf.* I-4). Puis, l'équipe de Ayyalusamy Ramamoorthy a mis en évidence, par RMN ^{13}C , que la déshydratation du tissu osseux conduisait à une altération définitive de la matrice de collagène [35]. Il est donc établi aujourd'hui que l'étude du tissu osseux dans son état d'hydratation naturel est un pré-requis afin de préserver les interfaces intactes.

On peut s'étonner ainsi que, jusqu'à présent, cette approche n'ait pas été systématique lors de l'étude du minéral osseux. Cependant, les spectroscopistes RMN ont souvent tendance à déconsidérer cette option. En effet, ces derniers sont généralement enclins à étudier les échantillons solides dans un état sec et finement broyé, afin de faciliter le remplissage du rotor ainsi que sa rotation à l'angle magique

Ainsi, afin de garder le minéral osseux dans son état d'hydratation naturel, les expériences de RMN réalisées lors de cette thèse, le furent dans un laps de temps le plus court possible après l'extraction de l'échantillon de tissu osseux de chez l'animal. Ce laps de temps correspond au trajet de l'hôpital jusqu'au laboratoire, ainsi qu'à la découpe grossière de l'échantillon au scalpel afin d'en obtenir des fragments suffisamment petits pour pouvoir être insérées dans le rotor (soit environ 2 heures). Cette procédure permet d'étudier ce que l'on appellera un échantillon d'**os frais**.

II-2-1) Os frais

II-2-1-a) RMN simple impulsion des noyaux ^1H & ^{31}P

Comme souligné précédemment, les protons du tissu osseux se trouvent majoritairement situés au sein de la matière organique et au sein des molécules d'eau. Ceci est confirmé par l'acquisition du spectre RMN MAS simple impulsion du noyau ^1H d'un échantillon d'**os frais** (cf. **Figure 38**). En effet, celui-ci est dominé par des signaux très fins provenant des protons situés au sein de lipides ($\delta(^1\text{H})$ entre 0,5 et 2,5 ppm), ainsi qu'au sein des molécules d'eau libre ($\delta(^1\text{H}) \sim 4,8$ ppm). Comme dans le cas de l'**os sec**, même en agrandissant la zone concernée, aucun signal provenant des ions OH^- du minéral osseux n'est observable à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm.

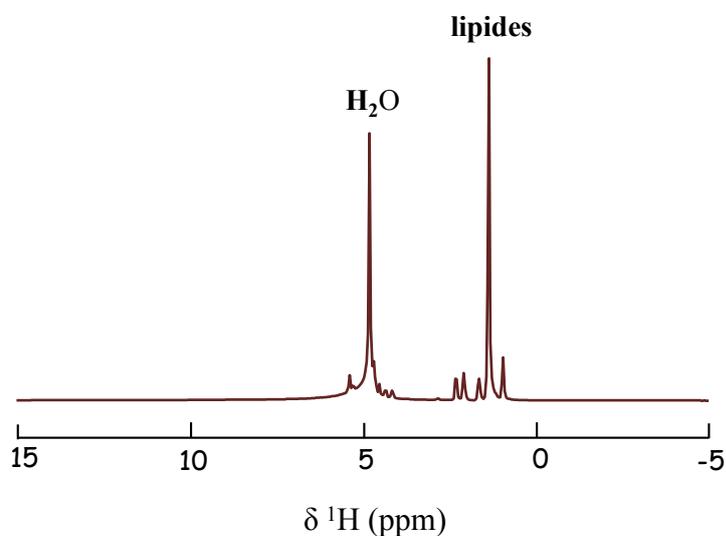


Figure 38. Spectres RMN MAS simple impulsion ^1H d'un échantillon d'**os frais** ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz). $B_0 = 7,05$ Tesla.

En revanche, le spectre ^{31}P MAS d'un échantillon d'**os frais** est strictement identique à celui d'un échantillon d'**os sec** en termes de position, largeur et forme de raie. (cf. **Figure 39**). Cela signifie que la déshydratation de l'os n'entraîne pas de modifications drastiques de l'environnement chimiques des ions phosphates du minéral osseux.

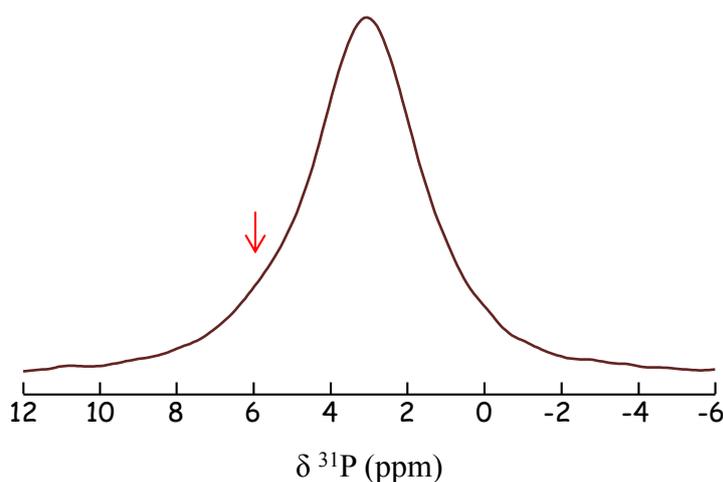


Figure 39. Spectres RMN MAS simple impulsion ^{31}P d'un échantillon d'os frais ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz). $B_0 = 7,05$ Tesla.

II-2-1-b) Spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P

La **Figure 40** présente le spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P d'un échantillon d'os frais ainsi que le spectre du même échantillon une fois déshydraté (os sec), tous deux enregistrés dans les mêmes conditions à savoir avec un temps de transfert de polarisation $t_{\text{CP}} = 10$ ms (et non 1 ms comme sur la **Figure 37**). L'observation de la carte HetCor de l'échantillon d'os frais révèle deux taches de corrélations centrées au même déplacement chimique ($\delta(^{31}\text{P}) \sim 3,2$ ppm) : tout d'abord la tache (iii) qui correspond au domaine apatitique cristallisé du minéral osseux (corrélation spatiale entre les ions OH^- ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm) et les ions PO_4^{3-} ($\delta(^{31}\text{P}) \sim 3,2$ ppm)) ; et ensuite, une nouvelle tache de corrélation, la tache (iv). Celle-ci est très intense, plus large sur la dimension ^{31}P et plus étroite sur la dimension ^1H . Les noyaux ^{31}P associés à cette tache corrént avec des molécules d'eau, étant donné le déplacement chimique caractéristique à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm. Cette résonance ne corréle pas avec les ions OH^- du domaine apatitique quelque soit le temps de contact utilisé (de 100 μs à 10 ms). Ces molécules d'eau peuvent être qualifiées de « rigides » car elles participent au phénomène de polarisation croisée. De cette manière, ce spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P d'un échantillon d'os frais permet de mettre en évidence la présence d'une importante quantité de molécules d'eau en interaction forte avec le minéral *in vivo*.

Un fois l'os séché, son spectre est équivalent à celui de la **Figure 37**, et on retrouve un spectre 2D « standard » tel qu'il apparait dans la littérature. On remarque que la tache de corrélation relative au domaine apatitique ne subit pas d'évolution lors de la déshydratation. En effet, il est constaté que, à la fois pour l'os frais et l'os sec, le spectre ^{31}P

provenant du domaine apatitique cristallisé correspond à une résonance étroite d'allure plutôt lorentzienne ($\delta(^{31}\text{P}) = 3,1$ ppm et FWHM ~ 270 Hz). La déshydratation n'engendre donc aucune modification structurale du domaine apatitique (cf. **Figure 41**).

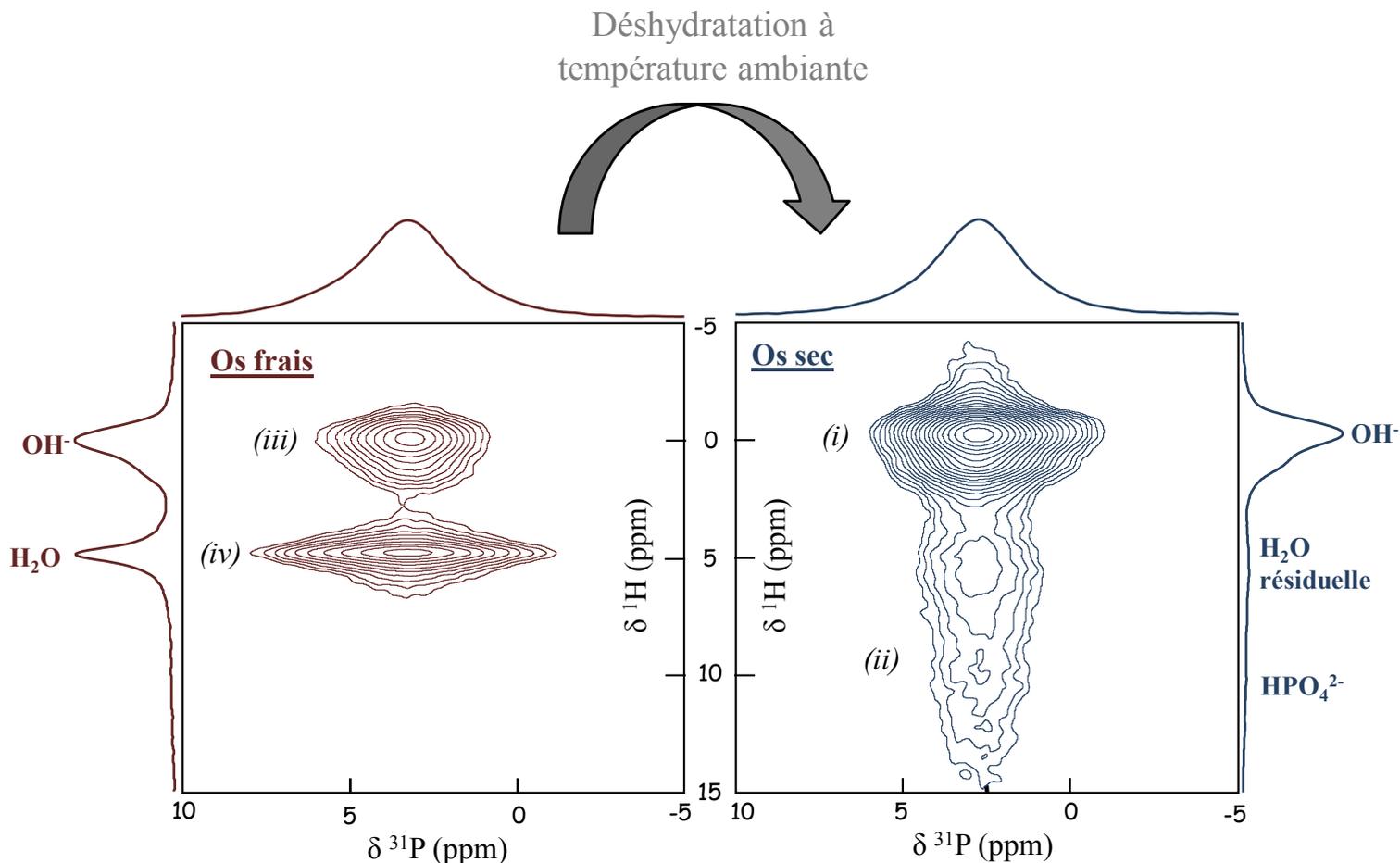


Figure 40. Comparaison entre le spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P d'un échantillon d'**os frais** ($\nu_{\text{rot}} = 8\text{kHz}$, $t_{\text{CP}} = 10$ ms), et celui du même échantillon une fois déshydraté (**os sec**, $\nu_{\text{rot}} = 8$ kHz, $t_{\text{CP}} = 10$ ms). A travers l'observation de la tâche de corrélation (iv), la carte 2D de l'échantillon d'os frais révèle la présence d'une quantité importante de molécules d'eau rigides en interaction avec le minéral osseux. Ces dernières disparaissent suite à la déshydratation de l'échantillon (os sec). $B_0 = 7,05$ Tesla

En revanche, on constate une évolution de la seconde tâche de corrélation attribuée au domaine non-apatitique. Celle-ci (tache (iv)) disparaît et laisse apparaître un signal peu intense et très étendu sur la dimension ^1H (tache (ii) ; $\delta(^1\text{H}) = 5 - 18$ ppm) caractéristique de l'os sec. En revanche, le spectre ^{31}P correspondant au domaine non-apatitique varie peu (cf. **Figure 41**). En effet, il est constaté qu'à la fois pour l'os frais et pour l'os sec, le spectre ^{31}P du domaine non-apatitique correspond à une résonance large d'allure plutôt gaussienne ($\delta(^{31}\text{P}) = 3,2$ ppm, et FWHM \sim de 640 à 670 Hz), et seul un léger

élargissement du signal ^{31}P est observé lorsque l'échantillon de tissu osseux est déshydraté. Par ailleurs, l'allure gaussienne et la largeur importante du signal ^{31}P du domaine non-apatitique traduisent un désordre structural important.

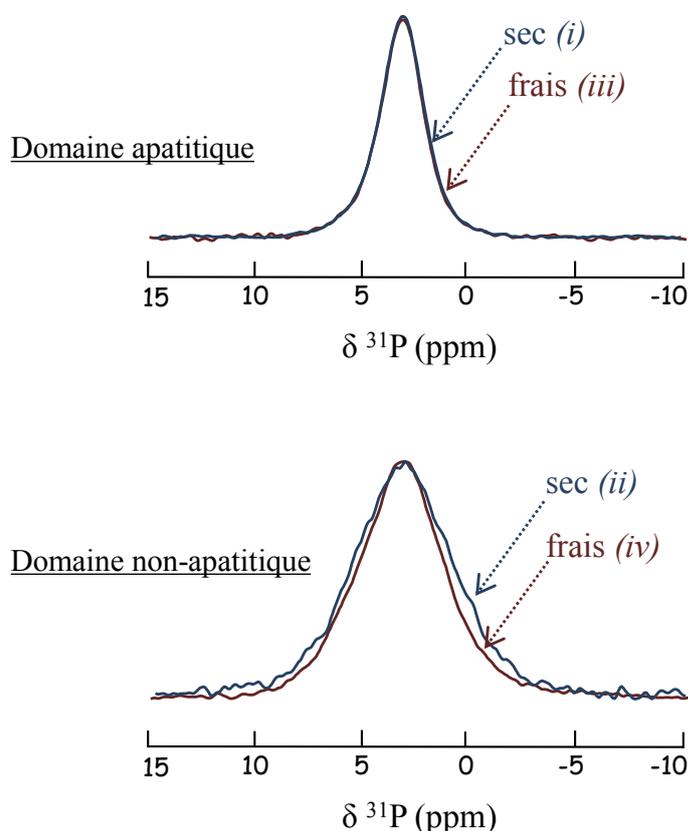


Figure 41. Comparaison entre les signaux ^{31}P provenant respectivement du domaine apatitique et du domaine non-apatitique, en fonction du degré d'hydratation de l'échantillon de tissu osseux. Ces signaux ont été obtenus en intégrant chacune des taches de corrélations (i), (ii), (iii) et (iv) de la carte 2D HetCor de la **Figure 38** selon la voie F2.

Les résonances ^{31}P respectives de chaque domaine sont ainsi proches, quel que soit le degré d'hydratation de l'échantillon de tissu osseux. Ceci est cohérent avec le fait que les spectres ^{31}P MAS de l'os sec et de l'os intact sont identiques. Néanmoins, d'autres résultats antérieurs, obtenus sur une apatite carbonatée de synthèse, ont montré que le domaine non-apatitique était modifié de façon irréversible après déshydratation [36], [37].

II-2-1-c) Dynamique de transfert de polarisation croisée $^1\text{H}\rightarrow^{31}\text{P}$

La nature « rigide » des molécules d'eau à proximité du minéral osseux *in vivo* peut être vérifiée en analysant la dynamique de transfert de polarisation $^1\text{H}\rightarrow^{31}\text{P}$ lors d'une expérience de CP. Pour ce faire, des spectres 2D HetCor $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ d'un échantillon d'os frais ont été enregistrés en variant le temps de contact t_{CP} ($t_{\text{CP}} = 100 \mu\text{s}, 250 \mu\text{s}, 500 \mu\text{s}, 1 \text{ ms}, 2 \text{ ms}, 4 \text{ ms}$ et 10 ms). Pour chaque expérience, les spectres ^{31}P reconstitués pour les 2 domaines apatitique et non-apatitique, ont été obtenus en sommant sélectivement les tranches ^{31}P associées. Les intensités de ces signaux ont ensuite été tracées en fonction de la valeur de t_{CP} (cf. **Figure 42**). Il est à noter que les formes de raies ^{31}P des deux domaines, et en particulier leurs positions et leurs largeurs, varient peu en fonction du temps contact ; seule leurs intensités varient fortement.

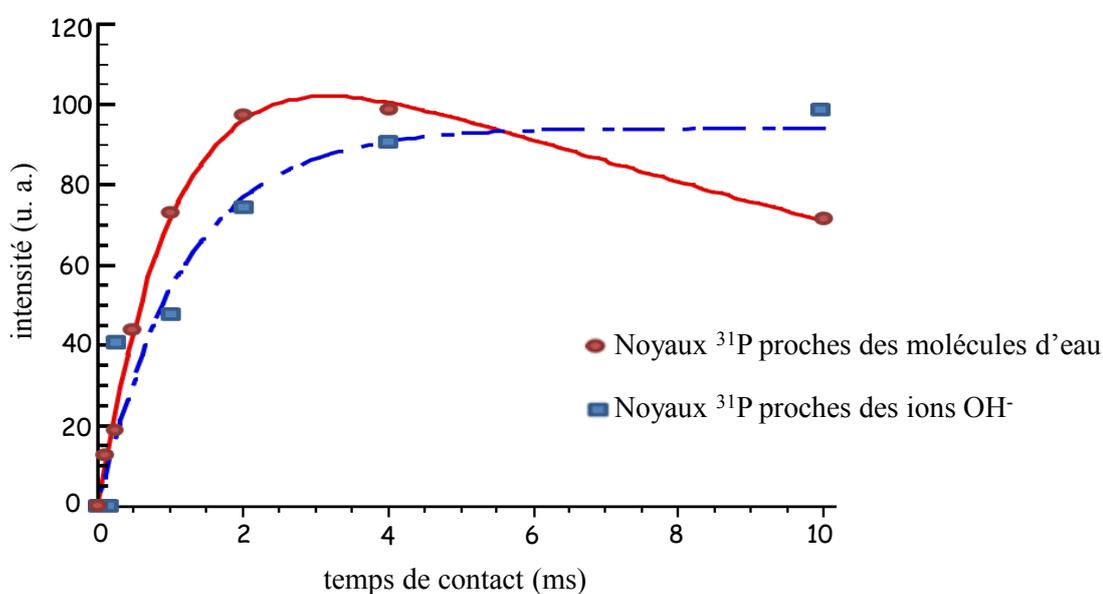


Figure 42. Intensités des projections ^{31}P du domaine apatitique (qui corrèle avec les ions OH^- , tache (iii), carrés bleu) et du domaine non-apatitique (qui corrèle avec les molécules d'eau, tache (iv), cercles rouges), en fonction du temps de contact t_{CP} utilisé ($t_{\text{CP}} = 100 \mu\text{s}, 250 \mu\text{s}, 500 \mu\text{s}, 1 \text{ ms}, 2 \text{ ms}, 4 \text{ ms}$ et 10 ms). Ces spectres ont été tirés d'expériences 2D $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ CP MAS HetCor effectuées sur un échantillon d'os frais.

Les deux courbes obtenues n'ont pas la même allure, démontrant ainsi une différence dans les dynamiques de transfert CP mettant en jeu les ions hydroxyles et les molécules d'eau. Les temps caractéristiques propres à ces deux dynamiques peuvent être extraits en utilisant un modèle théorique, le plus simple étant le modèle dit « I-S » [38].

L'évolution de l'aimantation en fonction du temps de contact t_{CP} peut être alors modélisée de la manière suivante (éq. 1)

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

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} 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.

Pour des valeurs de t_{CP} courtes (0 à 2 ms), la vitesse de transfert CP vers les sites P se trouve être plus rapide à partir des molécules d'eau ($T_{IS} = 1,10$ ms, cercles rouges), qu'à partir des ions OH⁻ ($T_{IS} = 1,20$ ms, carrés bleus). La force motrice du transfert CP étant le couplage dipolaire hétéronucléaire ^1H - ^{31}P , l'intensité du signal ^{31}P dépend alors de la densité locale en noyaux ^1H , ainsi que de la force du couplage dipolaire hétéronucléaire ^1H - ^{31}P . Ce dernier va augmenter quand la distance entre les noyaux couplés diminue, et diminuer quand la dynamique moléculaire augmente. Le transfert d'aimantation relativement lent constaté pour la tache de corrélation (iii) du domaine apatitique, est en accord avec des distances OH⁻...PO₄³⁻ relativement importantes. Le comportement un peu plus rapide observé pour le transfert impliquant les molécules d'eau suggère une faible mobilité de ces dernières, que l'on pourrait qualifier de "molécules d'eau rigides".

De plus, les valeurs des temps de relaxation ^1H dans le repère tournant ($T_{1\rho}(^1\text{H})$), caractéristique de la dynamique de transfert à temps longs ($t_{CP} \geq 2$ ms) ne sont pas les mêmes. L'intensité diminue pour la tache correspondant au domaine non-apatitique ($T_{1\rho}(^1\text{H}) = 15,8$ ms), alors qu'elle reste constante jusqu'à 10 ms pour la tache correspondant au domaine apatitique. Le fait que les spins ^1H impliqués dans le transfert CP possèdent des $T_{1\rho}(^1\text{H})$ différents peut s'expliquer par la présence de deux réservoirs protons séparés, ce qui est compatible avec l'existence de deux domaines minéraux distincts.

II-2-1-d) Echange chimique H₂O/D₂O

Une des caractéristiques du spectre HetCor ^1H - ^{31}P de l'os frais par rapport à celui de l'os sec est la disparition du signal ^1H distribué entre $\delta(^1\text{H}) = 5$ ppm et 18 ppm, et attribué

aux espèces du domaine non-apatitique (H_2O résiduelle et surtout HPO_4^{2-}) (cf. **Figure 40**). Ceci peut être dû au fait que : (i) la résonance intense des molécules d'eau observée pour l'échantillon d'os frais masque ce signal de faible intensité ; ou (ii) qu'il existe un échange chimique rapide entre les protons acides des espèces HPO_4^{2-} et les protons des molécules d'eau. Ces deux hypothèses peuvent être aisément distinguées grâce à une expérience d'échange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$.

Pour ce faire, des fragments d'un échantillon d'os frais ont ainsi été trempés dans du D_2O , cette opération étant renouvelée plusieurs fois afin d'échanger progressivement les protons accessibles. Suite à quoi, un nouveau spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P fut enregistré (cf. **Figure 43**).

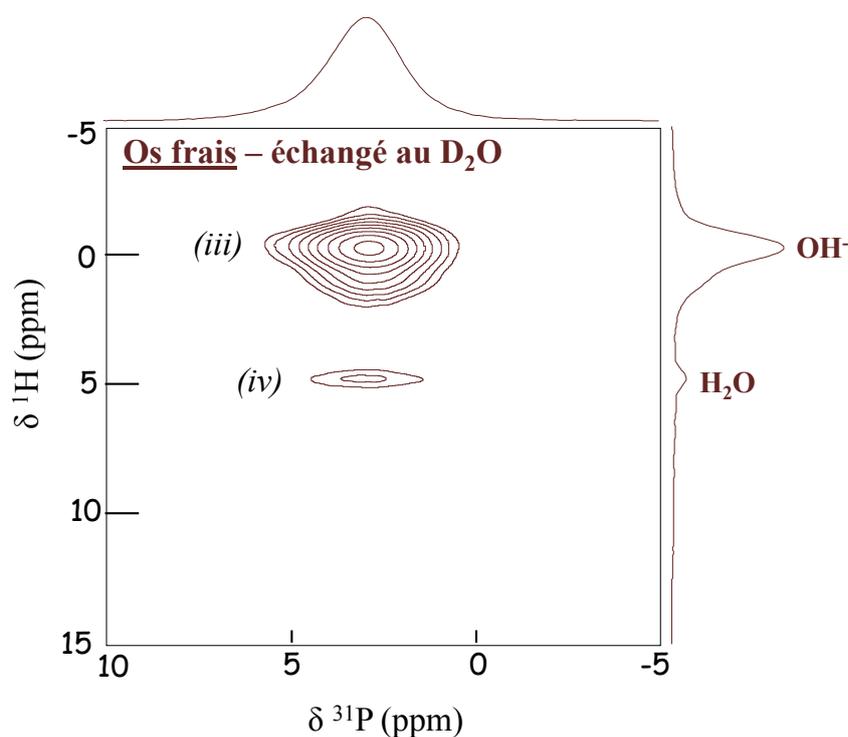


Figure 43. Spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P d'un échantillon d'os frais, lequel a été trempé dans une solution de D_2O ($\nu_{\text{rot}} = 8\text{kHz}$, $t_{\text{CP}} = 10\text{ms}$). Ce dernier révèle la quasi-disparition du signal attribué à des molécules d'eau « rigides » à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9\text{ppm}$, et ne révèle pas non plus l'observation de celui peu intense des espèces HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique de $\delta(^1\text{H}) = 7\text{ppm}$ à 18ppm . $B_0 = 7,05\text{Tesla}$

Cette addition de D_2O sur un échantillon d'os frais a conduit à la quasi-disparition du signal des molécules d'eau « rigides » anciennement observé à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9\text{ppm}$ sur la dimension proton (cf. tache de corrélation (iv)). De plus, le signal attribué aux espèces HPO_4^{2-}

du domaine non-apatitique n'est pas observé, malgré l'absence du signal intense provenant des molécules d'eau.

Plusieurs conclusions peuvent ainsi être tirées de ces observations. **Premièrement, cela permet de constater que ces molécules d'eau rigides sont facilement accessibles par D₂O, résultat compatible avec des molécules d'eau adsorbées en surface du minéral osseux.** A l'inverse, le signal des ions OH⁻ à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm sur la dimension proton n'a subi aucune modification. Deuxièmement, il s'avère que les protons acides attribués à des espèces HPO₄²⁻ (du domaine non-apatitique) ont également été échangés par les deutériums du D₂O. **Cela confirme que ces protons acides ainsi que ceux des molécules d'eau sont impliqués tous les deux dans un échange chimique rapide.** Ce résultat est compatible avec l'existence d'un domaine de surface riche en ions hydrogénophosphates dont les protons sont en échange rapide avec ceux des molécules d'eau interstitielle.

Concernant, le léger signal de molécules d'eau toujours détecté après l'échange au D₂O (*cf.* la tache de corrélation (*iv*)), il pourrait s'agir d'une légère proportion d'eau de surface non échangée, ou bien de molécules d'eau intracristalline non accessibles pour l'échange chimique. Ce signal peut également être mis en perspective avec l'existence de molécules d'eau (~30 %) trouvées au sein de l'os de lapin, lesquelles s'échangent de façon beaucoup plus lente que l'eau libre [39].

II-2-2) Quantification du domaine non apatitique

Nous avons observé que les résonances ³¹P respectives du domaine apatitique et du domaine non-apatitique du minéral osseux se chevauchent, toutes deux centrées vers $\delta(^{31}\text{P}) = 3,2$ ppm (*cf.* **Figure 41**). Néanmoins, il est possible de décomposer le spectre ³¹P quantitatif afin d'estimer la proportion de chaque domaine. Précisons encore que pour ce faire, nous avons utilisé un temps de répétition des impulsions (recycle delay, RD) suffisamment long afin que la relaxation longitudinale des spins ³¹P soit totale ($\text{RD} \geq 5T_1$, soit ~240 sec pour l'échantillon d'**os frais**).

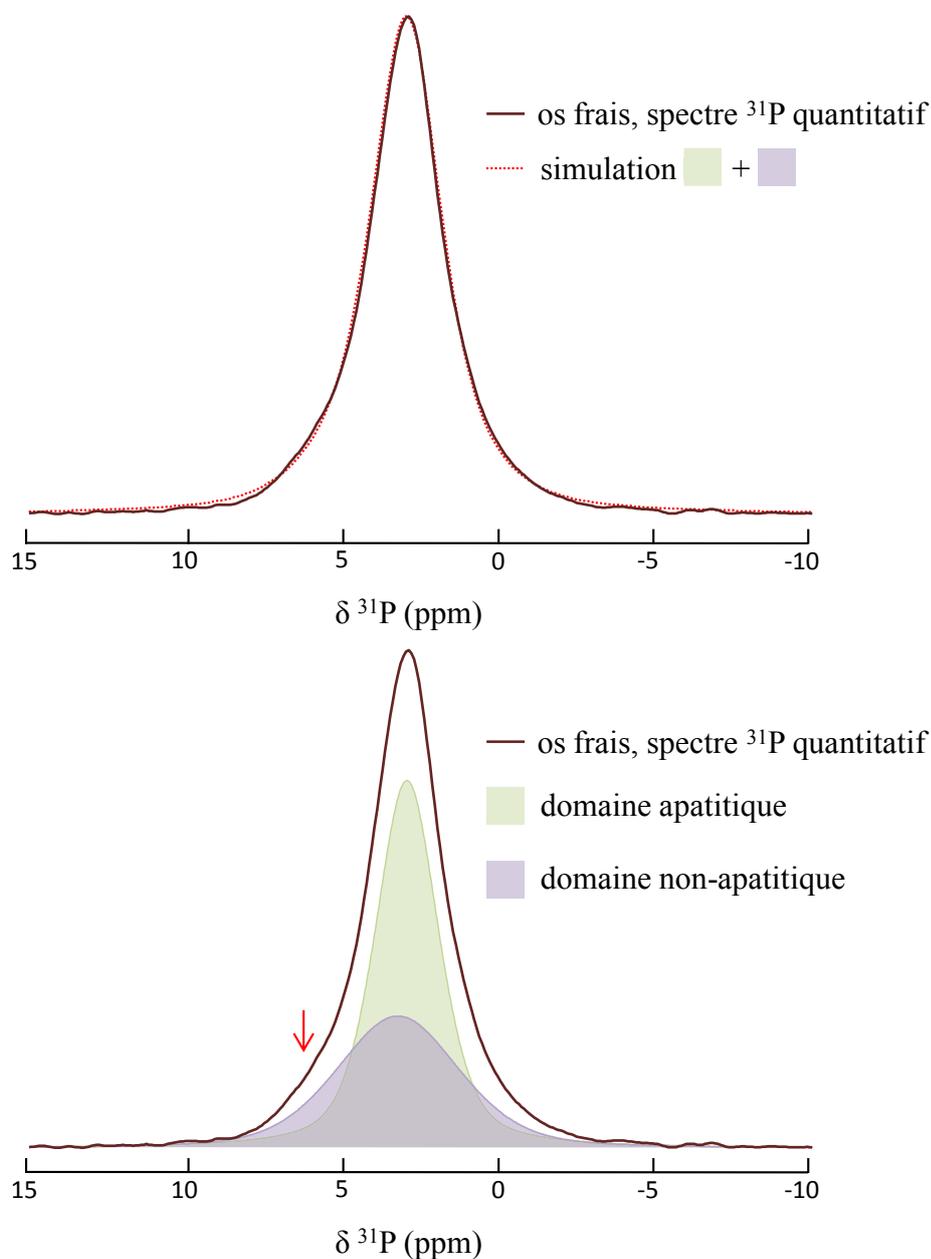


Figure 44. Décomposition du spectre MAS simple impulsion du noyau ^{31}P de l'**os frais** à l'aide de deux contributions extraites du spectre HetCor ^1H - ^{31}P de la **Figure 40** : l'une étroite d'allure plutôt lorentzienne provenant du domaine apatitique cristallisé ($\delta(^{31}\text{P}) = 3,1$ ppm et FWHM ~ 270 Hz) ; et l'autre large d'allure plutôt gaussienne provenant du domaine non-apatitique désordonné ($\delta(^{31}\text{P}) = 3,2$ ppm et FWHM ~ 640 Hz).

Le spectre ^{31}P quantitatif d'un échantillon d'**os frais** est alors décomposé à l'aide des deux contributions correspondant aux résonances ^{31}P des domaines apatitique et non apatitique. Ces contributions sont extraites de la carte 2D HetCor : l'une étroite d'allure plutôt lorentzienne provenant du domaine apatitique cristallisé ; et l'autre large d'allure plutôt gaussienne provenant du domaine non-apatitique désordonné (cf. **Figure 44**). Concernant le signal du domaine apatitique, il s'avère que son déplacement chimique et sa largeur de raie

sont quasi-invariants quel que soit le temps de contact utilisé [40]. Concernant le signal du domaine non-apatitique, le déplacement chimique est invariant, mais la largeur de raie diminue très légèrement avec l'augmentation du temps de contact (de 660 Hz à 620 Hz). C'est pourquoi, lors de la décomposition : les valeurs de $\delta(^{31}\text{P})$ de chaque domaine furent fixés, à $\delta(^{31}\text{P}) = 3,1$ ppm pour le domaine apatitique, et à $\delta(^{31}\text{P}) = 3,2$ ppm pour le domaine non-apatitique ; la valeur de FWHM du signal du domaine apatitique fut fixée (~ 270 Hz), au contraire de celle du domaine non-apatitique qui fut légèrement libérée (jusqu'à conduire à une valeur optimale de ~ 640 Hz). Nous obtenons alors une proportion atomique entre les phosphates du domaine apatitique, et ceux du domaine non-apatitique, respectivement de 55% et 45% (± 5 %). Ce résultat est a priori très surprenant, car cela implique que près de la moitié des phosphates du minéral osseux se trouvent dans un environnement chimique désordonné en surface des cristaux.

Ainsi, considérons une plaquette d'apatite osseuse allongée selon l'axe c , de 4 nm d'épaisseur, de 20 nm de largeur et de 30 nm de longueur. En respectant les proportions 55%:45% obtenues pour le rapport domaine apatitique/domaine non apatitique, et en supposant que chaque domaine possède une densité équivalente en sites P, il est possible de décomposer cette plaquette comme ceci : (i) un cœur cristallin d'une épaisseur d'environ 2,4 nm, soit légèrement plus de 2 mailles ($a = b = 0,94$ Å) ; (ii) et un domaine non-apatitique en surface d'environ 0,8 nm d'épaisseur (cf. **Figure 45**). Ainsi, le domaine désordonné des plaquettes d'apatite osseuse ne concerne que quelques ions en surface, sur une épaisseur proche de celle d'une maille cristalline (soit ~ 2 ions phosphates). Il est à noter que cette proportion correspond à une valeur moyenne, somme de tous les minéraux de l'os spongieux de l'épiphyse du fémur d'une brebis âgée de 2 ans. La proportion pourrait ainsi être différente dans le cas d'un individu plus âgé par exemple (proportion plus grande du domaine apatitique dû à un phénomène de maturation, cf. I-3-g) ou beaucoup plus jeune (proportion plus grande du domaine non-apatitique). Néanmoins, nous ne l'avons pas vérifié.

Par ailleurs, cette décomposition laisse entrevoir, que le léger épaulement sur le flanc gauche de la résonance ^{31}P d'une apatite osseuse correspond en réalité à la contribution du domaine non-apatitique (voir la flèche rouge de la **Figure 39**).

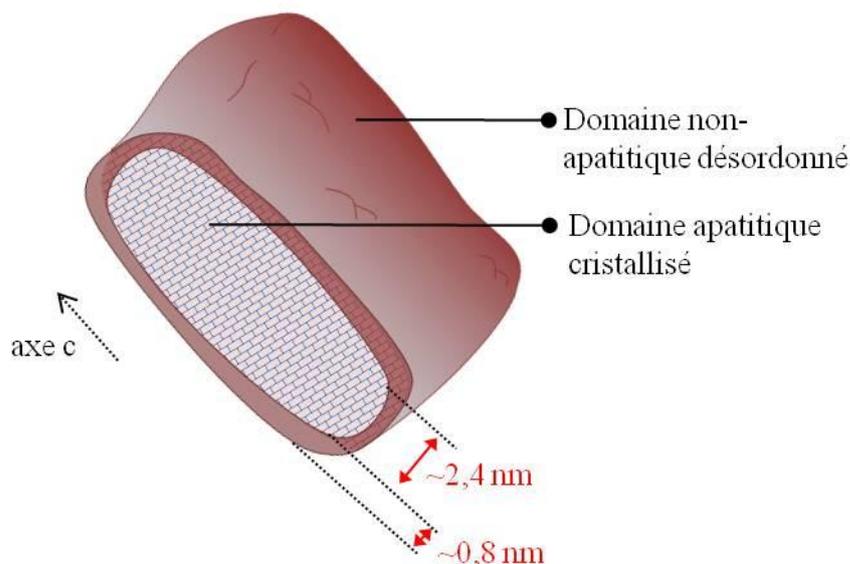


Figure 45. Schéma d'une plaquette d'apatite osseuse, avec les épaisseurs supposées de chaque domaine obtenues suite à la décomposition du spectre ^{31}P .

II-2-3) Conclusion

Le parti pris de se tourner vers l'étude d'un échantillon d'os frais dans son état d'hydratation naturel s'est ainsi avérée bénéfique, permettant d'identifier des molécules d'eau « rigides » fortement adsorbées à la surface du minéral osseux. L'utilisation de l'expérience ^1H - ^{31}P HetCor, combinée à une analyse de la dynamique de CP s'est avérée déterminante.

Plus précisément, il est attendu que ces molécules d'eau se trouvent à proximité du domaine non-apatitique. En effet, il se trouve que les protons des molécules d'eau et ceux des ions HPO_4^{2-} du domaine non apatitique sont impliqués ensemble dans un échange chimique rapide. Par ailleurs, la déshydratation du tissu osseux ne semble pas avoir modifié drastiquement la structure du domaine non-apatitique (cf. **Figure 41**).

Par ailleurs, au contraire des ions OH^- du domaine apatitique, l'échange de ces molécules d'eau par des molécules de D_2O (cf. **Figure 43**) laisse penser qu'elles sont accessibles et donc en surface de la particule. Ceci suggère l'idée d'un domaine apatitique au cœur de la particule, isolé par l'intermédiaire d'un domaine de surface (cf. I-3g, **Figure 23**) correspondant à la surface des cristaux où les ions sont hydratés et désordonnés.

II-3 / Continuité entre le domaine apatitique et le domaine non-apatitique

Les résultats précédents ont montré que des molécules d'eau « rigides » se trouvent au sein ou au voisinage du domaine non-apatitique désordonné. Ce dernier serait ainsi responsable du caractère hydrophile de la surface du minéral osseux. Néanmoins, il est tout à fait possible que le domaine non-apatitique hydraté et désordonné puisse se trouver au sein du tissu osseux sous la forme de particules isolées des cristaux d'apatite. Cette hypothèse ne peut être exclue, puisque des particules de phosphate de calcium amorphe (ACP) sont suspectées agir en tant que phase précurseur du minéral osseux (*cf.* I-3-f). Ainsi, il apparaît nécessaire de démontrer la continuité entre le domaine apatitique et le domaine non-apatitique au sein d'une même particule.

Il est possible de sonder les proximités à longue distance des espèces protonées grâce à des expériences d'échange d'aimantation ^1H à travers une expérience de type EXSY (EXchange Spectroscopy). Le résultat de ces expériences se présente souvent sous forme d'un spectre RMN 2D de corrélation homonucléaire ^1H - ^1H . Cet échange d'aimantation peut avoir lieu grâce au processus de diffusion de spins, lequel est gouverné par les interactions dipolaires homonucléaires ^1H - ^1H . Cet échange d'aimantation s'effectue durant un temps donné, dit temps de mélange (t_{mix}), lequel est un paramètre ajustable permettant de sonder des distances plus ou moins grandes. Ainsi, dans une telle expérience, un échange d'aimantation entre deux espèces protonnées met en évidence une connexion spatiale entre ces deux espèces, confirmant leur présence au sein d'une même particule. Cette technique a été beaucoup utilisée dans le cadre de l'analyse des domaines cristallins et amorphes dans les polymères [41].

II-3-1) Os sec

Une telle expérience n'a pour l'instant jamais été rapportée pour de l'os intact, mais seulement pour de l'os déprotéiné (*i.e.* traité chimiquement) [31]. Néanmoins, des expériences similaires ont été réalisées *via* des expériences de diffusion de spin ^{31}P - ^{31}P sur de la dentine [42]. En revanche, ces expériences étaient de type 1D, et donc moins lisible que des expériences bidimensionnelles (2D). L'idéal serait de réaliser directement l'expérience à partir d'un échantillon d'os « intact », mais malheureusement c'est impossible étant donné que le spectre proton est dominé par la matrice organique (*cf.* **Figures 36-b & 38**). Ainsi, afin

de détecter seulement les espèces protonnées du minéral, il est impératif de filtrer au préalable le signal ^1H par le noyau ^{31}P .

Nous avons choisi de réaliser cette expérience sur un échantillon d'os sec, au détriment d'un échantillon d'os frais, car l'échange chimique rapide qui se produit entre les protons des molécules d'eau et ceux des ions HPO_4^{2-} de surface conduit à une forte atténuation du phénomène de diffusion de spin ^1H - ^1H . Et nous avons constaté que l'expérience était, de ce fait, très peu efficace.

Avant de réaliser une expérience d'échange d'aimantation à partir des protons du minéral osseux, nous nous sommes tournés vers une séquence permettant de les sélectionner. Nous avons choisi une expérience de double polarisation croisée de type « aller et retour » : $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$. Ce type de séquence a d'abord été utilisée dans la littérature pour sélectionner et augmenter le signal de spins rares (^{13}C et ^{15}N) dans des molécules d'intérêts biologiques [43]–[45], ou bien pour enregistrer des expériences 2D ^1H - ^{13}C ou ^1H - ^{15}N dans le cas d'expériences à très hautes vitesse MAS pour de très faibles quantités de matière [46], [47].

Cette expérience consiste à effectuer deux transferts CP successifs : (i) un premier transfert des noyaux ^1H vers les noyaux ^{31}P (caractérisé par un temps de contact t_{CP1}) ; et ensuite (ii) un second transfert retour des noyaux ^{31}P vers les noyaux ^1H (caractérisé par un temps de contact t_{CP2}). En pratique, le premier temps de contact (t_{CP1}) permet d'optimiser l'intensité du signal ^{31}P , tandis que le deuxième temps de contact (t_{CP2}) peut-être éventuellement incrémenté afin de sonder les proximités spatiale et permet une édition spectrale des protons proches des ions phosphates. Cette approche a été utilisée avec succès afin d'étudier la physisorption d'un surfactant à la surface des pores de silices mésoporeuses (Double CP ^1H - ^{29}Si - ^1H) [48], ainsi que pour caractériser l'interface d'un matériau hybride liposome-silice (Double CP ^1H - ^{29}Si - ^1H et ^1H - ^{31}P - ^1H) [49].

L'atout majeur d'une telle expérience de double CP aller et retour ^1H - ^{31}P - ^1H vis à vis d'une simple expérience CP inverse ^{31}P - ^1H (qui a déjà été utilisé pour étudier des apatites nanocristallines [50]), réside dans un temps d'enregistrement beaucoup plus court. En effet, c'est le noyau ^1H qui y gouverne la relaxation, au contraire de l'expérience CP inverse où il s'agit du noyau ^{31}P . Le temps de relaxation longitudinal du phosphore $T_1(^{31}\text{P})$ est ici 100 fois supérieur à celui du proton $T_1(^1\text{H})$. Cette expérience de double CP « aller et retour » ^1H - ^{31}P -

^1H permet ainsi l'acquisition d'un spectre ^1H filtré par les noyaux ^{31}P avec une résolution importante, le tout pour un temps d'expérience relativement restreint.

Dans notre cas de figure, le signal des espèces HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique est de faible intensité (cf. **Figure 40**), et ce dernier nécessite ainsi d'être exalté. Dans cette optique, puisque la paire de spin ^1H et ^{31}P au sein d'un groupement HPO_4^{2-} est relativement proche (*i.e.* $\sim 0,21$ nm), des temps de contact relativement courts ont été utilisés (*i.e.* $t_{\text{CP1}} = t_{\text{CP2}} = 1$ ms) (cf. **Figure 46**). A titre de comparaison, la projection sur la voie ^1H d'un spectre HetCor ^1H - ^{31}P enregistré avec le même temps de contact (1 ms) est présenté (cf. **Figure 46-a**). On constate que le rapport S/B est relativement faible malgré un temps d'expérience de 10 h. De plus, un traitement du signal a été appliqué avant la transformée de Fourier sur la 2^{ème} dimension. Enfin, cette dimension étant une dimension « reconstruite », le spectre ^1H possède une résolution spectrale limitée au nombre d'incrément t_1 enregistrés.

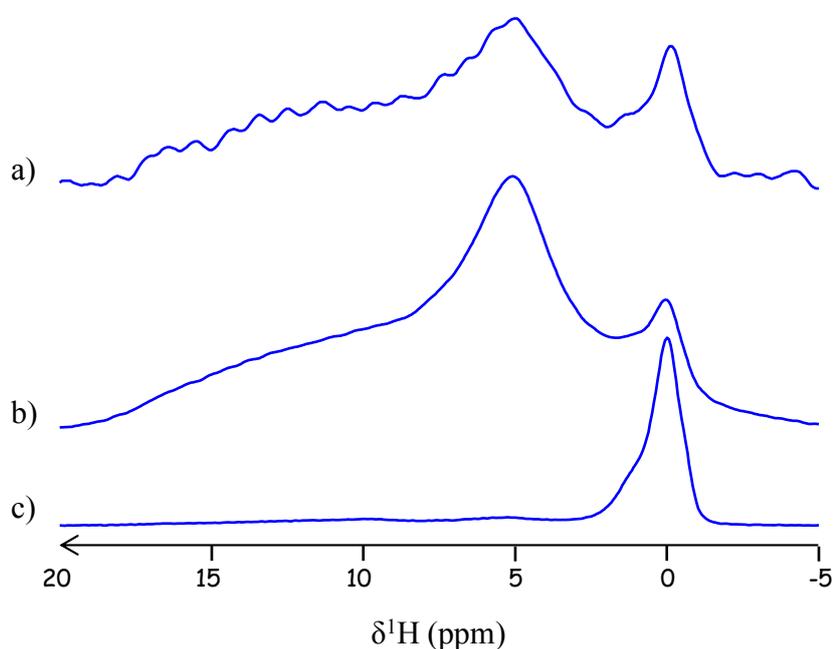


Figure 46. Spectres ^1H d'un échantillon d'os sec : **(a)** projection sur la voie ^1H d'un spectre HetCor ^1H - ^{31}P ($t_{\text{CP}} = 1$ ms) ; **(b)** Double CP ^1H - ^{31}P - ^1H ($t_{\text{CP1}} = t_{\text{CP2}} = 1$ ms) ; **(c)** Double CP ^1H - ^{31}P - ^1H ($t_{\text{CP1}} = t_{\text{CP2}} = 15$ ms). $B_0 = 7,05$ Tesla

Le spectre Double CP ^1H - ^{31}P - ^1H enregistré avec le même temps de contact, une durée d'acquisition identique, et sans aucun traitement du signal avant la transformée de Fourier, présente un bien meilleur rapport S/B (cf. **Figure 46-b**). De plus, la résolution intrinsèque du spectre n'est pas limitée. Ainsi, le signal des protons venant du domaine non

apatitique est maximisé. On distingue le signal des ions OH^- à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, une résonance à $\delta(^1\text{H}) = 5$ ppm provenant de l'eau d'adsorption résiduelle, et un signal très distribué de $\delta(^1\text{H}) = 7$ à 18 ppm traditionnellement attribué aux HPO_4^{2-} .

L'augmentation des deux temps de contact ($t_{\text{CP1}} = t_{\text{CP2}} = 15$ ms) permet de réaliser l'édition spectrale du signal des OH^- (cf. **Figure 46-c**). Le signal des protons du domaine non-apatitique n'est plus visible en raison d'un fort effet de $T_1\rho(^1\text{H})$, alors que le signal des OH^- est maximisé. Ce dernier signal est relativement complexe (une résonance principale à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, et deux épaulements à $\delta(^1\text{H}) = -0,7$ et $\delta(^1\text{H}) = 0,9$ ppm) et difficile à interpréter, alors que les apatites stœchiométriques telle **HA** présentent une résonance symétrique centrée à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm. L'origine d'une telle forme de raie n'est pas triviale. Elle pourrait provenir des différentes substitutions ioniques (Na^+ , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} ...), ainsi que des lacunes présentes au sein des apatites biologiques, lesquelles peuvent induire une variation du déplacement chimique ^1H des ions hydroxyles qui se trouvent à proximités. En particulier, il a été montré pour des apatites carbonatées de synthèse que les OH^- proches d'ions carbonate en site B présentent une résonance ^1H centrée à $\delta(^1\text{H}) \sim 1$ ppm [51].

Nous avons par la suite utilisé une expérience originale, composée de deux séquences successives : (i) une première de double polarisation croisée « aller et retour » ^1H - ^{31}P - ^1H ($t_{\text{CP1}} = 1$ ms et $t_{\text{CP2}} = 850$ μs) afin de filtrer le signal proton provenant du minéral ; (ii) suivie d'une expérience EXSY standard afin de permettre un échange d'aimantation entre les spins ^1H de chaque domaine. A notre connaissance, cette séquence a été pour la première fois utilisée par Niki Baccile *et al.* [48] afin de caractériser l'interface surfactant-silice dans des silices de type MCM-41. Cette expérience fut réalisée à partir d'un échantillon d'os sec avec deux temps de mélange différents, $t_{\text{mix}} = 10$ μs et 10 ms (cf. **Figure 47**). Pour un temps de mélange court, *i.e.* $t_{\text{mix}} = 10$ μs , seuls les pics sur la diagonale sont observables (cf. **Figure 47-A**). Ainsi, aucun échange d'aimantation ne se produit entre les 3 systèmes de spins ^1H (*i.e.* OH^- du domaine apatitique, eau résiduelle et HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique). Au contraire, pour un t_{mix} plus long (*i.e.* 10 ms), de forts pics d'échanges entre les 3 systèmes de spins ^1H sont observés (voir les lignes rouges pointillées, cf. **Figure 47-B**). Ceci indique que ces 3 systèmes de spins ^1H sont en contact à travers des interactions dipolaires ^1H - ^1H , montrant sans ambiguïté que les deux domaines appartiennent à une même particule, et valide la présence du domaine non apatitique en surface de l'apatite osseuse.

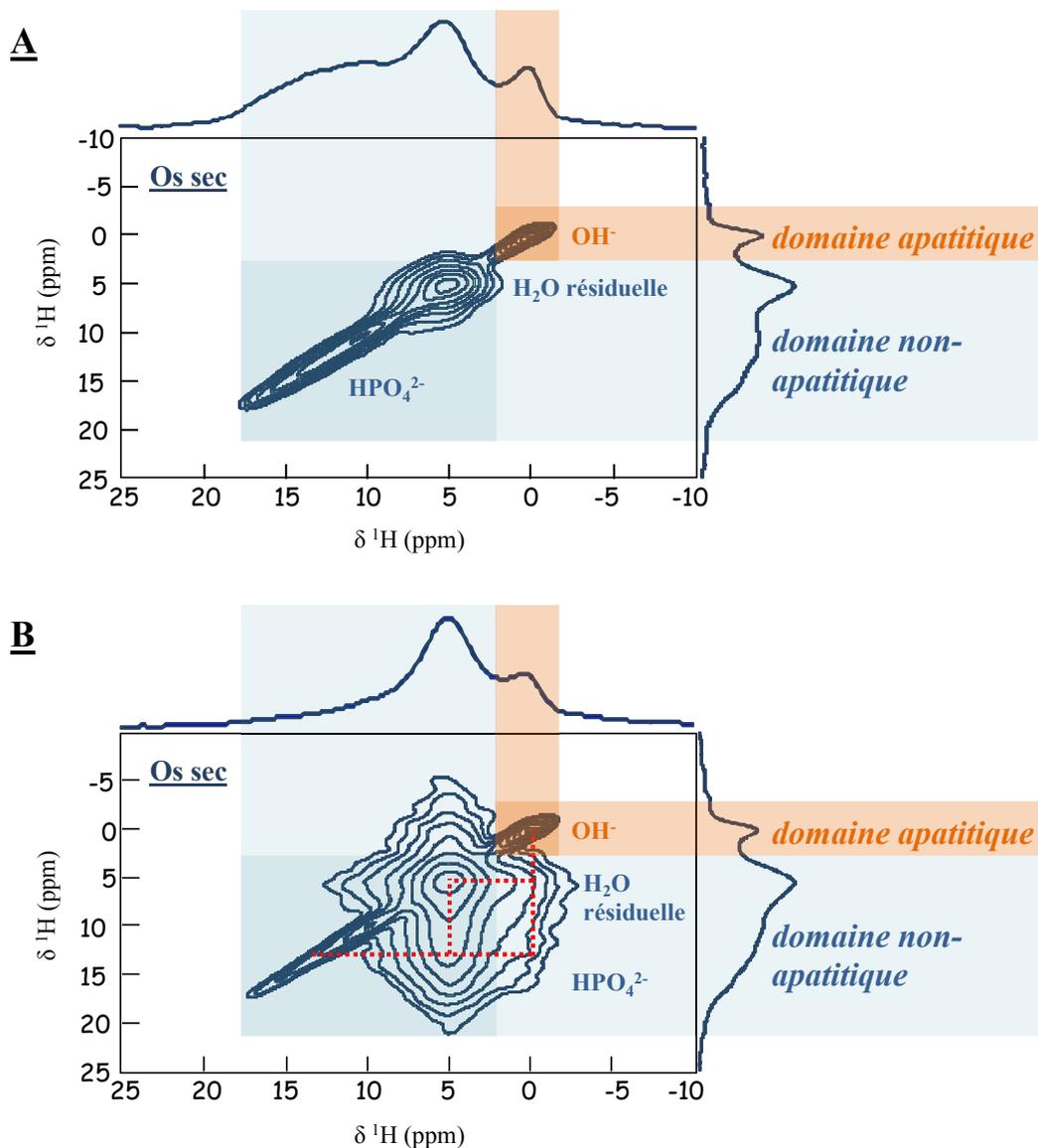


Figure 47. Spectres 2D Double CP-EXSY ^1H - ^1H d'un échantillon d'os sec : **A)** $t_{\text{mix}} = 10 \mu\text{s}$; **B)** $t_{\text{mix}} = 10 \text{ms}$. Suite à l'échange d'aimantation, pour $t_{\text{mix}} = 10 \text{ms}$, de forts pics d'échange entre les 3 systèmes de spins ^1H sont observés, i.e. les ions OH^- du domaine apatitique, et l'eau résiduelle et les ions HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique (lignes rouges pointillées). $B_0 = 7,05 \text{ Tesla}$

II-3-2) Mélange physique HA + ACP

Nous avons voulu vérifier la validité de l'expérience précédente en la réalisant à partir d'un système modèle, où de l'apatite et des environnements chimiques désordonnés se trouveraient précipités dans deux particules différentes. Pour ce faire, nous avons réalisé un mélange physique composé de : (i) des particules d'apatite stœchiométrique (**HA**, 34 % massique) ; (ii) et des particules de phosphate de calcium amorphe de synthèse (**ACP**, 66 % massique).

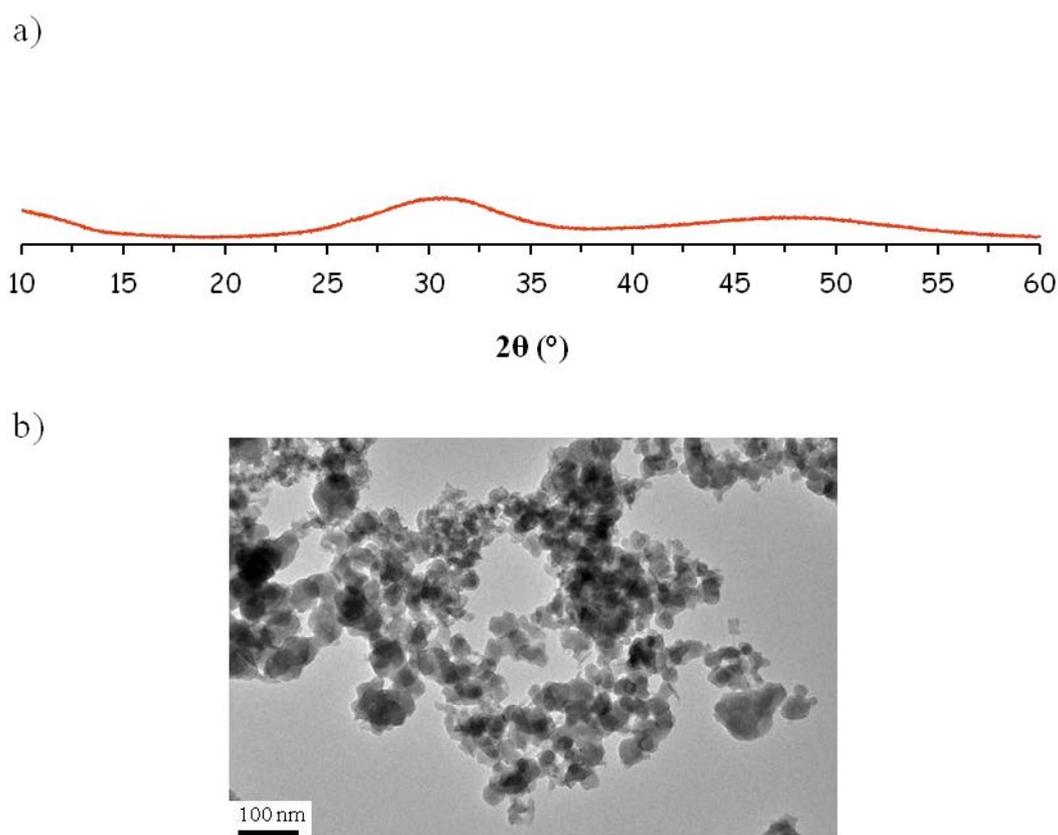


Figure 48. (a) Diffractogramme de rayons X sur poudre obtenu avec le rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$ de l'échantillon de phosphate de calcium amorphe de synthèse (ACP), (b) Cliché obtenu en microscopie électronique en transmission (MET) de l'échantillon d'ACP, préalablement dispersé dans de l'éthanol absolu.

Nous avons utilisé l'ACP synthétique comme modèle des environnements chimiques désordonnés du domaine non-apatitique du minéral osseux. Pour ce faire, l'échantillon d'ACP se devait d'être riche en espèces HPO_4^{2-} . C'est pourquoi, il fut synthétisé à pH alcalin (pH \sim 10-11), en suivant la méthode élaborée par J. C. Heughebaert [52]. En effet, les pKA dans l'eau à 25 C de l'acide phosphorique sont : $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^- = 2,15$; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} = 7,2$; et $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-} = 12,42$. En pratique, une solution aqueuse alcaline de nitrate de calcium fut versée rapidement sur une solution aqueuse alcaline de phosphate d'ammonium. Le précipité ainsi formé fut immédiatement filtré sur un entonnoir Büchner, lavé à l'aide d'une solution aqueuse d'ammoniaque diluée (*i.e.* $C = 0,8$ M), plongé dans de l'azote liquide, puis finalement lyophilisé pendant une période de 72 heures.

Le diffractogramme de rayons X de l'ACP ne révèle aucune raie de diffraction (*cf.* **Figure 48-a**), permettant ainsi de vérifier sa nature amorphe. Un cliché de MET révèle

que les particules d'ACP se présentent sous forme de sphères irrégulières avec des tailles variant d'environ 20 à 50 nm (cf. **Figure 48-b**).

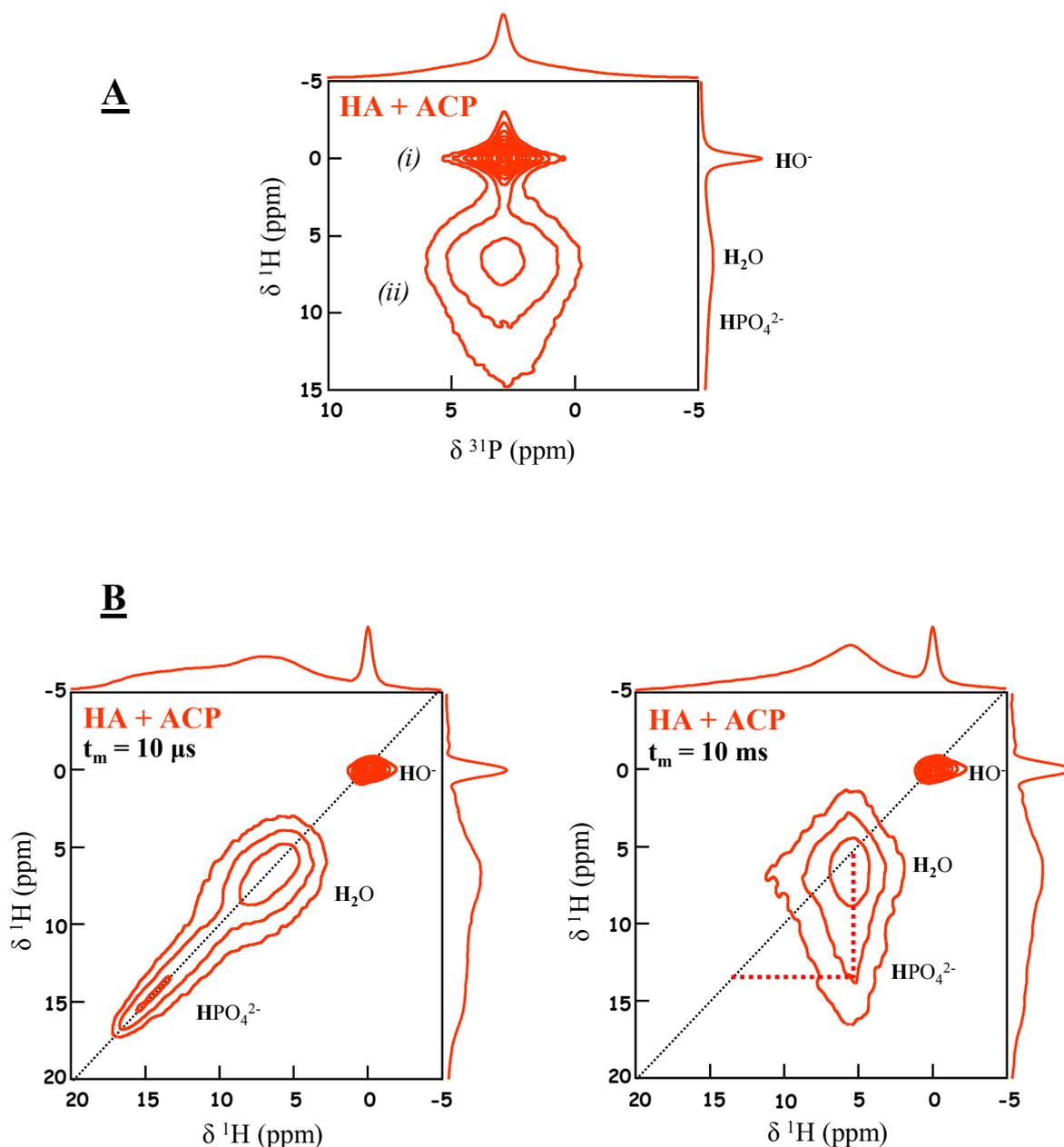


Figure 49. (A) Spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P d'un mélange physique ACP + HA ($\nu_{\text{rot}} = 14 \text{ kHz}$, $t_{\text{CP}} = 3 \text{ ms}$). (B) Spectres 2D Double CP-EXSY ^1H - ^1H du même mélange physique ACP + HA à $t_{\text{mix}} = 10 \mu\text{s}$ et $t_{\text{mix}} = 10 \text{ms}$. Suite à l'échange d'aimantation, pour $t_{\text{mix}} = 10 \text{ms}$, seul un pic d'échange entre les molécules d'eau et les ions HPO_4^{2-} des particules d'ACP est observé (voir les traits pointillés rouges). $B_0 = 7,05 \text{ Tesla}$

En effectuant une expérience HetCor ^1H - ^{31}P pour un tel mélange physique ACP + HA, on se rend compte qu'il possède une réponse RMN proche de celle du minéral osseux

(cf. **Figure 49-A**). En effet, une nouvelle fois, deux taches de corrélation centrées à $\delta(^{31}\text{P}) \sim 3$ ppm sont observées. La première (i) est étroite, corrèle avec des ions OH^- à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, et provient donc de **HA**. La seconde (ii) est large, corrèle avec des molécules d'eau et des ions HPO_4^{2-} sur la gamme $\delta(^1\text{H}) = 5\text{-}15$ ppm, et provient donc de l'**ACP**. L'échantillon d'**ACP** présente ainsi des similitudes avec le domaine non-apatitique du minéral osseux, lesquelles seront étudiées en détails dans le **chapitre III**.

Les spectres 2D Double CP-EXSY $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ ($t_{\text{CP1}} = 1$ ms et $t_{\text{CP2}} = 850$ μs ; $t_{\text{mix}} = 10$ μs et 10 ms) pour le mélange physique **ACP + HA** sont présentés au sein de la **Figure 49-B**. Quelque soit le temps de mélange, *i.e.* court à 10 μs , ou long à 10 ms, aucun pic d'échange entre les ions OH^- de **HA** et les ions HPO_4^{2-} de l'**ACP** n'est observé. De son côté, le pic d'échange entre les molécules d'eau et les ions HPO_4^{2-} des particules d'**ACP** observé était attendu (voir les traits pointillés rouges). Cela confirme le fait que deux systèmes de spins ^1H doivent se trouver au sein de la même particule afin que le phénomène de diffusion de spins puisse s'effectuer.

II-3-3) Conclusion

Nous avons ainsi utilisé une expérience RMN originale, laquelle combine une expérience de double polarisation croisée de type « aller-retour » $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$ (qui permet l'acquisition d'un spectre ^1H filtré ^{31}P), avec une séquence de diffusion de spin $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ « standard ». **Cette dernière a permis de confirmer sans ambiguïté la présence des domaines apatitique et non-apatitique au sein de la même particule pour un échantillon d'os non traité chimiquement.**

II-4 / Propriétés d'hydrophilie de plusieurs phosphates de calcium de référence

Les résultats précédents suggèrent que les propriétés d'hydrophilie du minéral osseux sont assurées par le domaine non-apatitique. Avant de valider définitivement une telle proposition, il est nécessaire d'exclure une potentielle implication de certaines molécules organiques. En effet, il est proposé que certaines d'entre elles, dont des protéines non-collagéniques (des SIBLINGs [53], [54] et des glycosaminoglycanes [55], [56]), des citrates [57], [58] et une enzyme comme la polyADP ribose [59] se trouvent à la surface des cristaux du minéral osseux afin de contrôler leur nucléation, leur croissance et leur morphologie (*cf.* I-3-e). Ces protéines non-collagéniques possèdent des résidus d'acides aminés chargés, des fonctions chimiques polaires, et sont donc en partie hydrophiles. Il en est de même pour l'ion citrate (un petit composé organique ionique de formule $C_6H_5O_7^{3-}$), auquel on a récemment accordé la capacité de gérer l'interface organo-minérale [57], [58].

Il est ainsi envisageable que ces composés organiques piègent des molécules d'eau à la surface du minéral osseux *in vivo*. Dès lors, nous avons décidé d'étudier les propriétés d'hydrophilie de différents échantillons de phosphates de calcium de référence, dans le but de discriminer : qui du domaine non-apatitique ou des molécules organiques est le principal responsable des propriétés d'hydrophilie du minéral osseux. Dans cette perspective, le chimiste est capable de synthétiser des apatites analogues aux apatites osseuses, mais lesquelles sont dépourvues de tout additif organique. Ces dernières sont appelées des « apatites biomimétiques », et présentent de nombreuses similitudes envers le minéral osseux.

II-4-1) Les apatites biomimétiques

Une apatite de synthèse est dite biomimétique si elle présente un certain nombre de similitudes à l'égard du minéral osseux, comme : des cristaux de taille nanométrique et de morphologie plaquettaire, un taux de carbonatation élevé, ainsi que la présence d'environnements chimiques désordonnés en surface (*i.e.* le domaine non-apatitique). Deux échantillons d'apatites biomimétiques seront utilisés lors de cette étude, appelés CHA et CHA-SBF :

- La première, **CHA**, est une apatite carbonatée obtenue par la méthode originale dite par « diffusion de vapeurs d'ammoniac ». Cette méthode, au préalable exploitée pour la précipitation de la calcite ($CaCO_3$) [60], fut adaptée à la précipitation d'apatite par

Nassif *et al.* [31]. En pratique, la solution réactionnelle contenant les précurseurs de l'apatite carbonatée (*i.e.* $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et NaHCO_3) est initialement fixée à un pH acide (pH = 2,2). L'apport progressif des vapeurs de $\text{NH}_3(\text{g})$ va conduire à la neutralisation puis à l'alcalinisation de la solution réactionnelle (pH final ~10-11), permettant la précipitation de l'apatite carbonatée.

- La seconde, **CHA-SBF**, est une apatite précipitée suite à la congélation puis la décongélation d'une solution de SBF (pour « Simulated Body Fluid »). Cette solution de SBF est une solution synthétique qui mime la composition ionique du plasma sanguin. Cet échantillon est particulièrement intéressant car si **CHA-SBF** est également une apatite carbonatée, elle est susceptible de posséder également d'autres substituants ioniques à l'instar des apatites osseuses (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^-).

Les protocoles de synthèse détaillés de ces deux échantillons apparaissent au sein de la section « Matériels et méthodes » en annexe de ce manuscrit. Une fois précipités, ces deux échantillons ont été séchés 6 jours à 37°C avant toute caractérisation.

II-4-1-a) Caractérisation standard par DRX, MET et ATG

Les points communs entre ces deux apatites biomimétiques et le minéral osseux ont tout d'abord été évalués à l'aide de diverses méthodes standard, DRX, MET et ATG. Premièrement, aussi bien pour **CHA** que **CHA-SBF**, seule une phase cristalline d'apatite est détectée par diffraction des rayons X (*cf.* **Figure 50-A**). Ensuite, les raies de diffraction de ces dernières sont larges et mal définies. Ceci est particulièrement vrai pour l'échantillon **CHA-SBF**, lequel possède un diffractogramme X proche de celui du minéral osseux (*cf.* **Figure 50-A**).

Les clichés de MET révèlent que les cristaux de **CHA** et de **CHA-SBF** adoptent une morphologie sous la forme de plaquettes irrégulières de tailles nanométriques (*cf.* **Figure 48-B**). Les plaquettes de **CHA** sont relativement grandes, avec des tailles allant de 30 à 200 nm de longueur, 20 à 50 nm de largeur. De leur côté, les plaquettes de **CHA-SBF** sont plus petites, avec des tailles similaires à celles du minéral osseux, c'est-à-dire de 30 à 50 nm de longueur, de 10 à 30 nm de largeur. Certaines plaquettes sont parfois observées exposées

selon leur tranche, permettent d'estimer leur épaisseur : de 2 à 9 nm pour **CHA** ; et de ~1,4 à 4 nm pour **CHA-SBF**.

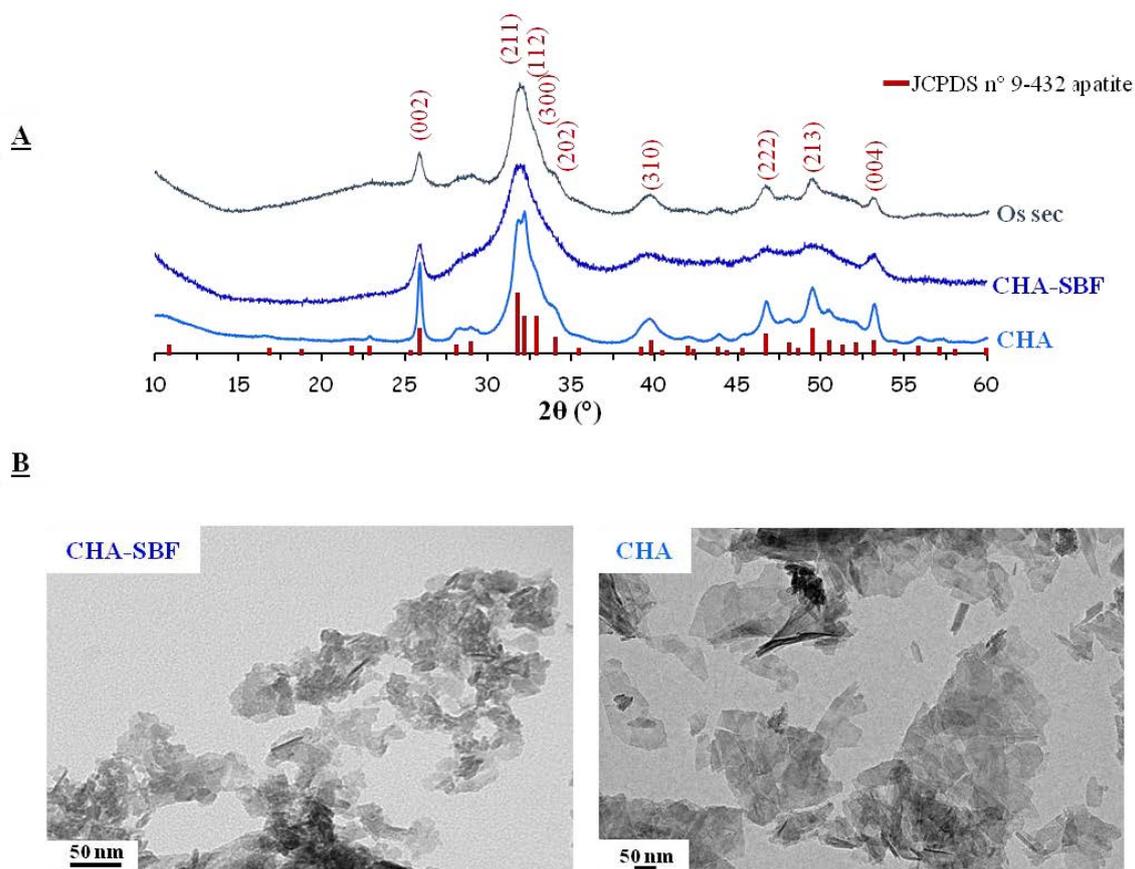


Figure 50. (A) Diffractogramme X sur poudre obtenu au rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$ d'un échantillon d'*os sec*, et ceux des deux apatites biomimétiques **CHA-SBF** et **CHA**. (B) Clichés obtenus en microscopie électronique en transmission (MET) de **CHA** et **CHA-SBF**, au préalable dispersés dans de l'éthanol absolu.

Le taux de carbonatation des différents échantillons est relativement élevé, et a été estimé par analyse thermogravimétrique (ATG) : soit ~6,8 % pour **CHA-SBF** ; et ~5,3 % pour **CHA**. Pour rappel, le taux de carbonatation est de ~8,6 % pour le minéral osseux (mesuré à partir d'un échantillon d'*os déprotéiné*, cf. **Tableau 5**).

	CO_3^{2-} (% m.)
Apatite osseuse (<i>os déprotéiné</i>)	~ 8,6
Apatite biomimétique (CHA-SBF)	~ 6,8
Apatite biomimétique (CHA)	~ 5,3

Tableau 5. Taux de carbonatation en pourcentage massique de **CHA**, **CHA-SBF** ainsi que du minéral osseux (provenant d'un échantillon d'*os déprotéiné* par la méthode de Steve Weiner et Paul Price [61]). Ces valeurs ont été tirées de la perte de masse observée par analyse thermogravimétrique entre 400° et 1000°C pour les deux apatites biomimétiques, et entre 500° et 1000°C pour le minéral osseux.

II-4-1-b) Caractérisation par RMN

- *RMN simple impulsion ^1H & ^{31}P*

La RMN MAS ^1H simple impulsion permet l'observation du signal des ions OH^- à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, à la fois pour **CHA** et pour **CHA-SBF** (cf. **Figure 51-A**).

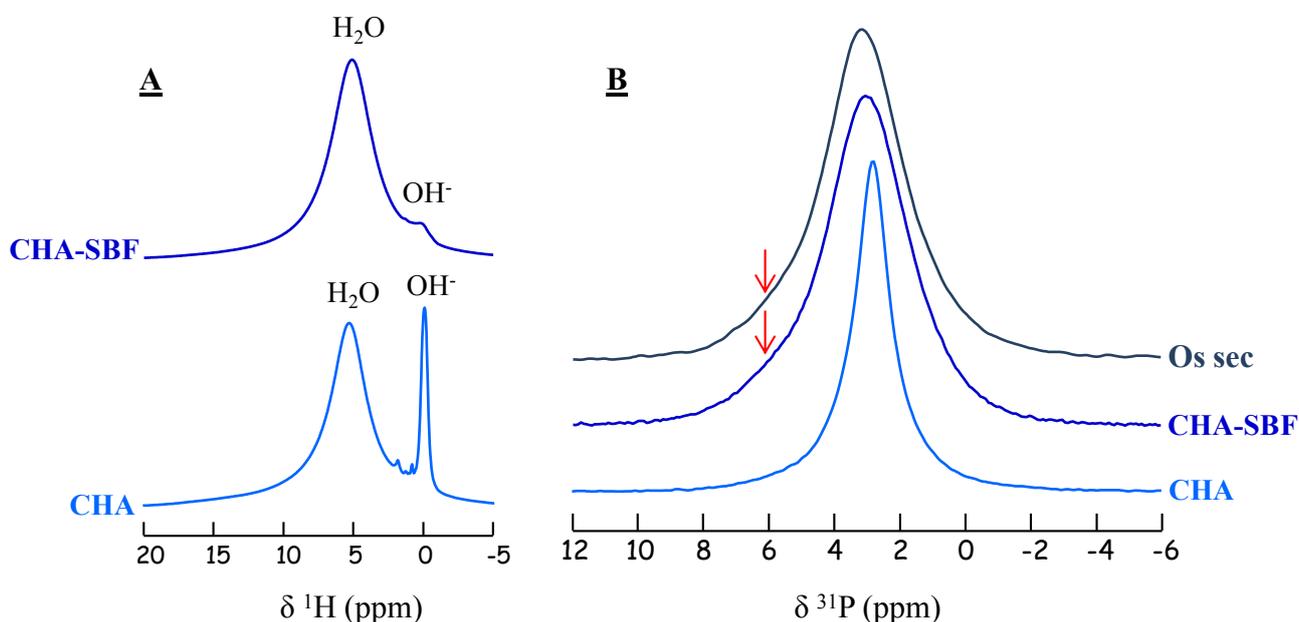


Figure 51. (A) Spectres RMN MAS ^1H simple impulsion de **CHA-SBF** et de **CHA** ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz). (B) Spectres RMN MAS ^{31}P simple impulsion et découplés du ^1H d'un échantillon d'**os sec**, de **CHA-SBF**, ainsi que de **CHA** ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz). $B_0 = 7,05$ Tesla

Cependant, ce signal apparaît être peu intense pour **CHA-SBF** par rapport au signal des molécules d'eau adsorbées à $\delta(^1\text{H}) \sim 5,5$ ppm. Ceci pourrait être un indice de la nature lacunaire en ions OH^- de **CHA-SBF**, caractéristique similaire au minéral osseux (cf. I-3-d). Cependant, ces deux spectres ^1H ne révèlent pas d'informations à propos de l'éventuelle présence d'un domaine non-apatitique riche en espèces HPO_4^{2-} . En effet, bien qu'étudiées à l'état sec, ces deux apatites biomimétiques présentent toutes deux une forte résonance d'eau d'adsorption à $\delta(^1\text{H}) \sim 5,5$ ppm. Celle-ci est tellement intense, qu'elle rend difficile l'observation d'un potentiel signal de faible intensité sur la gamme $\delta(^1\text{H}) = 7-18$ ppm. Comme le minéral osseux, les spectres RMN MAS ^{31}P simple impulsion de **CHA** et **CHA-SBF** présentent tous deux une unique résonance. Cette dernière est centrée à $\delta(^{31}\text{P}) \sim 2,9$ ppm pour **CHA**, et $\delta(^{31}\text{P}) \sim 3,2$ ppm pour **CHA-SBF**, contre $\delta(^{31}\text{P}) \sim 3,2$ ppm pour le minéral osseux (cf. **Figure 51-B**). Il est à noter que la résonance ^{31}P de **CHA-SBF** est vraiment très

similaire à celle du minéral osseux, avec un même déplacement chimique (*i.e.* $\delta(^{31}\text{P}) \sim 3,2$ ppm), et une même largeur spectrale (*i.e.* FWHM ~ 370 Hz, *cf.* **Tableau 6**). Par ailleurs, tout comme le minéral osseux, un léger épaulement sur le flanc gauche de la résonance ^{31}P de **CHA-SBF** est observé (vers $\delta(^{31}\text{P}) \sim 6,0$ ppm ; indiqué par une flèche rouge). Il a été proposé récemment pour le minéral osseux que cet épaulement provienne d'environnements désordonnés de type OCP (octacalcium phosphate), dont les feuilletés hydratés seraient stabilisé par des ions citrates [57]. La présence de cet épaulement pour **CHA-SBF** prouve que les ions citrates n'en sont pas à l'origine, mais il semble plutôt lié à un taux d'ions carbonates élevé (*i.e.* $> 5\%$ en masse) [25].

De son côté, la résonance ^{31}P de **CHA** (FWHM ~ 150 Hz) est moins large que celle du minéral osseux, mais est au contraire plus distribuée que celle de l'apatite stœchiométrique **HA** (FWHM ~ 80 Hz).

	FWHM (Hz)
Apatite osseuse (os sec)	370 ± 20
Apatite biomimétique (CHA-SBF)	370 ± 20
Apatite biomimétique (CHA)	150 ± 20
Apatite stœchiométrique (HA)	80 ± 20

Tableau 6. Les largeurs à mi-hauteur (FWHM) des résonances ^{31}P d'un échantillon d'**os sec**, de deux apatites biomimétiques **CHA-SBF** et **CHA**, et d'une apatite stœchiométrique **HA**.

	Os sec		CHA sec		CHA-SBF sec	
	$\delta(^{31}\text{P}) \pm 0,1$ ppm	FWHM ± 20 Hz	$\delta(^{31}\text{P}) \pm 0,1$ ppm	FWHM ± 20 Hz	$\delta(^{31}\text{P}) \pm 0,1$ ppm	FWHM ± 20 Hz
domaine apatitique	3,1	270	3,0	140	3,1	290
domaine non-apatitique	3,2	670	3,1	430	3,2	660

Tableau 7. Les déplacements chimiques $\delta(^{31}\text{P})$ ainsi que les largeurs de résonances à mi-hauteur (FWHM) des signaux ^{31}P reconstruits du domaine apatitique et du domaine non-apatitique pour : une apatite osseuse (provenant d'un échantillon d'**os sec**) ; et des deux échantillons d'apatite stœchiométrique **CHA** et **CHA-SBF**.

- RMN 2D ^1H - ^{31}P

La présence d'un domaine non-apatitique désordonné en surface de **CHA** et **CHA-SBF** peut être vérifiée grâce à l'utilisation de l'expérience RMN HetCor ^1H - ^{31}P (cf. **Figure 52**). En effet, outre la tache de corrélation du domaine apatitique (i), la tache de corrélation (ii) caractéristique du domaine non-apatitique (répartie sur la dimension proton de 5 à 18 ppm) est également observée pour **CHA-SBF** et **CHA** (étudiés tous deux à l'état sec).

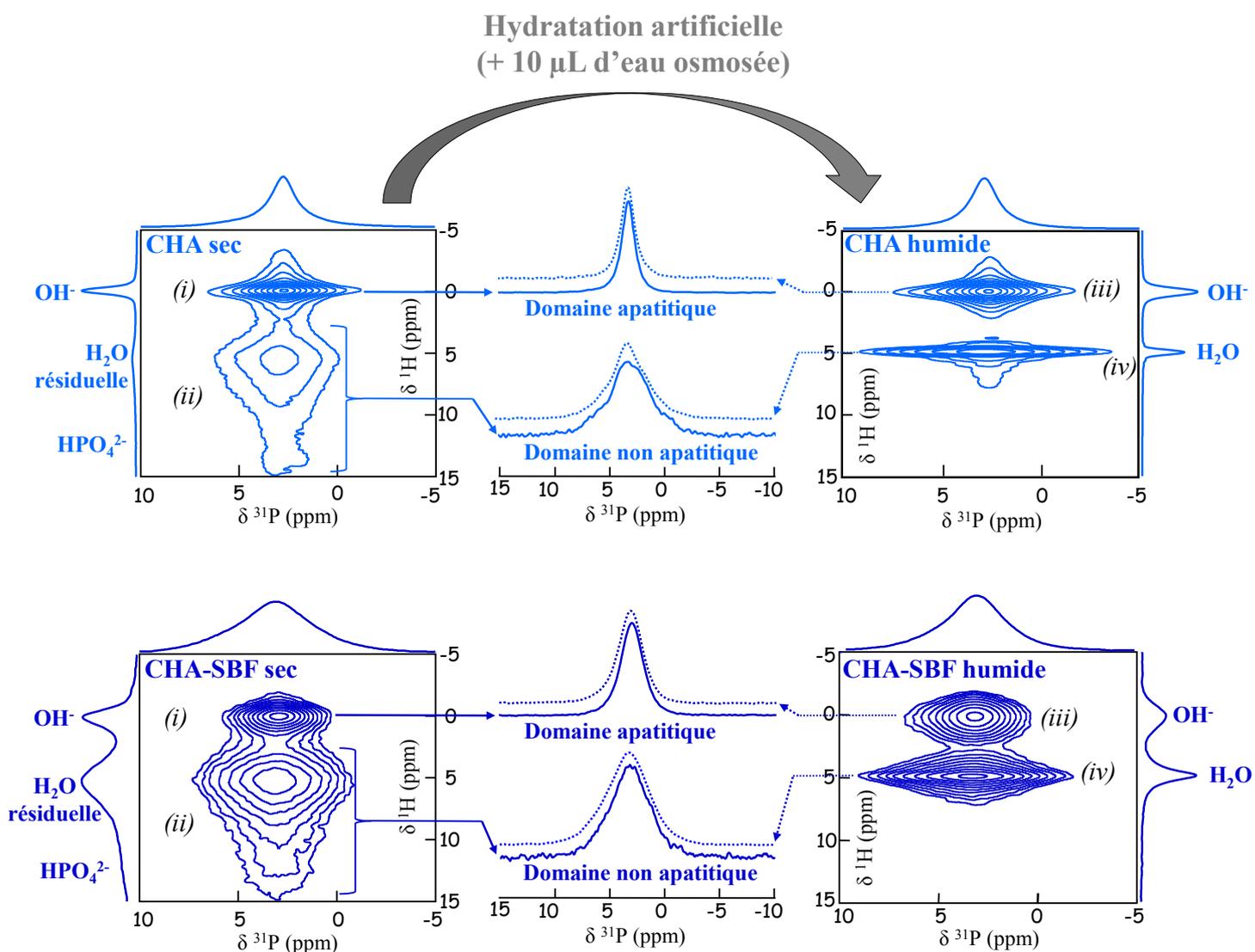


Figure 52. Spectres 2D HetCor ^1H - ^{31}P de deux échantillons d'apatites biomimétiques **CHA** et **CHA-SBF** à l'état sec ($\nu_{\text{rot}} = 14\text{k Hz}$, $t_{\text{CP}} = 1\text{ ms}$) et à l'état humide suite à l'ajout de 10 μL d'eau osmosée ($\nu_{\text{rot}} = 8\text{ kHz}$, $t_{\text{CP}} = 10\text{ ms}$). $B_0 = 7,05\text{ Tesla}$.

L'intégration de la tache de corrélation (ii) selon la voie F2 conduit, tout comme dans le cas du minéral osseux, à un signal phosphore plus distribué que celui du domaine apatitique pour les deux échantillons (cf. **Tableau 7**), corrélant avec des molécules d'eau résiduelles ($\delta(^1\text{H}) = 5,5$ ppm) et des ions hydrogénophosphates ($\delta(^1\text{H}) = 7 - 18$ ppm) (cf. **Figure 52**).

L'observation d'un tel signal sur la voie ^1H indiquant la présence d'un domaine non-apatitique a déjà été rapportée dans la littérature pour des apatites carbonatées de synthèse [40], [62]. En ce sens, les spectres 2D HetCor ^1H - ^{31}P des échantillons **CHA** et **CHA-SBF** secs présentent les résonances caractéristiques d'un domaine apatitique et non-apatitique, tout comme l'os sec.

Nous avons ensuite entrepris l'étude des propriétés d'hydrophilie des échantillons **CHA-SBF** et **CHA**. Pour ce faire, les spectres 2D HetCor ^1H - ^{31}P de **CHA** et **CHA-SBF** dans des conditions humides artificielles ont été enregistrés (cf. **Figure 52**). En pratique, après l'introduction de la poudre, il fut inséré 10 μL d'eau osmosée directement dans le rotor à l'aide d'une pipette. Il apparaît que, une fois hydratés, ces deux échantillons d'apatites biomimétiques sont capables de fortement adsorber une importante quantité d'eau à leur surface (cf. l'observation d'une intense tache de corrélation (iv) à $\delta(^1\text{H}) = 4,9$ ppm sur la dimension proton). De nouveau, afin d'obtenir le signal ^{31}P reconstruit de chaque domaine, les tache de corrélation (iii) et (iv) ont été intégrées selon la voie F2 pour **CHA** et **CHA-SBF** (voir au centre de la **Figure 52**).

Le signal ^{31}P reconstruit des domaines apatitique et non-apatitique sont similaires en terme de $\delta(^{31}\text{P})$ et de largeur spectrale pour **CHA-SBF** à l'état sec et humide. Une observation similaire peut être faite pour **CHA**, car même si le spectre ^{31}P du domaine non apatitique possède une allure légèrement modifiée, la largeur de raie et la position sont similaires.

Une fois hydratées, ces apatites biomimétiques sont capables de fortement adsorber une grande quantité de molécules d'eau. Ces molécules d'eau « rigides » se trouvent en interaction avec le domaine non-apatitique en surface des cristaux de **CHA-SBF** et **CHA**. **Etant donné l'absence d'additifs organiques employés lors de leurs synthèses, cela suggère que les cristaux d'apatite osseuse sont capables de fortement adsorber des**

molécules d'eau à leur surface *in vivo*, sans recourir au concours de certaines molécules organiques hydrophiles (ou partiellement hydrophiles). De plus, nous constatons une différence de largeur de raie de la résonance proton associée aux molécules d'eau « rigides », laquelle est beaucoup plus faible dans le cas de **CHA humide**. De telles variations ont déjà été observées pour le signal ^1H de molécules d'eau en interactions avec différents polysaccharides issus de membranes bactériennes [63]. La variation des largeurs de raie fut alors attribuée à une différence de dynamique des molécules d'eau.

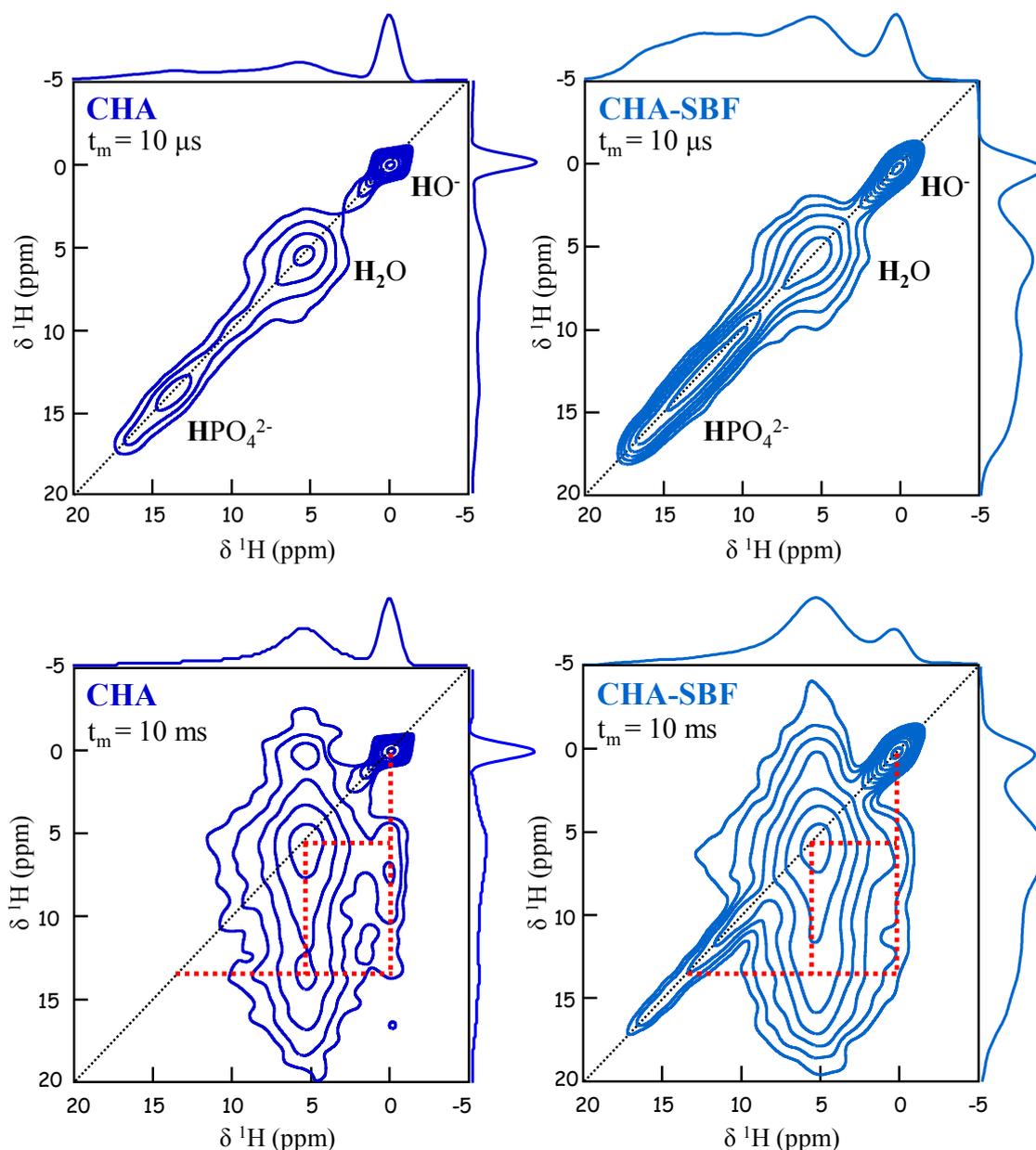


Figure 53. Spectres 2D Double CP-EXSY ^1H - ^1H des échantillons d'apatites biomimétiques **CHA** et **CHA-SBF** ($t_m = 10 \mu\text{s}$ et 10ms). Suite à l'échange d'aimantation, pour $t_{mix} = 10 \text{ms}$, de forts pics d'échanges entre les 3 systèmes de spins ^1H sont observés, i.e. les ions OH^- du domaine apatitique, et l'eau résiduelle et les ions HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique (lignes rouges pointillées). $B_0 = 7,05 \text{ Tesla}$

II-4-1-c) Echange d'aimantation ^1H - ^1H par diffusion de spin

La continuité entre le domaine apatitique et le domaine non-apatitique au sein des particules de **CHA-SBF** et **CHA** peut être également vérifiée par des expériences 2D de Double CP-EXSY ^1H - ^1H .

Pour ce faire, et de la même manière que pour l'os sec, des expériences alliant une première séquence de double polarisation croisée « aller et retour » ^1H - ^{31}P - ^1H ($t_{\text{CP1}} = 1$ ms et $t_{\text{CP2}} = 850$ μs), suivie d'une seconde EXSY ^1H - ^1H ($t_{\text{mix}} = 10$ μs et 10 ms) furent réalisées pour ces deux échantillons (*cf.* **Figure 53**). Pour $t_{\text{mix}} = 10$ μs , aucun échange d'aimantation ne se produit entre les 3 systèmes de spins ^1H (*i.e.* OH⁻ du domaine apatitique, eau résiduelle et HPO₄²⁻ du domaine non-apatitique). Au contraire, pour un $t_{\text{mix}} = 10$ ms, de forts pics d'échanges entre les 3 systèmes de spins ^1H sont observés (voir les lignes rouges pointillées, *cf.* **Figure 53**). De cette manière, la présence des deux domaines au sein d'une même particule est vérifiée pour **CHA-SBF** et **CHA**.

II-4-1-d) Quantification du domaine non apatitique

- *CHA*

Le spectre ^{31}P quantitatif de l'échantillon d'apatite carbonaté **CHA** fut décomposé à l'aide d'une procédure identique à celle décrite précédemment dans le cas du minéral osseux (*cf.* **Figure 54**). Celle-ci conduit à un résultat quelque peu différent, puisque dans ce cas de figure, une proportion atomique entre les phosphores du domaine apatitique et ceux du domaine non-apatitique, respectivement d'environ 65% et 35% (± 5 %) est trouvée. La proportion en domaine non-apatitique de l'échantillon **CHA** est ainsi moindre que celle retrouvée chez le minéral osseux (d'une brebis âgée de 2 ans).

Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature pour des apatites nanocristallines, où une telle approche (enregistrement de spectres 2D HetCor ^1H - ^{31}P puis décomposition de spectres ^{31}P quantitatif) fut rapportée pour la toute première fois en 2006 par Christian Jäger *et al.* [40]. L'existence d'un domaine non-apatitique y a été proposé et quantifié (55% contre 45% pour le domaine apatitique).

De plus, cette proportion en domaine non-apatitique amorphe peut également être estimée par diffraction des rayons X, à la manière de ce qui est réalisé avec les polymères semi-cristallins afin d'en mesurer le taux de cristallinité.

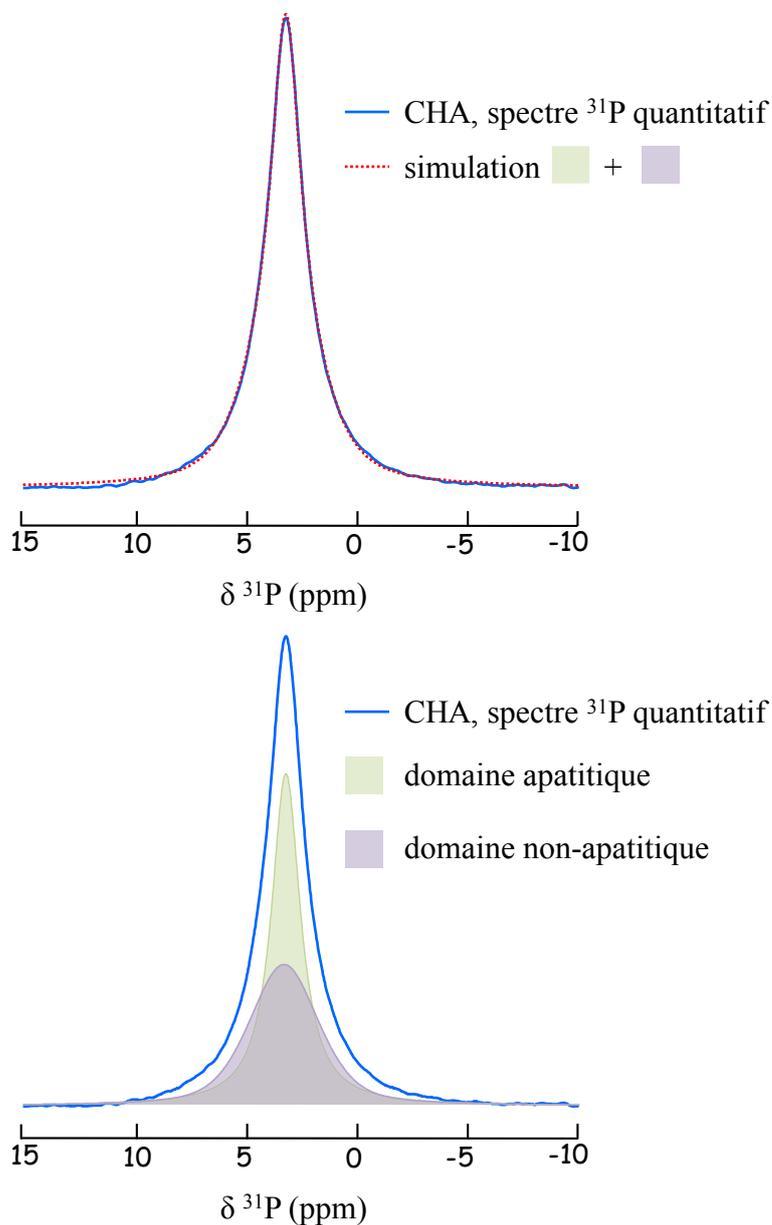


Figure 54. Décomposition du spectre ^{31}P quantitatif découplé du ^1H de l'échantillon d'apatite biomimétique CHA en deux composantes : l'une étroite d'allure lorentzienne provenant du domaine apatitique cristallisé ($\delta(^{31}\text{P}) = 3$ ppm et $\text{FWHM} \sim 140$ Hz), et une autre large d'allure gaussienne provenant du domaine non-apatitique amorphe ($\delta(^{31}\text{P}) = 3,1$ ppm et $\text{FWHM} \sim 450$ Hz). $B_0 = 7,05$ Tesla

Dans ce but, le diffractogramme de rayons X de l'échantillon CHA fut une nouvelle fois enregistré (cf. **Figure 55**). Un porte échantillon à bas bruit de fond en silicium

fut utilisé afin de minimiser la contribution en amorphe provenant du support, et un phénomène d'orientations préférentielles fut quant à lui minimisé en faisant tourner l'échantillon sur lui-même. Une fois le diffractogramme enregistré, il fut décomposé en deux fractions : le domaine apatitique cristallin sous la forme de plusieurs raies de diffraction (traits bleus pointillés) ; et le domaine non-apatitique amorphe sous la forme d'un fond continu (traits pointillés noirs). Cette décomposition permit d'obtenir l'intensité intégrale respective de chaque domaine, soit 40120 ± 620 pour le domaine cristallisé, et 30240 ± 600 pour le domaine amorphe. Ainsi, en supposant que chaque domaine possède un coefficient d'absorption similaire, un « taux de cristallinité » de $57 \% \pm 3 \%$ fut estimé, valeur très proche de celle obtenue en RMN (soit $65 \pm 5 \%$).

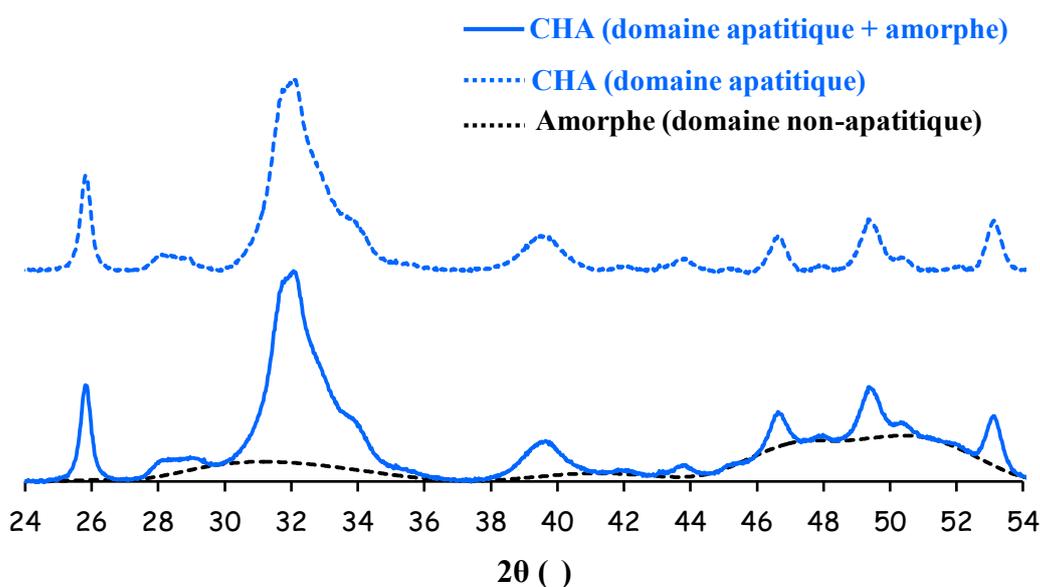


Figure 55. Diffractogramme X sur poudre obtenu au rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$ de l'échantillon d'apatite biomimétique CHA. Un porte échantillon à bas bruit de fond en silicium fut utilisé, et une rotation de l'échantillon sur lui-même fut appliquée.

- CHA-SBF

De la même manière, le spectre ^{31}P quantitatif de l'échantillon d'apatite carbonaté CHA-SBF fut également décomposé (cf. **Figure 56**). Cette fois-ci, cela conduit à une proportion atomique entre les phosphores du domaine apatitique et ceux du domaine non-apatitique, respectivement d'environ 55% et 45% ($\pm 5 \%$), soit une proportion similaire à celle mesurée dans le cas du minéral osseux (d'une brebis âgée de 2 ans).

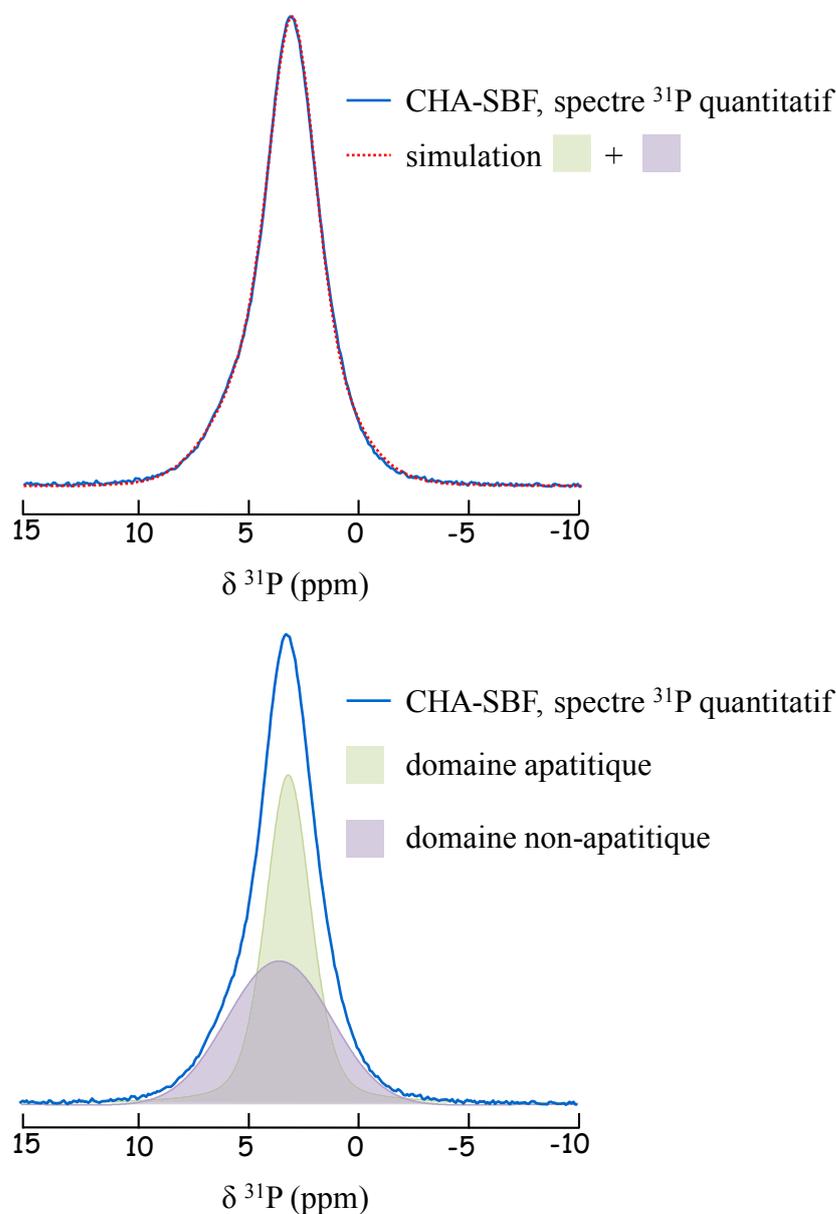


Figure 56. Décomposition du spectre ^{31}P quantitatif découplé du ^1H de l'échantillon d'apatite biomimétique CHA-SBF en deux composantes : l'une étroite d'allure lorentzienne provenant du domaine apatitique cristallisé ($\delta(^{31}\text{P}) = 3,1$ ppm et FWHM ~ 290 Hz), et une autre large d'allure gaussienne provenant du domaine non-apatitique amorphe ($\delta(^{31}\text{P}) = 3,2$ ppm et FWHM ~ 660 Hz). $B_0 = 7,05$ Tesla

II-4-1-e) MET-HR

Il est donc proposé au travers de ce travail de thèse, et par d'autres études de la littérature portant sur le minéral osseux ainsi que sur les apatites biomimétiques, qu'une plaquette d'apatite carbonatée serait formée d'un cœur apatitique cristallin et d'un domaine désordonné de surface non-apatitique (cf. **Figure 23** & **Figure 44**). La première technique qui vient à l'esprit afin de visualiser la présence d'un tel domaine de surface est la microscopie

électronique en transmission (MET) et en particulier, la MET à haute résolution (MET-HR). Les premiers clichés de MET-HR de cristaux d'apatite osseuse isolés, réalisés à partir d'une coupe d'un os spongieux de fœtus humain (âgé de 19 semaines), ont été présentés par William Landis et son équipe [64]. Un domaine non-apatitique désordonné en surface des cristaux n'a pas pu être distingué à partir de ces clichés, notamment en raison de la présence de la matrice organique. Une telle observation pourrait ainsi être rendue plus aisée à partir d'un cristal isolé d'apatite osseuse. Pour ce faire, le minéral osseux a besoin d'être préalablement extrait chimiquement.

- *Os déprotéiné*

Nous avons ainsi réalisé cette extraction, en suivant le mode opératoire élaboré par Steve Weiner et Paul Price (*cf.* méthode n 2 de l'article [61]). Ce dernier consiste à placer l'échantillon de tissu osseux dans une solution diluée de NaClO (pH ~ 9,6) renouvelée plusieurs fois, laquelle est elle-même placée dans un bain à ultra-sons à basse température. Cette procédure est décrite plus en détails dans la section « Matériels et méthodes ». Cette dernière fut choisie au détriment d'autres méthodes jugées plus invasives [65], [66], afin de ne pas modifier chimiquement le domaine non-apatitique. Ainsi, un cliché de MET-HR d'un cristal isolé d'apatite osseuse (**os déprotéiné**) est présenté sur la **Figure 57**. Ce cristal se présente sous la forme d'une plaquette irrégulière, avec une taille de ~27 nm de longueur et ~19 nm de largeur. Cette morphologie et cette taille sont en accord avec ce qu'il est proposé dans la littérature, à partir d'échantillons osseux provenant d'autres espèces animales que la brebis [67]–[69].

Durant cette observation, précaution a été prise afin que l'exposition de la particule sous le faisceau électronique soit la plus rapide possible, toujours dans l'optique d'éviter une dénaturation des fragiles cristaux d'apatite. Du fait de l'épaisseur très fine d'une plaquette d'apatite osseuse (soit ~2-5 nm), il est difficile d'obtenir un contraste avec le film de carbone satisfaisant. Néanmoins, le réseau cristallin apatitique est visible, et la particule semble monocristalline. En revanche, il est délicat de dire ici, si un domaine désordonné apparenté au domaine non-apatitique enrobe ou non la particule. Qui plus est, l'observation de ce dernier est très difficile du fait de son épaisseur extrêmement faible (attendue à ~0,8 nm, *cf.* II-2-2), ainsi que de sa potentielle confusion avec des franges de Fresnel. De plus, si le domaine non apatitique se trouve en surface de la plaquette, la condition idéale d'observation

serait une plaquette exposée selon sa tranche, ce que nous n'avons pas pu observer. Enfin, la possibilité que le domaine non-apatitique ait été dissout suite au traitement chimique visant à se défaire de la matrice organique n'est pas à exclure.

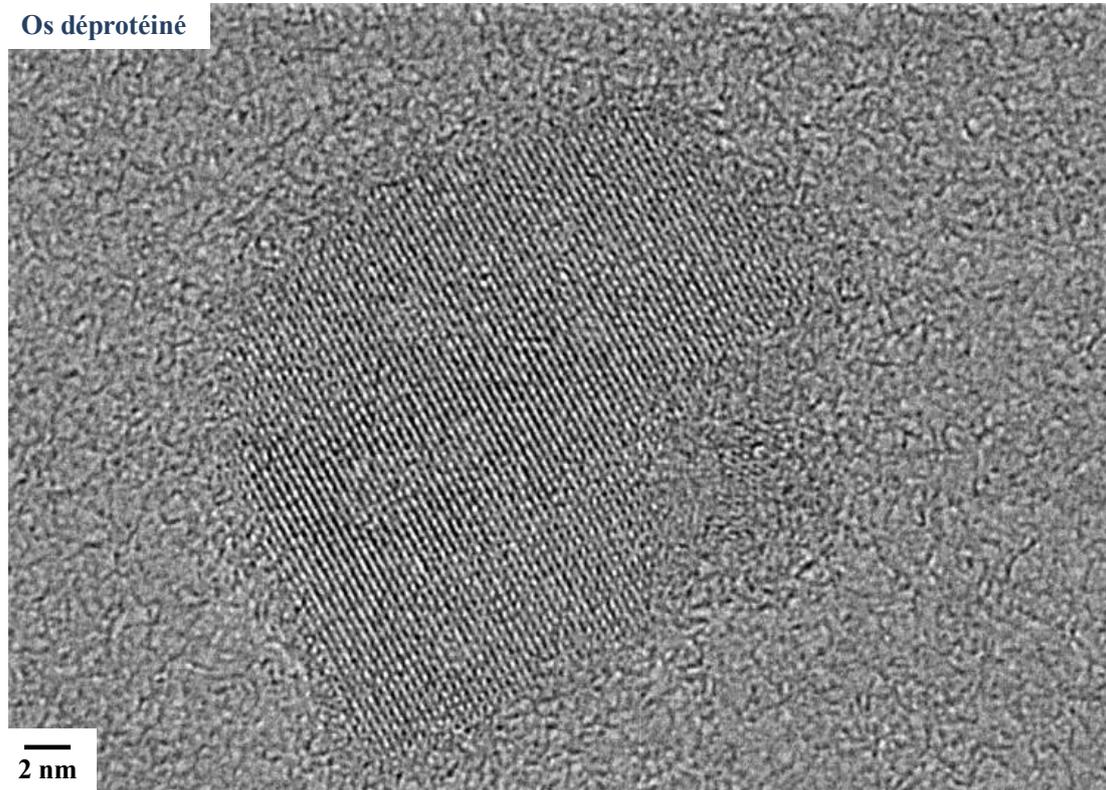


Figure 57. Cliché de MET-HR d'un cristal isolé d'apatite osseuse. La poudre de l'échantillon d'os déprotéiné utilisée fut au préalable dispersée dans de l'éthanol absolu.

- *Apatites biomimétiques*

De la même manière, des observations par MET-HR ont aussi été réalisées afin d'essayer de visualiser la présence du domaine non-apatitique en surface de **CHA-SBF** et **CHA** (cf. **Figure 58**).

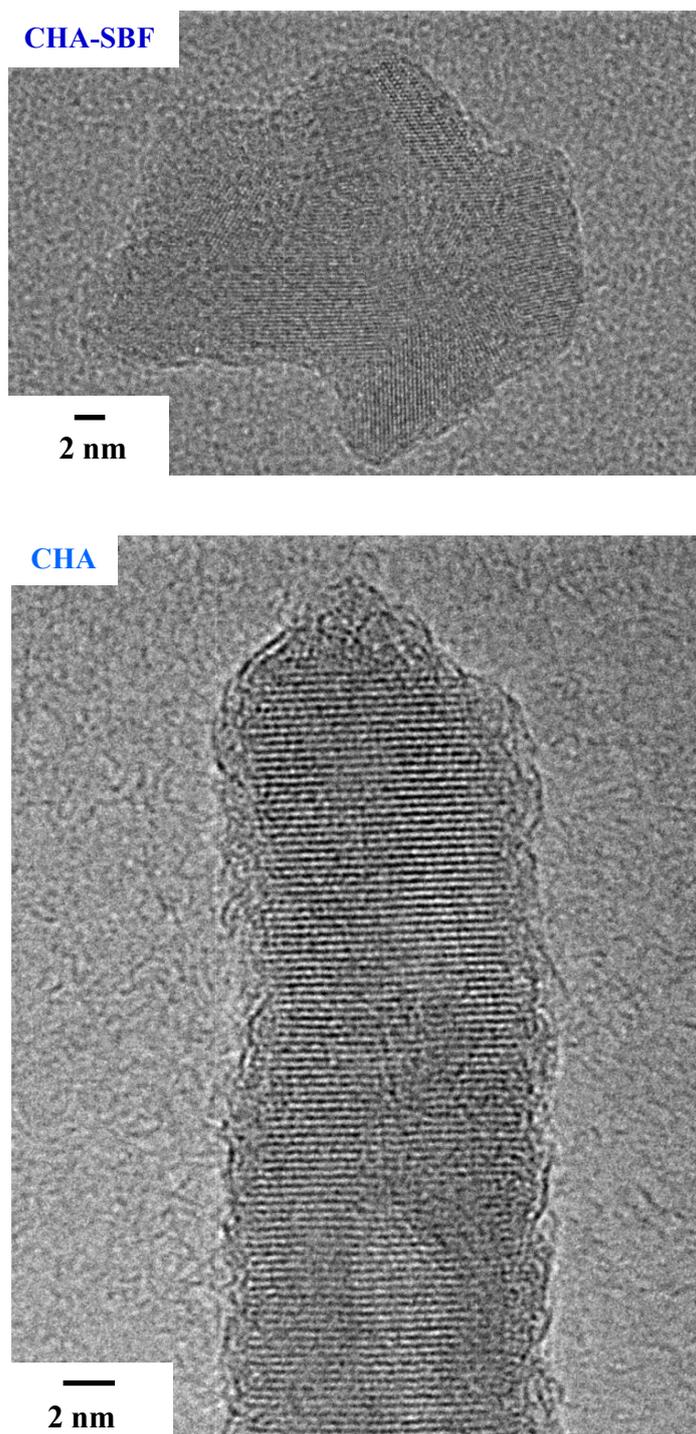


Figure 58. Clichés de MET-HR de 2 cristaux isolés des apatites biomimétiques **CHA-SBF** et **CHA**, dispersés au préalable dans de l'éthanol absolu.

Une nouvelle fois, précaution a été prise afin que l'exposition de la particule sous le faisceau électronique soit la plus rapide possible. Le réseau cristallin du cœur apatitique des particules peut être observé pour ces deux échantillons. Cependant, si la particule de **CHA** semble monocristalline (avec sa direction principale orientée selon l'axe *c*), celle de **CHA-**

SBF semble étonnamment être formée de plusieurs domaines cristallins. Etant donné que les plaquettes de **CHA-SBF** possèdent une taille similaire à celles du minéral osseux, il est ici encore une fois très délicat de conclure quant à la présence ou non d'un domaine non-apatitique désordonné en surface. Cependant, un tel domaine peut être observé pour **CHA**, dont les plaquettes ont des épaisseurs allant de 2 à 9 nm. Une telle observation a déjà été rapportée par le passé à partir d'une apatite de synthèse par Luca Bertinetti *et. al.* [70]. Néanmoins, il est nécessaire de prendre du recul par rapport à de telles observations. En effet, la présence de dégâts d'irradiation causés par le faisceau électronique pourrait conduire à une observation similaire. Ainsi, nous avons observé l'apparition d'une couche désordonnée semblable à celle-ci sur des bâtonnets de **HA** suite à leur exposition sous le faisceau d'électrons.

L'observation du domaine non-apatitique pour des apatites biologiques ou biomimétiques reste donc un challenge, en raison de la nature très fragile des objets sous le faisceau d'électrons.

II-4-2) Apatite stœchiométrique

Pour compléter cette étude, nous avons également étudié le caractère hydrophile de l'échantillon d'apatite stœchiométrique **HA**. Le but était de déterminer si des cristaux d'apatite de taille nanométrique étaient capables d'adsorber fortement des molécules d'eau à leur surface en l'absence d'un domaine non-apatitique (*cf.* **Figure 37**).

Ainsi, le spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P de **HA** humide a été enregistré (*cf.* **Figure 59**). Un protocole identique à celui utilisé pour **CHA** et **CHA-SBF** a été employé : après introduction de la poudre, il fut ajouté 10 μL d'eau osmosée directement dans le rotor à l'aide d'une pipette. Cette fois-ci, au contraire de **CHA-SBF** et **CHA**, aucun signal important provenant de molécules d'eau n'est observé à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm sur la dimension proton. Ce nouveau spectre ^1H - ^{31}P HetCor de **HA** humide est ainsi similaire à celui de **HA** à l'état sec (*cf.* **Figure 37**). Etant donné que les cristaux de **HA**, du minéral osseux, de **CHA-SBF** et de **CHA** ont tous une taille voisine, cette différence de comportement vis-à-vis de l'adsorption de molécules d'eau ne semble pas venir d'un effet de taille. Cela confirme que la forte adsorption des molécules d'eau à la surface des cristaux d'apatite ne semble pas possible en l'absence d'un domaine non-apatitique hydrophile de surface.

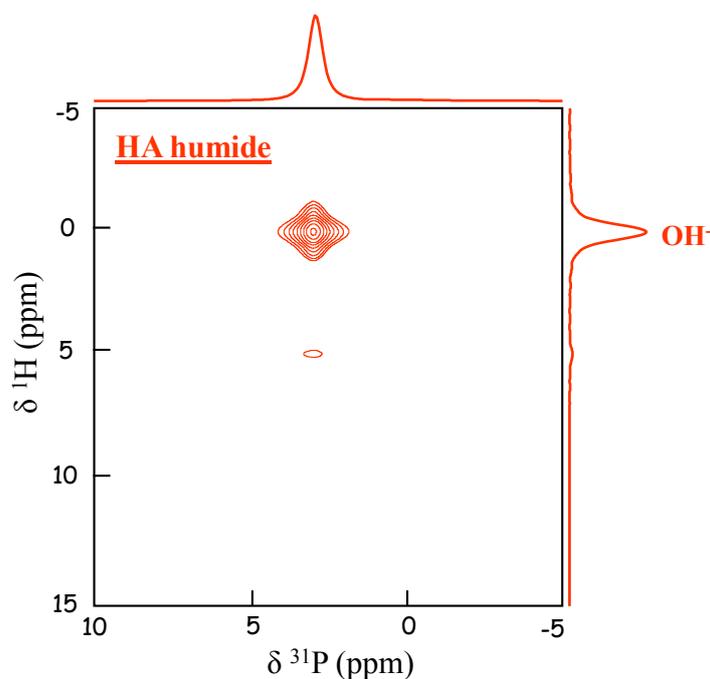


Figure 59. Spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P de l'échantillon d'apatite stœchiométrique de synthèse **HA** dans des conditions humides, suite à l'ajout de 10 μL d'eau osmosée ($v_{\text{rot}} = 8\text{kHz}$, $t_{\text{CP}} = 1\text{ ms}$). $B_0 = 7,05\text{ Tesla}$

II-4-3) Brushite et monétite

Les propriétés d'hydrophilie d'autres phases de phosphates de calcium ont également été étudiées, en particulier celles riches en espèces HPO_4^{2-} , comme la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et la monétite (CaHPO_4). Par ailleurs, la brushite est en sus composée de molécules d'eau de structure. L'idée était d'étudier le caractère hydrophile de ces deux phosphates de calcium, afin de sonder si la présence d'espèces HPO_4^{2-} en surface serait à l'origine de la forte adsorption des molécules d'eau en surface du minéral osseux et des apatites biomimétiques.

Ainsi, le spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P de la **monétite** ainsi que celui de la **brushite**, tous deux dans des conditions humides artificielles, ont été enregistrés (*cf.* **Figure 60**). Pour ce faire, après introduction de la poudre, il fut ajouté 10 μL de solution tampon à $\text{pH} = 4$ directement dans le rotor à l'aide d'une pipette. Un tel pH fut choisi afin d'éviter une transformation des échantillons durant le temps de l'expérience. Le spectre de la **monétite** présente 2 résonances ^{31}P résolues (à $\delta(^{31}\text{P}) \sim -0,2$ et $\sim -1,5$ ppm), lesquels corrént avec chacun des 2 sites protons inéquivalents des ions HPO_4^{2-} (à $\delta(^1\text{H}) \sim 13,6$ et $16,2$ ppm). La **brushite** est caractérisée par un unique site phosphore (à $\delta(^{31}\text{P}) = 1,4$ ppm), lequel corréle

avec les deux sites protons inéquivalents des molécules d'eau de structure (à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,1$ et $6,4$ ppm, non résolus ici à $\nu_{\text{rot}} = 8$ kHz et $B_0 = 7,05$ Tesla), ainsi qu'avec le site proton des ions HPO_4^{2-} (à $\delta(^1\text{H}) \sim 10,4$ ppm).

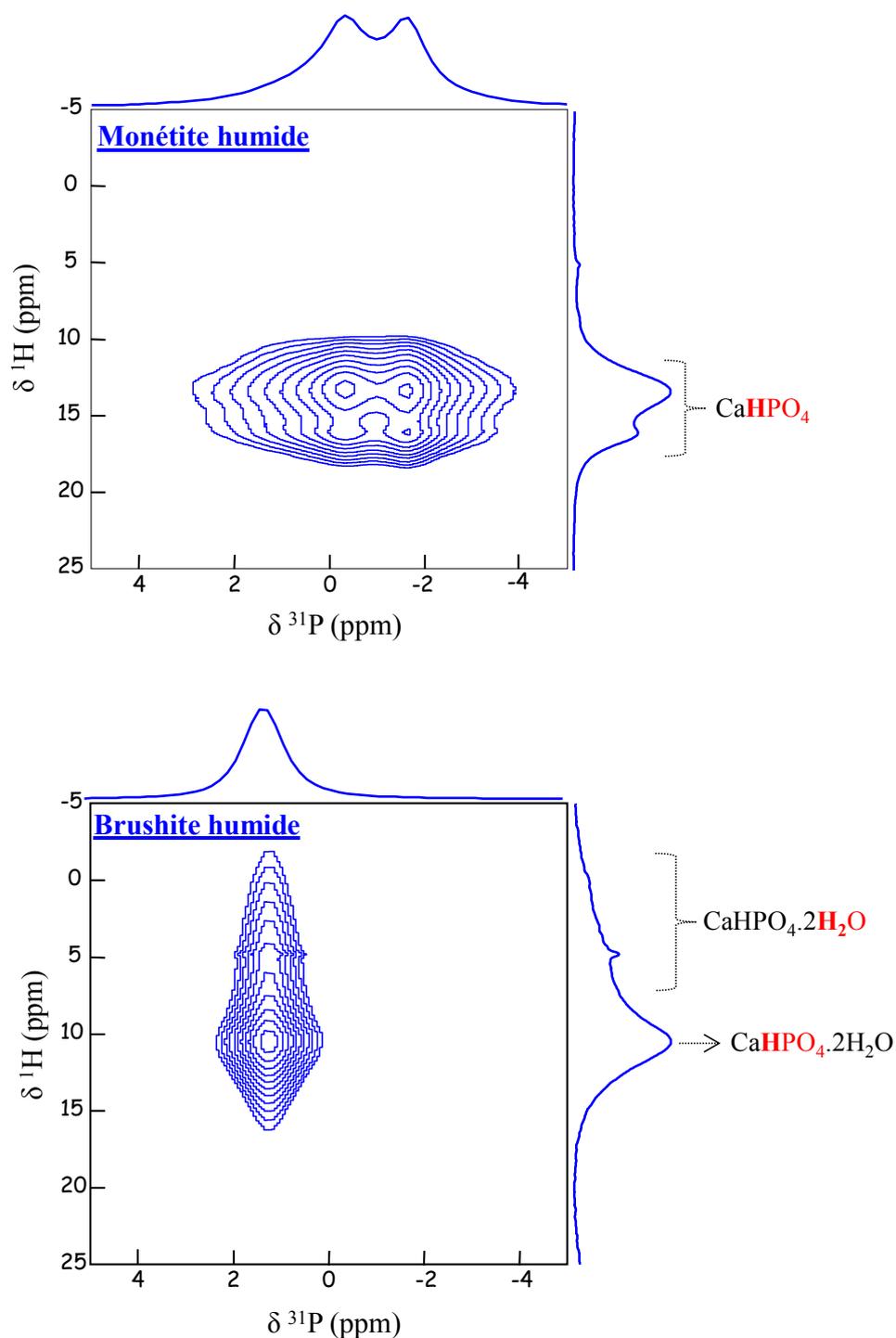


Figure 60. Spectres 2D HetCor ^1H - ^{31}P de la **monéite** et de la **brushite** ($\nu_{\text{rot}} = 8$ kHz, $t_{\text{CP}} = 2$ ms) dans des conditions humides artificielles, après un ajout de $10 \mu\text{L}$ de solution tampon $\text{pH} = 4$). $B_0 = 7,05$ Tesla

Il s'avère que, ni les cristaux de **monétite**, ni ceux de **brushite**, ne sont capables de fortement adsorber une quantité importante de molécules d'eau à leur surface. En effet, aucun signal intense ne peut être observé à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm sur la dimension proton. Et les spectres 2D sont ainsi similaires à ceux des poudres sèches. Ces observations suggèrent que le caractère hydrophile du minéral osseux serait dû à la structure intrinsèque du domaine non-apatitique de surface, plutôt qu'à la présence d'espèces HPO_4^{2-} en surface. Néanmoins, il est à noter que la taille des cristaux de ces deux échantillons pourrait en partie expliquer cette faible adsorption de molécules d'eau, car ces derniers sont composés de cristaux de taille micrométrique de faible surface spécifique.

II-4-4 / Conclusion & Discussion

Des études de divers échantillons de phosphates de calcium de référence dans des conditions humides artificielle ont été réalisées. Ces dernières laissent suggérer que : (i) le domaine non-apatitique du minéral osseux est intrinsèquement très hydrophile, sans le besoin de recourir au concours de certaines molécules organiques hydrophiles ; (ii) la surface d'un échantillon de phosphate de calcium riche en espèces HPO_4^{2-} n'est pas nécessairement de nature hydrophile ; (iii) la surface d'une apatite de synthèse dépourvue de domaine non-apatitique n'est pas capable de fortement adsorber une quantité importante de molécules d'eau.

Par ailleurs, cette idée de la présence d'une importante quantité d'eau fortement adsorbée à la surface du minéral osseux est en réalité un concept très ancien. En effet, dès les années 1950, les travaux de W. F. Neuman *et al.* sur les dynamiques d'adsorption et de « désorption » d'eau, ont abouti à la conclusion que les cristaux du minéral osseux posséderaient une coquille d'hydratation rigide en milieu aqueux [71], [72]. Ceci est corroboré par les travaux plus récents d'Erin Wilson *et al.* qui, à partir de mesures du couplage dipolaire hétéronucléaire $^1\text{H}-^{31}\text{P}$, ont proposé l'existence « d'une couche d'eau ordonnée à la surface des cristaux du minéral osseux » [20]. Cependant, seule l'utilisation de l'expérience HetCor $^1\text{H}-^{31}\text{P}$, lorsqu'elle est réalisée sur un échantillon d'os ayant conservé son état d'hydratation naturel, laisse apparaître une véritable signature spectroscopique de ces molécule d'eau « rigides » à la surface hydrophile du minéral osseux [21], [28], [30] (*cf. Figure 41*). De cette manière, cette coquille d'hydratation rigide agirait tel un agent interfacial, conditionnant les interactions d'un cristal d'apatite avec ses voisins ainsi qu'avec

la matière organique. **Les conséquences de ces molécules d'eau rigides en surface sur les interactions minéral-minéral seront discutées de manière approfondie au sein du chapitre IV.** Par ailleurs, également dans les années 1950, W. F. Neuman et ses collègues furent également les pionniers dans la description d'un domaine de surface possédant des capacités d'échanges ioniques (que l'on peut assimiler aujourd'hui au domaine non apatitique) [73]. Ces derniers ont également proposé que ces deux phénomènes (*i.e.* coquille d'hydratation et échanges ioniques en surface) puissent être étroitement liés. Cette proposition peut être résumée par la phrase suivante tirée d'un de leur article de 1953 : « *une partie de l'eau liée pourrait être due à l'hydratation individuelle de chaque ion échangeable se trouvant dans la surface cristalline* » [72].

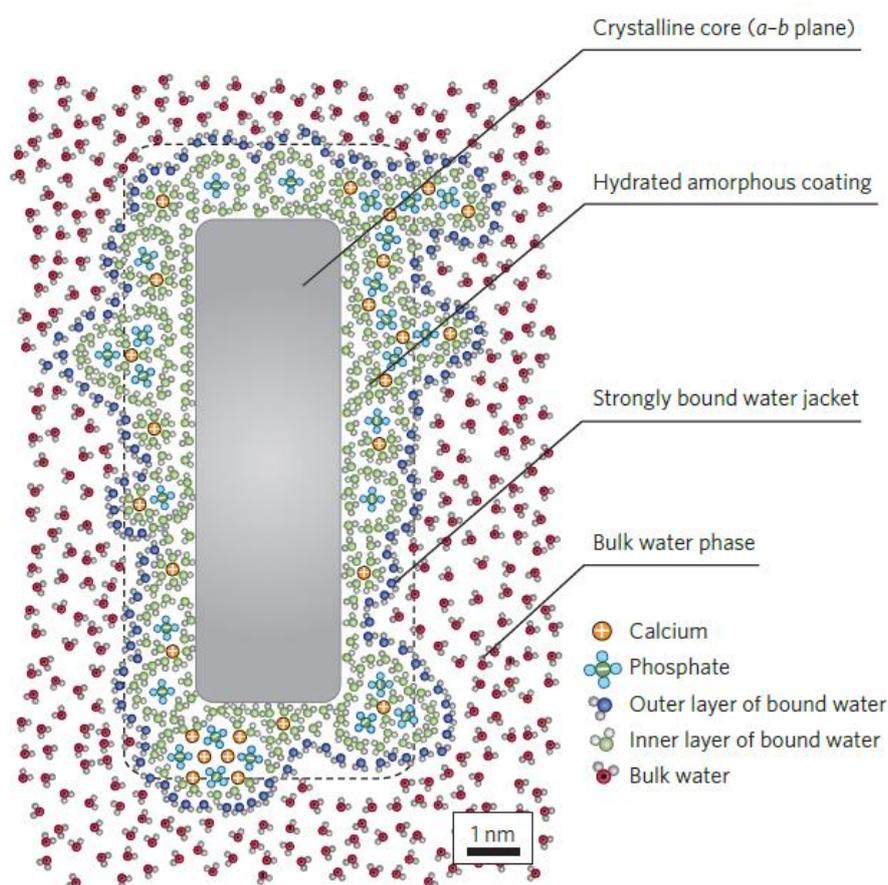


Figure 61. Modèle moléculaire afin de décrire le domaine non-apatitique hydraté de surface du minéral osseux, proposé par Melinda Duer et Arthurs Veis [74].

Une fois l'existence de ces molécules d'eau rigides en surface du minéral osseux avérée [28], Melinda Duer et Arthurs Veis ont proposé un modèle moléculaire afin de décrire cette surface hydratée [74] (*cf.* **Figure 61**). Ces derniers ont conservé l'idée originelle d'un

domaine apatitique de cœur (appelé ici « crystalline core »), englobé par un domaine non-apatitique désordonné et hydraté (appelé ici « hydrated amorphous coating »). Par intuition, ils proposent qu'une partie de ces molécules d'eau rigides soit incorporée au sein du domaine non-apatitique. Il est par ailleurs très intéressant de commenter la manière dont ils ont incorporé ces molécules d'eau. Ils n'ont pas retenu l'idée comme quoi elles pourraient être seulement physisorbées à l'intérieur de minuscules pores en surface. En effet, ils proposent à travers leur modèle, tout comme W. F. Neuman et ses collègues en 1953 [72], que ces molécules d'eau soient engagées dans la sphère d'hydratation de chacune des espèces ioniques qui composent la surface (appelées ici « inner layer of bound water » en vert sur la **Figure 61**). On peut imaginer qu'une telle configuration aurait pour conséquence que les espèces ioniques de surface ne soient que peu liées au minéral. Ces dernières auraient ainsi un caractère labile, et pourraient expliquer les propriétés d'échanges ioniques du minéral osseux (*cf.* I-3-g). Ceci semble néanmoins antagoniste avec le fait que la déshydratation du minéral osseux n'engendre aucune modification majeure de la signature RMN ^{31}P du domaine non-apatitique de surface (*cf.* **Figures 41 & 52**). A moins que les molécules d'eau résiduelles détectées après déshydratation (*cf.* **Figure 40**) permettent à elles seules la conservation de la structure du domaine non-apatitique. De plus, la partie des molécules d'eau fortement adsorbées en surface sous la forme d'une coquille d'hydratation sont ici appelées « outer layer of bound water » (en bleu sur la **Figure 61**). Ce modèle les décrirait comme étant sous la forme d'une seconde sphère d'hydratation des espèces ioniques de surface, ce qui serait cohérent avec leur nature rigide (*cf.* **Figure 40**).

Il est cependant délicat d'entériner l'exactitude d'un tel modèle à la vue du peu de connaissances dont nous disposons sur le domaine non-apatitique du minéral osseux. **En effet, une meilleure compréhension des ses propriétés physico-chimiques nécessite une meilleure description de ses caractéristiques structurales, ainsi que de sa composition chimique. C'est ce que nous avons entrepris de faire dans le chapitre III de ce manuscrit.**

Références bibliographiques

- [1] I. Rehman, R. Smith, L. L. Hench, et W. Bonfield, « Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 29, n° 10, p. 1287-1294, oct. 1995.
- [2] E. Kon, A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, I. Martin, A. Boyde, I. Ruspantini, P. Chistolini, M. Rocca, R. Giardino, R. Cancedda, et R. Quarto, « Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 49, n° 3, p. 328-337, mars 2000.
- [3] T. J. Gao, T. S. Lindholm, B. Kommonen, P. Ragni, A. Paronzini, T. C. Lindholm, T. Jamsa, et P. Jalovaara, « Enhanced healing of segmental tibial defects in sheep by a composite bone substitute composed of tricalcium phosphate cylinder, bone morphogenetic protein, and type IV collagen », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 32, n° 4, p. 505-512, déc. 1996.
- [4] Q. Shang, Z. Wang, W. Liu, Y. Shi, L. Cui, et Y. Cao, « Tissue-Engineered Bone Repair of Sheep Cranial Defects with Autologous Bone Marrow Stromal Cells », *J. Craniofac. Surg.*, vol. 12, n° Issue 6 - pp 586-593.
- [5] J. J. Freeman, B. Wopenka, M. J. Silva, et J. D. Pasteris, « Raman spectroscopic detection of changes in bioapatite in mouse femora as a function of age and in vitro fluoride treatment », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 68, n° 3, p. 156-162, mars 2001.
- [6] L. D. Mkukuma, J. M. S. Skakle, I. R. Gibson, C. T. Imrie, R. M. Aspden, et D. W. L. Hukins, « Effect of the Proportion of Organic Material in Bone on Thermal Decomposition of Bone Mineral: An Investigation of a Variety of Bones from Different Species Using Thermogravimetric Analysis coupled to Mass Spectrometry, High-Temperature X-ray Diffraction, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 75, n° 4, p. 321-328, oct. 2004.
- [7] W. P. Rothwell, J. S. Waugh, et J. P. Yesinowski, « High-resolution variable-temperature phosphorus-31 NMR of solid calcium phosphates », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, n° 8, p. 2637-2643, avr. 1980.
- [8] W. P. Aue, A. H. Roufousse, M. J. Glimcher, et R. G. Griffin, « Solid-state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of synthetic solid phases of calcium phosphate: potential models of bone mineral », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 23, n° 25, p. 6110-6114, déc. 1984.
- [9] P. S. Belton, R. K. Harris, et P. J. Wilkes, « Solid-state phosphorus-31 NMR studies of synthetic inorganic calcium phosphates », *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 49, n° 1, p. 21-27, janv. 1988.
- [10] J. P. Yesinowski et H. Eckert, « Hydrogen environments in calcium phosphates: proton MAS NMR at high spinning speeds », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, n° 21, p. 6274-6282, oct. 1987.
- [11] R. A. Santos, R. A. Wind, et C. E. Bronnimann, « ¹H CRAMPS and ¹H-³¹P HetCor Experiments on Bone, Bone Mineral, and Model Calcium Phosphate Phases », *J. Magn. Reson. B*, vol. 105, n° 2, p. 183-187, oct. 1994.
- [12] A. Kaflak-Hachulska, A. Samoson, et W. Kolodziejski, « ¹H MAS and ¹H ? ³¹P CP/MAS NMR Study of Human Bone Mineral », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 73, n° 5, p. 476-486, oct. 2003.

- [13] W. Kolodziejski, Éd., *Solid-State NMR Studies of Bone*, vol. 246. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [14] S. Maltsev, M. J. Duer, R. C. Murray, et C. Jaeger, « A solid-state NMR comparison of the mineral structure in bone from diseased joints in the horse », *J. Mater. Sci.*, vol. 42, n° 21, p. 8804-8810, août 2007.
- [15] Y. Wu, M. J. Glimcher, C. Rey, et J. L. Ackerman, « A unique protonated phosphate group in bone mineral not present in synthetic calcium phosphates. Identification by phosphorus-31 solid state NMR spectroscopy », *J. Mol. Biol.*, vol. 244, n° 4, p. 423-435, déc. 1994.
- [16] Y. Wu, J. L. Ackerman, D. A. Chesler, J. Li, R. M. Neer, J. Wang, et M. J. Glimcher, « Evaluation of bone mineral density using three-dimensional solid state phosphorus-31 NMR projection imaging », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 62, n° 6, p. 512-518, juin 1998.
- [17] Y. Wu, J. L. Ackerman, H.-M. Kim, C. Rey, A. Barroug, et M. J. Glimcher, « Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel, and synthetic hydroxyapatites », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 17, n° 3, p. 472-480, mars 2002.
- [18] J. Kolmas, A. Slószarczyk, A. Wojtowicz, et W. Kolodziejski, « Estimation of the specific surface area of apatites in human mineralized tissues using 31P MAS NMR », *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, vol. 32, n° 2, p. 53-58, oct. 2007.
- [19] C. Rey, J. L. Miquel, L. Facchini, A. P. Legrand, et M. J. Glimcher, « Hydroxyl groups in bone mineral », *Bone*, vol. 16, n° 5, p. 583-586, mai 1995.
- [20] E. E. Wilson, A. Awonusi, M. D. Morris, D. H. Kohn, M. M. Tecklenburg, et L. W. Beck, « Highly ordered interstitial water observed in bone by nuclear magnetic resonance », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 20, n° 4, p. 625-634, avr. 2005.
- [21] E. E. Wilson, A. Awonusi, M. D. Morris, D. H. Kohn, M. M. J. Tecklenburg, et L. W. Beck, « Three Structural Roles for Water in Bone Observed by Solid-State NMR », *Biophys. J.*, vol. 90, n° 10, p. 3722-3731, mai 2006.
- [22] G. Cho, Y. Wu, et J. L. Ackerman, « Detection of Hydroxyl Ions in Bone Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy », *Science*, vol. 300, n° 5622, p. 1123-1127, mai 2003.
- [23] A. H. Roufosse, W. P. Aue, J. E. Roberts, M. J. Glimcher, et R. G. Griffin, « Investigation of mineral phases of bone by solid-state phosphorus-31 magic-angle sample-spinning nuclear magnetic resonance », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 23, n° 25, p. 6115-6120, déc. 1984.
- [24] E. Davies, K. H. Muller, W. C. Wong, C. J. Pickard, D. G. Reid, J. N. Skepper, et M. J. Duer, « Citrate bridges between mineral platelets in bone », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 14, p. E1354-E1363, avr. 2014.
- [25] Y. Wang, S. Von Euw, G. Laurent, C. Crevant, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, N. Nassif, et T. Azaïs, « Impact of collagen confinement vs. ionic substitutions on the local disorder in bone and biomimetic apatites », *Mater. Horiz.*, vol. 1, n° 2, p. 224, 2014.
- [26] T. Isobe, S. Nakamura, R. Nemoto, M. Senna, et H. Sfihi, « Solid-State Double Nuclear Magnetic Resonance Study of the Local Structure of Calcium Phosphate Nanoparticles Synthesized by a Wet-Mechanochemical Reaction », *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, n° 20, p. 5169-5176, mai 2002.
- [27] A. Kaflak, D. Chmielewski, A. Górecki, et W. Kolodziejski, « Kinetics of 1H→31P cross-polarization in human trabecular bone », *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, vol. 10, n° 4, p. 191-195, févr. 1998.

- [28] Y. Wang, S. Von Euw, F. M. Fernandes, S. Cassaignon, M. Selmane, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, C. Coelho, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, T. Azaïs, et N. Nassif, « Water-mediated structuring of bone apatite », *Nat. Mater.*, vol. 12, n° 12, p. 1144-1153, nov. 2013.
- [29] J. Silvent, N. Nassif, C. Helary, T. Azaïs, J.-Y. Sire, et M. M. G. Guille, « Collagen Osteoid-Like Model Allows Kinetic Gene Expression Studies of Non-Collagenous Proteins in Relation with Mineral Development to Understand Bone Biomineralization », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 2, p. e57344, févr. 2013.
- [30] Y. Wang, T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif, « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite », *Nat. Mater.*, vol. 11, n° 8, p. 724-733, juill. 2012.
- [31] N. Nassif, F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, et M. M. Giraud-Guille, « *In Vivo* Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite », *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 12, p. 3653-3663, juin 2010.
- [32] A. Vyalikh, P. Simon, T. Kollmann, R. Kniep, et U. Scheler, « Local Environment in Biomimetic Hydroxyapatite–Gelatin Nanocomposites As Probed by NMR Spectroscopy », *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, n° 5, p. 1513-1519, févr. 2011.
- [33] A. J. Taylor, E. Rendina, B. J. Smith, et D. H. Zhou, « Analyses of mineral specific surface area and hydroxyl substitution for intact bone », *Chem. Phys. Lett.*, vol. 588, p. 124-130, nov. 2013.
- [34] J. Gómez-Morales, M. Iafisco, J. M. Delgado-López, S. Sarda, et C. Drouet, « Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects », *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 59, n° 1, p. 1-46, mars 2013.
- [35] P. Zhu, J. Xu, N. Sahar, M. D. Morris, D. H. Kohn, et A. Ramamoorthy, « Time-Resolved Dehydration-Induced Structural Changes in an Intact Bovine Cortical Bone Revealed by Solid-State NMR Spectroscopy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n° 47, p. 17064-17065, déc. 2009.
- [36] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, et A. Barroug, « Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, n° 2, p. 198-205, 2007.
- [37] C. Drouet, « Apatite Formation: Why It May Not Work as Planned, and How to Conclusively Identify Apatite Compounds », *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 1-12, 2013.
- [38] A. Pines, « Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids », *J. Chem. Phys.*, vol. 59, n° 2, p. 569, 1973.
- [39] M. A. Fernández-Seara, S. L. Wehrli, et F. W. Wehrli, « Diffusion of exchangeable water in cortical bone studied by nuclear magnetic resonance », *Biophys. J.*, vol. 82, n° 1, p. 522-529, 2002.
- [40] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, et M. Epple, « A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite », *Magn. Reson. Chem.*, vol. 44, n° 6, p. 573-580, mai 2006.
- [41] K. Schmidt-Rohr et H. W. Spiess, *Multidimensional Solid-state NMR and Polymers*. Academic Press, 1994.
- [42] S.-J. Huang, Y.-L. Tsai, Y.-L. Lee, C.-P. Lin, et J. C. C. Chan, « Structural Model of Rat Dentin Revisited », *Chem. Mater.*, vol. 21, n° 13, p. 2583-2585, juill. 2009.

- [43] Y. Ishii et R. Tycko, « Sensitivity Enhancement in Solid State ^{15}N NMR by Indirect Detection with High-Speed Magic Angle Spinning », *J. Magn. Reson.*, vol. 142, n° 1, p. 199-204, janv. 2000.
- [44] Y. Ishii, J. P. Yesinowski, et R. Tycko, « Sensitivity Enhancement in Solid-State ^{13}C NMR of Synthetic Polymers and Biopolymers by ^1H NMR Detection with High-Speed Magic Angle Spinning », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, n° 12, p. 2921-2922, mars 2001.
- [45] E. K. Paulson, C. R. Morcombe, V. Gaponenko, B. Dancheck, R. A. Byrd, et K. W. Zilm, « High-Sensitivity Observation of Dipolar Exchange and NOEs between Exchangeable Protons in Proteins by 3D Solid-State NMR Spectroscopy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, n° 47, p. 14222-14223, nov. 2003.
- [46] J. W. Wiench, C. E. Bronnimann, V. S.-Y. Lin, et M. Pruski, « Chemical shift correlation NMR spectroscopy with indirect detection in fast rotating solids: Studies of organically functionalized mesoporous silicas », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 40, p. 12076-12077, 2007.
- [47] D. H. Zhou, G. Shah, C. Mullen, D. Sandoz, et C. M. Rienstra, « Proton-Detected Solid-State NMR Spectroscopy of Natural-Abundance Peptide and Protein Pharmaceuticals », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, n° 7, p. 1253-1256, févr. 2009.
- [48] N. Baccile, G. Laurent, C. Bonhomme, P. Innocenzi, et F. Babonneau, « Solid-State NMR Characterization of the Surfactant-Silica Interface in Templated Silicas: Acidic versus Basic Conditions », *Chem. Mater.*, vol. 19, n° 6, p. 1343-1354, mars 2007.
- [49] N. Folliet, C. Roiland, S. Bégu, A. Aubert, T. Mineva, A. Goursot, K. Selvaraj, L. Duma, F. Tielens, F. Mauri, G. Laurent, C. Bonhomme, C. Gervais, F. Babonneau, et T. Azaïs, « Investigation of the Interface in Silica-Encapsulated Liposomes by Combining Solid State NMR and First Principles Calculations », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, n° 42, p. 16815-16827, oct. 2011.
- [50] J. Kolmas et W. Kolodziejski, « Inverse $^{31}\text{P}\rightarrow^1\text{H}$ NMR cross-polarization in hydrated nanocrystalline calcium hydroxyapatite », *Chem. Phys. Lett.*, vol. 554, p. 128-132, déc. 2012.
- [51] F. Babonneau, F. Babonneau, C. Bonhomme, S. Hayakawa, et A. Osaka, « Solid State NMR Characterization of Nano-crystalline hydroxy-carbonate Apatite Using ^1H - ^{31}P - ^{13}C Triple Resonance Experiments », *MRS Proc.*, vol. 984, janv. 2006.
- [52] J. C. Heughebaert, « Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques », INP, Toulouse, 1977.
- [53] A. George et A. Veis, « Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 11, p. 4670-4693, nov. 2008.
- [54] G. He, T. Dahl, A. Veis, et A. George, « Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1 », *Nat. Mater.*, vol. 2, n° 8, p. 552-558, août 2003.
- [55] C. Jaeger, N. S. Groom, E. A. Bowe, A. Horner, M. E. Davies, R. C. Murray, et M. J. Duer, « Investigation of the Nature of the Protein-Mineral Interface in Bone by Solid-State NMR », *Chem. Mater.*, vol. 17, n° 12, p. 3059-3061, juin 2005.
- [56] E. R. Wise, S. Maltsev, M. E. Davies, M. J. Duer, C. Jaeger, N. Loveridge, R. C. Murray, et D. G. Reid, « The Organic-Mineral Interface in Bone Is Predominantly Polysaccharide », *Chem. Mater.*, vol. 19, n° 21, p. 5055-5057, oct. 2007.
- [57] E. Davies, K. H. Muller, W. C. Wong, C. J. Pickard, D. G. Reid, J. N. Skepper, et M. J. Duer, « Citrate bridges between mineral platelets in bone », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 14, p. E1354-E1363, avr. 2014.
- [58] Y.-Y. Hu, A. Rawal, et K. Schmidt-Rohr, « Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 52, p. 22425-22429, déc. 2010.

- [59] W. Y. Chow, R. Rajan, K. H. Muller, D. G. Reid, J. N. Skepper, W. C. Wong, R. A. Brooks, M. Green, D. Bihan, R. W. Farndale, D. A. Slatter, C. M. Shanahan, et M. J. Duer, « NMR Spectroscopy of Native and in Vitro Tissues Implicates PolyADP Ribose in Biomineralization », *Science*, vol. 344, n° 6185, p. 742-746, mai 2014.
- [60] L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, et S. Weiner, « A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 84, n° 9, p. 2732-2736, 1987.
- [61] S. Weiner et P. A. Price, « Disaggregation of bone into crystals », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 39, n° 6, p. 365-375, 1986.
- [62] R. Mathew, P. N. Gunawidjaja, I. Izquierdo-Barba, K. Jansson, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, et M. Edén, « Solid-State ^{31}P and ^1H NMR Investigations of Amorphous and Crystalline Calcium Phosphates Grown Biomimetically From a Mesoporous Bioactive Glass », *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, n° 42, p. 20572-20582, oct. 2011.
- [63] P. B. White, T. Wang, Y. B. Park, D. J. Cosgrove, et M. Hong, « Water-Polysaccharide Interactions in the Primary Cell Wall of *Arabidopsis thaliana* from Polarization Transfer Solid-State NMR », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, n° 29, p. 10399-10409, juill. 2014.
- [64] X. Su, K. Sun, F. . Cui, et W. . Landis, « Organization of apatite crystals in human woven bone », *Bone*, vol. 32, n° 2, p. 150-162, févr. 2003.
- [65] H.-M. Kim, C. Rey, et M. J. Glimcher, « Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature », *J. Bone Miner. Res.*, vol. 10, n° 10, p. 1589-1601, 1995.
- [66] J. D. Termine, E. D. Eanes, D. J. Greenfield, M. U. Nysten, et R. A. Harper, « Hydrazine-deproteinated bone mineral », *Calcif. Tissue Res.*, vol. 12, n° 1, p. 73-90, 1973.
- [67] M. J. Glimcher, « Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation », *Rev. Mineral. Geochem.*, vol. 64, n° 1, p. 223-282, janv. 2006.
- [68] D. S. Bocciarelli, « Morphology of crystallites in bone », *Calcif. Tissue Res.*, vol. 5, n° 1, p. 261-269, 1970.
- [69] W. J. Landis, J. Moradian-oldak, et S. Weiner, « Topographic imaging of mineral and collagen in the calcifying turkey tendon », *Connect. Tissue Res.*, vol. 25, n° 3-4, p. 181-196, janv. 1991.
- [70] L. Bertinetti, A. Tampieri, E. Landi, C. Ducati, P. A. Midgley, S. Coluccia, et G. Martra, « Surface Structure, Hydration, and Cationic Sites of Nanohydroxyapatite: UHR-TEM, IR, and Microgravimetric Studies », *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, n° 10, p. 4027-4035, mars 2007.
- [71] W. F. Neuman et M. W. Neuman, *The Chemical Dynamics of Bone.*, University of Chicago Press, Chicago. 1958.
- [72] W. F. Neuman, T. Y. Toribara, et B. J. Mulryan, « The Surface Chemistry of Bone. VII. The Hydration Shell », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 75, n° 17, p. 4239-4242, 1953.
- [73] W. F. Neuman, T. Y. Toribara, et B. J. Mulryan, « The Surface Chemistry of Bone. IX. Carbonate: Phosphate Exchange1 », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, n° 17, p. 4263-4266, 1956.
- [74] M. Duer et A. Veis, « Bone mineralization: Water brings order », *Nat. Mater.*, vol. 12, n° 12, p. 1081-1082, nov. 2013.

Chapitre III /

Etude du domaine non-apatitique de surface

Chapitre III / Etude du domaine non-apatitique de surface	152
Introduction	152
III-1 / Comparaison avec un phosphate de calcium amorphe.....	154
III-1-1) Comparaison par RMN ^{31}P	154
III-1-2) Comparaison par RMN ^1H	154
III-1-3) Caractère hydrophile de l'ACP	156
III-1-4) Conclusion & Discussion.....	157
III-2/ Etude de la composition chimique du domaine non-apatitique	161
III-2-1) Etude des ions HPO_4^{2-}	161
III-2-2) Etude des ions CO_3^{2-}	170
III-2-2-a) <i>Spectroscopie infrarouge</i>	170
III-2-2-b) <i>RMN 2D ^1H-^{13}C</i>	172
III-2-3) Etude des ions Ca^{2+}	176
III-3 / Conclusion.....	179
Références bibliographiques.....	180

Chapitre III / Etude du domaine non-apatitique de surface

Introduction

De nombreuses zones d'ombres restent encore à explorer concernant les caractéristiques structurales du domaine désordonné en surface du minéral osseux. Il est fait référence à ce dernier sous différentes appellations dans la littérature : couche désordonnée [1], couche hydratée [2] ou encore domaine non-apatitique [3]. Des études antérieures par Christophe Drouet et ses collègues proposent que la couche de surface d'apatites de synthèse possède une structure proche de celle de la brushite si étudiée par RMN ^{31}P , ou bien proche du phosphate octocalcique (OCP) si étudiée par infrarouge [4]. Une étude détaillée par RMN à l'état solide d'apatites nanocristallines de synthèse réalisée par les équipes de Christian Jäger et Mathias Epple, a conclu que ce domaine de surface désordonné avait une composition proche de celle de l'OCP [3]. Très récemment, l'équipe de Melinda Duer s'est appuyée sur ces résultats pour proposer que le domaine non-apatitique du minéral osseux corresponde à une phase de type « OCP désordonné » stabilisée par une forte interaction avec des ions citrate [5]. Enfin, des études d'échantillons de dentine de rat par RMN à l'état solide ont conclu à la présence d'une phase de type phosphate de calcium amorphe (ACP) en surface des particules [6], mais aucune comparaison directe avec un échantillon synthétique n'a été effectuée.

Comme on peut le constater, il n'existe à ce jour aucun consensus dans la littérature. Néanmoins, à partir des résultats dont nous disposons, nous nous sommes orientés vers une comparaison avec un échantillon d'ACP de synthèse. Cet échantillon est celui déjà introduit dans le chapitre II (*cf.* **Figure 48**). Nous rappelons qu'afin qu'il soit un modèle adéquat pour le domaine non-apatitique du minéral osseux riche en espèces HPO_4^{2-} (*cf.* II-3-2), il fut synthétisé à pH alcalin (pH \sim 10-11) en suivant la méthode élaborée par J. C. Heughebaert [7]. Le ratio molaire Ca/P de cet échantillon d'ACP a été estimé à $1,3 \pm 0,1$ par microanalyse X, et mesuré à 1,41 par analyse chimique élémentaire. Cet échantillon d'ACP peut ainsi être assimilé à un phosphate tricalcique amorphe, d'un ratio Ca/P idéal de 1,5 et d'une composition chimique théorique de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ [8], [9], dont le remplacement de certains ions PO_4^{3-} par des ions HPO_4^{2-} pourrait abaisser le ratio Ca/P [10], [11]. Afin d'établir de potentielles similitudes avec le domaine non-apatitique du minéral osseux, nous avons tout

d'abord comparé leurs réponses RMN ^{31}P et ^1H , puis avons caractérisé les propriétés d'hydrophilie des particules d'ACP.

Nous avons ensuite entrepris l'étude de la composition ionique du domaine non-apatite du minéral osseux. Dans cette optique, l'utilisation de l'outil RMN comme sonde locale efficace s'avérera particulièrement appropriée. Ainsi, les noyaux ^1H et ^{31}P seront étudiés directement à partir d'un échantillon d'os « intact », alors que les noyaux ^{13}C et ^{43}Ca le seront à partir de deux apatites biomimétiques enrichies en ces isotopes respectifs.

III-1 / Comparaison avec un phosphate de calcium amorphe

III-1-1) Comparaison par RMN ^{31}P

Le spectre RMN ^{31}P CP MAS de l'échantillon d'ACP a été comparé au signal ^{31}P reconstruit du domaine non-apatitique d'un échantillon d'os sec (obtenu à partir de l'expérience HetCor de la **Figure 40**). Il se présente sous la forme d'une unique résonance d'allure gaussienne, laquelle est, tout comme celle du domaine non-apatitique du minéral osseux, centrée à $\delta(^{31}\text{P}) \sim 3,2$ ppm (cf. **Figure 62**). De plus, chacune de ces deux résonances présente une largeur spectrale voisine (*i.e.* FWHM ~ 700 Hz pour l'ACP, et FWHM ~ 640 Hz pour le domaine non-apatitique). Il semble donc que l'environnement chimique phosphore soit similaire dans l'ACP et dans le domaine non-apatitique du minéral osseux. En particulier, l'allure gaussienne des deux résonances est caractéristique de l'environnement désordonné des ions phosphates.

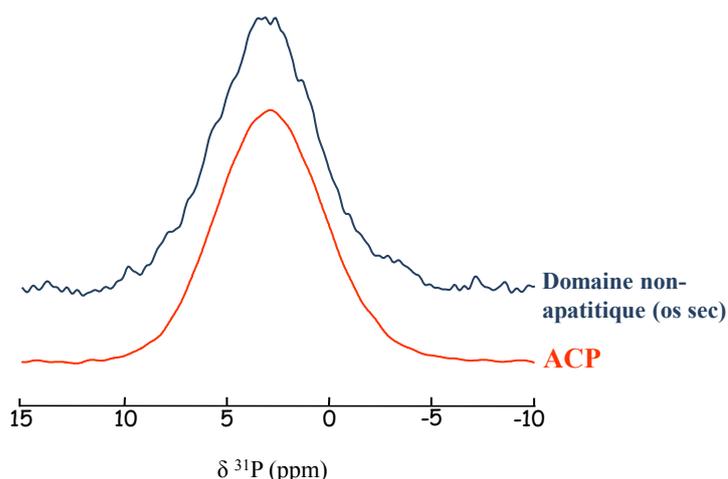


Figure 62. Comparaison entre le spectre ^{31}P CP MAS ($\nu_{rot} = 14$ kHz, $t_{CP} = 10$ ms) de l'ACP et le signal ^{31}P reconstruit du domaine non-apatitique du minéral osseux (os sec, $\nu_{rot} = 14$ kHz, $t_{CP} = 10$ ms). $B_0 = 7,05$ Tesla

III-1-2) Comparaison par RMN ^1H

La réponse RMN ^1H de l'ACP fut également comparée à celle du domaine non-apatitique du minéral osseux (cf. **Figure 63**). Bien que l'échantillon d'ACP ait été lyophilisé, son spectre RMN ^1H MAS simple impulsion ne permet pas d'identifier les résonances ^1H provenant du minéral. En effet, ce dernier est dominé par un signal très intense à $\delta(^1\text{H}) \sim 5,3$ ppm provenant de molécules d'eau adsorbées (cf. **Figure 63**).

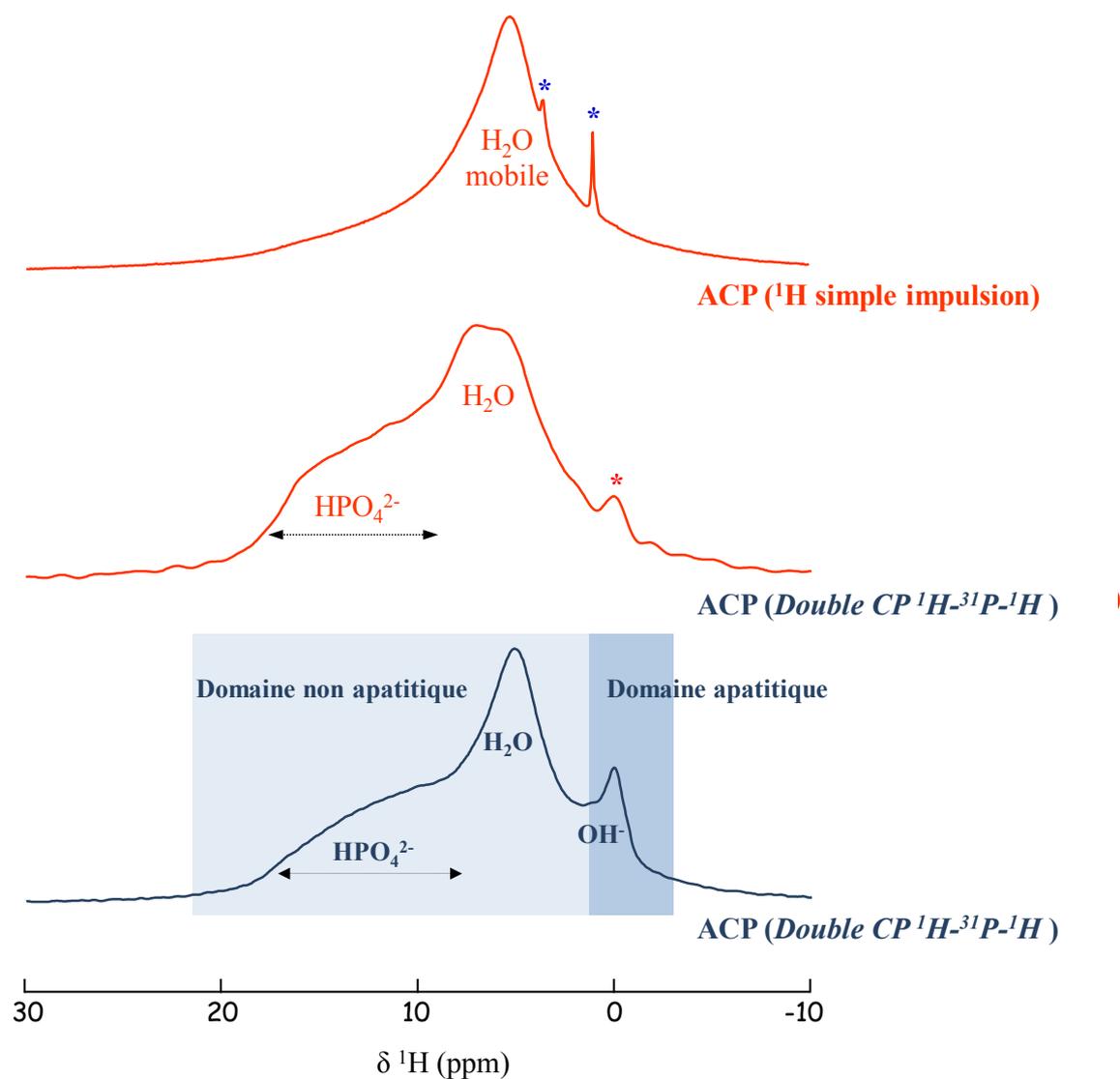


Figure 63. Spectre RMN MAS ^1H simple impulsion d'un échantillon d'ACP ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz), et spectres Double CP $^1\text{H}-^{31}\text{P}-^1\text{H}$ des échantillons d'ACP et d'os sec ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz, $t_{\text{CP1}} = t_{\text{CP2}} = 1$ ms). Les résonances très fines marquées par des étoiles bleues proviennent d'une légère pollution à l'éthanol. La résonance marquée par une étoile rouge sur le spectre de l'ACP provient d'une légère pollution d'apatite. $B_0 = 7,05$ Tesla.

Afin de supprimer les contributions des molécules d'eau mobiles, nous nous sommes tournés vers une expérience de Double CP de type « aller et retour » $^1\text{H}-^{31}\text{P}-^1\text{H}$ (cf. **Figure 63**) introduite dans le chapitre II (cf. **Figures 31**) et déjà utilisée sur un échantillon d'os sec (cf. **Figure 46**). Afin d'exalter le signal provenant des espèces HPO_4^{2-} , des temps de contacts courts ont été utilisés (*i.e.* $t_{\text{CP1}} = t_{\text{CP2}} = 1$ ms). La comparaison entre le spectre ^1H simple impulsion et celui de double CP $^1\text{H}-^{31}\text{P}-^1\text{H}$ de l'ACP, confirme qu'une grande partie

des molécules d'eau mobiles à $\delta(^1\text{H}) \sim 5,3$ ppm n'est plus détectée dorénavant. Ainsi, seul persiste dans cette zone le signal provenant de molécules d'eau rigides (fortement adsorbées ou incorporées dans les grains d'ACP) à $\delta(^1\text{H}) \sim 5,8$ ppm. Par ailleurs, un signal intense et très étendu apparaît dans la gamme $\delta(^1\text{H}) \sim 7-18$ ppm qui peut être attribué une nouvelle fois à des espèces HPO_4^{2-} . Une distribution de la force des liaisons-H dans lesquels ces groupements sont engagés pourrait expliquer la largeur de ce signal pour les deux échantillons.

Nous constatons donc que l'allure du signal ^1H de l'ACP possède des points communs avec celui du domaine non-apatitique du minéral osseux (*cf.* **Figure 63**). Cela suggère que des ions HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique se trouvent dans un environnement chimique très désordonné, avec des protons engagés dans un important réseau de liaisons-H.

III-1-3) Caractère hydrophile de l'ACP

Les propriétés d'hydrophilie de l'échantillon d'ACP ont également été étudiées. Le spectre 2D HetCor $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ de l'échantillon d'ACP sec fut comparé à celui du même échantillon une fois hydraté artificiellement (*cf.* **Figure 64**). Pour ce faire, la même procédure a été utilisée avec l'ajout de 10 μL d'eau osmosée directement dans le rotor après l'introduction de la poudre. L'expérience sur l'échantillon d'ACP humide fut réalisée dans un laps de temps très court (*i.e.* moins de 10 minutes), afin d'éviter son hydrolyse et sa transformation en phases thermodynamiquement plus stables.

Le spectre HetCor $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ de l'échantillon d'ACP sec laisse apparaître une tache de corrélation importe (*ν*), dont la projection sur la voie ^1H correspond au spectre Double CP $^1\text{H}-^{31}\text{P}-^1\text{H}$ présenté en **Figure 63**. Une fois l'échantillon d'ACP humidifié, cette tache de corrélation étendue disparaît au détriment d'une nouvelle très intense et très étroite sur la dimension proton (*νi*) à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm), qui est donc attribuée à des molécules d'eau fortement adsorbées en surface. Les grains d'ACP possèdent ainsi un comportement similaire à celui du domaine non-apatitique du minéral osseux envers l'adsorption de molécules d'eau. Il est étonnant de constater que, contrairement à la brushite ou à la monétite (*cf.* **Figure 60**), tous les protons des ions HPO_4^{2-} de l'ACP sont engagés dans un échange chimique rapide avec les molécules d'eau.

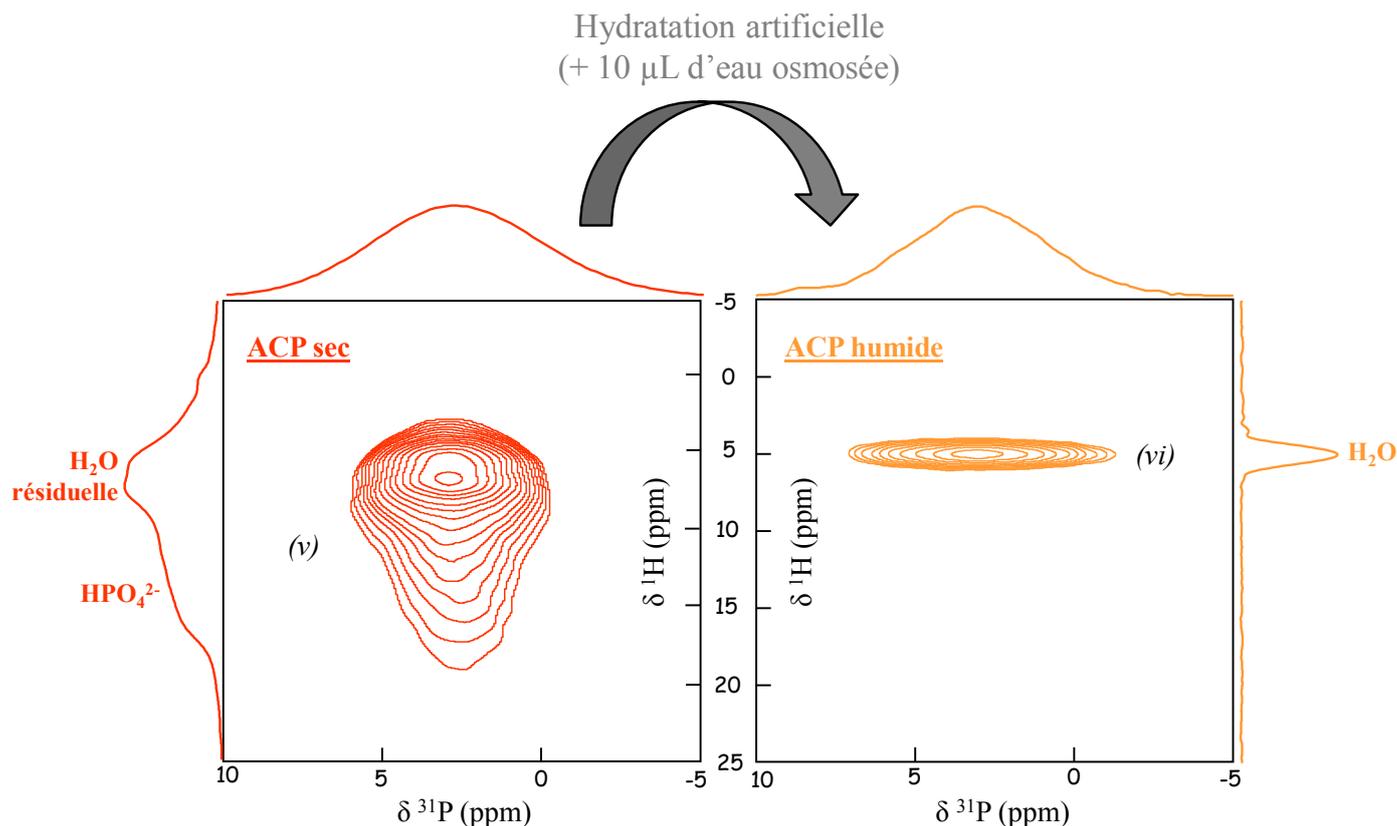


Figure 64. Comparaison entre le spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P de l'échantillon d'ACP sec, $\nu_{rot} = 14\text{kHz}$, $t_{CP} = 1\text{ ms}$, et celui du même échantillon une fois hydraté artificiellement ($\nu_{rot} = 8\text{ kHz}$, $t_{CP} = 10\text{ ms}$). L'observation de la tache de corrélation intense (vi) révèle la présence d'une quantité importante de molécules d'eau fortement adsorbées en surface des grains d'ACP humide. $B_0 = 7,05\text{ Tesla}$

III-1-4) Conclusion & Discussion

Il a ainsi été démontré que l'ACP et le domaine non-apatitique du minéral osseux possédaient des signatures RMN ^1H et ^{31}P similaires (cf. **Figures 62 & 63**), avec la présence : (i) de molécules d'eau résiduelles et (ii) d'espèces HPO_4^{2-} dans un environnement chimique très distribué. De plus, des propriétés d'hydrophilie analogues ont été observées (cf. **Figures 40 & 64**), avec pour tous deux, la capacité de fortement adsorber une quantité importante de molécules d'eau à leur surface.

Pour la toute première fois, ces résultats mettent en lumière que le domaine non-apatitique du minéral osseux possède une structure chimique, ainsi que des propriétés d'hydrophilie, proches de celle d'un phosphate de calcium amorphe.

Cependant, une importante différence entre les grains synthétiques d'**ACP** et le domaine non-apatitique du minéral osseux est à mentionner : il s'agit de leur stabilité respective en milieu aqueux. En effet, le domaine non-apatitique du minéral osseux s'accommode de sa coquille d'hydratation rigide *in vivo* sans subir aucune modification structurale, à l'exception du lent phénomène de maturation (environ plusieurs jours voire plusieurs mois, *cf.* **Figures 23 & 25**, et réf. [12]), alors que les grains d'**ACP** de synthèse sont métastables et, après l'ajout d'eau osmosée, se transforment après 20 minutes en brushite et en hydroxyapatite (*cf.* **Figure 65** & réf. [13]).

Afin de commenter une telle différence de comportement, plusieurs points peuvent être évoqués. Premièrement, une différence de composition chimique peut être envisagée. Ainsi, des ions Mg^{2+} , dont la capacité à stabiliser certaines phases métastables est connue [14], [15], pourraient être incorporés au sein du domaine non-apatitique amorphe du minéral osseux. Deuxièmement, il est également envisageable que le domaine non-apatitique du minéral osseux soit stabilisé suite à l'adsorption en surface de certaines espèces organiques comme des protéines non-collagéniques spécifiques.

Ces propositions ne sont néanmoins pas satisfaisantes à l'égard du comportement du domaine non-apatitique de l'apatite biomimétique **CHA**. En effet, le protocole de synthèse de cette dernière est dépourvu de toute addition d'ions Mg^{2+} ainsi que d'additifs organiques. De même, le protocole de synthèse de l'apatite biomimétique **CHA-SBF** est aussi dépourvu de tout additif organique. Néanmoins, les domaines non-apatitiques de **CHA** et de **CHA-SBF** se sont avérés stables pendant plusieurs heures en conditions humides (*cf.* **Figure 52**).

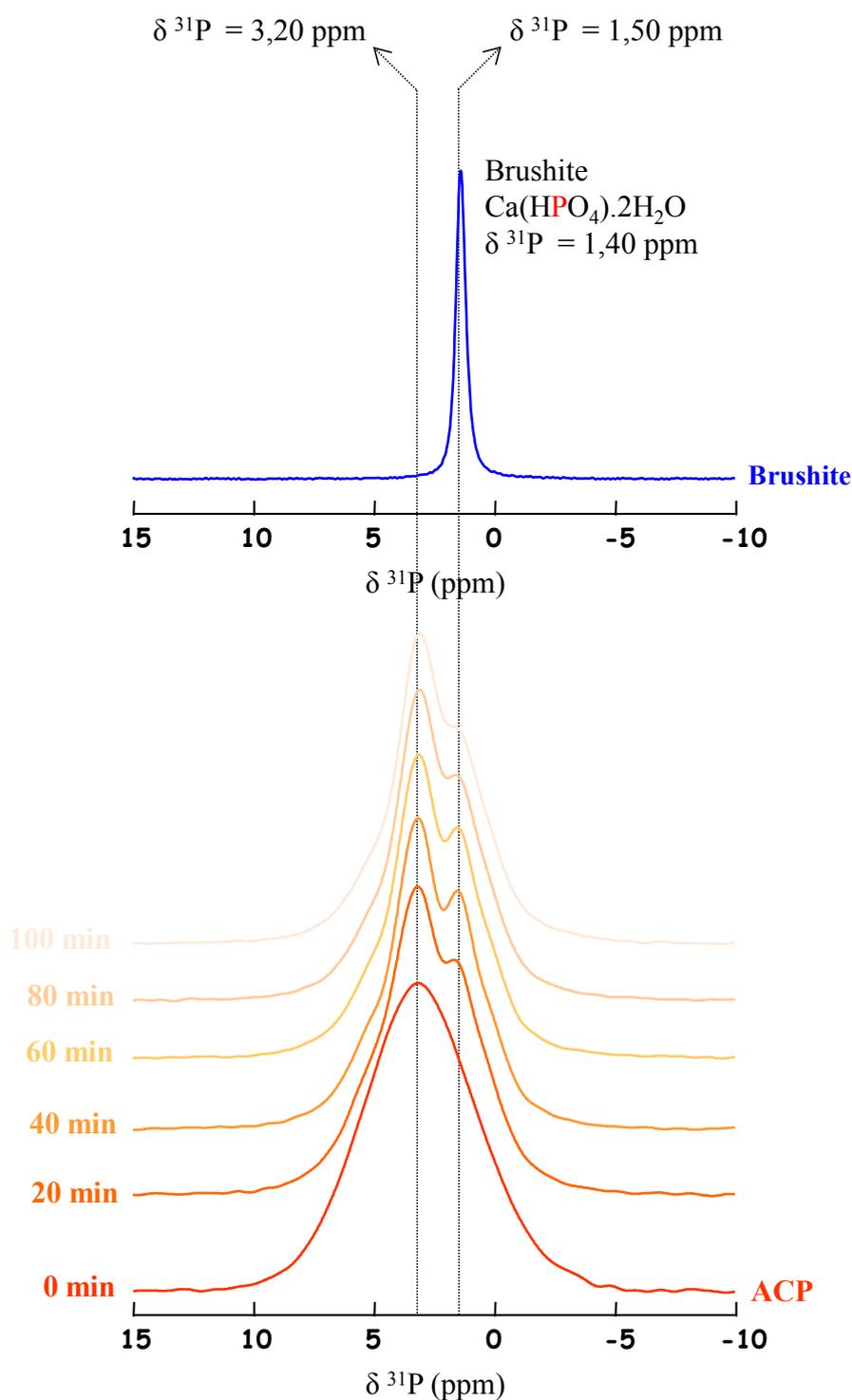


Figure 65. Suivi *in situ* par RMN CP MAS ^{31}P ($\nu_{\text{rot}} = 8 \text{ kHz}$, $t_{\text{CP}} = 2 \text{ ms}$) de la transformation de l'ACP après adition de $10 \mu\text{L}$ d'eau osmosée ($\text{pH} \sim 5,5$). Le spectre CP MAS ^{31}P de la **brushite** est rappelé en haut de la figure à titre de comparaison ($\nu_{\text{rot}} = 14\text{kHz}$, $t_{\text{CP}} = 2 \text{ ms}$). Il semble qu'une partie des grains d'ACP se transforme rapidement en **brushite**, avant de cristalliser progressivement en **apatite**. $B_0 = 7,05 \text{ Tesla}$

Par ailleurs, un même échantillon de **CHA** fut hydraté artificiellement, séché à température ambiante, puis hydraté à nouveau. Suite à ces traitements, ce dernier fut une nouvelle fois capable de fortement adsorber des molécules d'eau à sa surface (vérifié par l'acquisition d'un spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P). Un tel résultat sous-entend que les phénomènes d'hydratation/déshydratation du domaine non-apatitique pourraient être réversibles, le tout sans modifier drastiquement sa structure chimique. D'un autre côté, Nicolas Vandecandelaere, Christian Rey et Christophe Drouet, proposent qu'une déshydratation par lyophilisation pourrait partiellement dénaturer et diminuer l'épaisseur du domaine non-apatitique d'une apatite de synthèse [16] (cf. **Figure 66**).

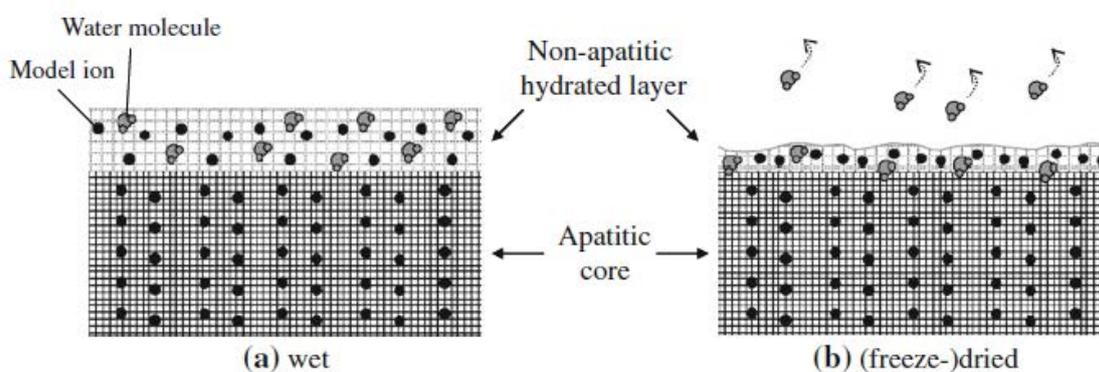


Figure 66. Représentation de la dénaturation partielle que pourrait subir le domaine non-apatitique de surface d'une apatite de synthèse lors de sa déshydratation par lyophilisation. Image reproduite d'après Christophe Drouet et al. [16]

Tout ceci suggère finalement que la stabilité du domaine non-apatitique du minéral osseux pourrait être liée au domaine apatitique sur lequel il est « supporté ». Aucun indice ne permet cependant de confirmer une telle hypothèse au jour d'aujourd'hui.

III-2/ Etude de la composition chimique du domaine non-apatitique

La composition chimique du domaine non-apatitique du minéral osseux est largement méconnue. Pour rappel, l'apatite osseuse précipite à partir du liquide interstitiel du tissu osseux, lequel est un fluide extracellulaire riche en espèces ioniques provenant du plasma sanguin : Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} ... Ces espèces sont ainsi toutes susceptibles de se retrouver incorporées au sein du domaine non-apatitique, et être à l'origine de certaines de ses propriétés physico-chimiques. Lors de notre étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des ions orthophosphates et hydrogénophosphates (PO_4^{3-} vs HPO_4^{2-}), carbonates et calcium. L'étude des ions phosphates à la surface du minéral osseux a été menée directement à partir d'un échantillon d'os « intact ». Quant à la caractérisation des ions carbonates et calcium, elle a été réalisée sur des apatites biomimétiques, respectivement enrichies en ^{13}C et ^{43}Ca lors de leurs synthèses.

III-2-1) Etude des ions HPO_4^{2-}

Il est connu que des ions HPO_4^{2-} sont présents au sein du minéral osseux, dont la quantité s'avère être moins importante au sein d'un os mature qu'au sein d'un os néoformé [17]. Une même diminution progressive de la proportion en ions HPO_4^{2-} est observée lors de la maturation artificielle en solution d'une apatite de synthèse [16], [18] (*cf.* **Figure 25-A**). La présence de ces ions HPO_4^{2-} au sein du minéral osseux fut originellement mise en évidence à partir de résultats d'analyse chimique [17], alors que dans le cas d'apatites de synthèse, c'est généralement la spectroscopie infrarouge qui est employée [2], [19]. Nous avons discuté lors du **chapitre II** comment la RMN a également apporté sa pierre à l'édifice, en permettant leur détection au sein du minéral osseux ainsi qu'au sein d'apatites biomimétiques à travers l'expérience HetCor ^1H - ^{31}P et la mise en évidence du signal ^1H qui leur est attribué [20]–[22] (*cf.* **Figures 37, 40 & 52**).

Ce n'est pas tout : des analyses de la dynamique de transfert CP $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ réalisées suite à la variation du temps de contact pour des échantillons d'os [1], [22]–[24], ou bien d'apatite synthétique [3], ont permis de mettre en évidence deux dynamiques ^{31}P distinctes : (i) une lente attribuée à des espèces PO_4^{3-} ; et (ii) une plus rapide attribuée à des espèces HPO_4^{2-} et/ou à des espèces PO_4^{3-} proches de molécules d'eau. Enfin, l'expérience d'échange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ que nous avons réalisée a mis en évidence la présence de protons acides accessibles

et échangeables en surface du minéral osseux (*cf.* **Figure 43**), résultat en accord avec la présence d'espèces de type HPO_4^{2-} .

Tous ces résultats sont autant d'indices qui confirment la présence d'ions HPO_4^{2-} au sein du minéral osseux, mais il est difficile de déterminer quelle proportion se trouve au sein du domaine non-apatitique. Ceci ne peut pas être réalisé à partir d'une simple analyse chimique car tous les ions HPO_4^{2-} seront quantifiés sans distinction de leur origine. Par spectroscopie infrarouge, une décomposition minutieuse du mode ν_4 des orthophosphates a permis de proposer l'existence d'une bande d'absorption propre aux ions HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique [2], [18], mais rien ne permet de les relier au domaine apatitique.

La mise en évidence des ions HPO_4^{2-} *via* l'expérience HetCor ^1H - ^{31}P ou l'expérience de Double CP ^1H - ^{31}P - ^1H n'est réalisée que suite à la comparaison avec des phosphates de calcium de référence. En effet, des résonances déblindées similaires sont également observées pour l'OCP ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), pour la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ainsi que pour la monétite (CaHPO_4). Elles sont alors attribuées à des protons acides provenant d'espèces HPO_4^{2-} [21]–[23], [25]–[28]; lesquels ont un déplacement chimique de $\delta(^1\text{H}) \sim 12$ ppm pour l'OCP, de $\delta(^1\text{H}) \sim 10,4$ ppm pour la brushite, et de $\delta(^1\text{H}) \sim 13,6$ et $16,2$ ppm pour la monétite (*cf.* **Figure 67**). Ainsi, sur cette seule considération de déplacement chimique, il a été proposé que le domaine non-apatitique du minéral osseux ou d'apatites biomimétiques soit riche en espèces HPO_4^{2-} . De la même manière, la comparaison avec des phosphates de calcium de référence a permis d'attribuer le signal observé à $\delta(^1\text{H}) \sim 5,5$ ppm à des molécules d'eau résiduelles (*cf.* **Figure 67**).

Quant aux expériences RMN basées sur la dynamique de transfert CP $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$, elles n'ont pas permis jusqu'à présent une différenciation précise entre des ions HPO_4^{2-} et des ions PO_4^{3-} proches de molécules d'eau.

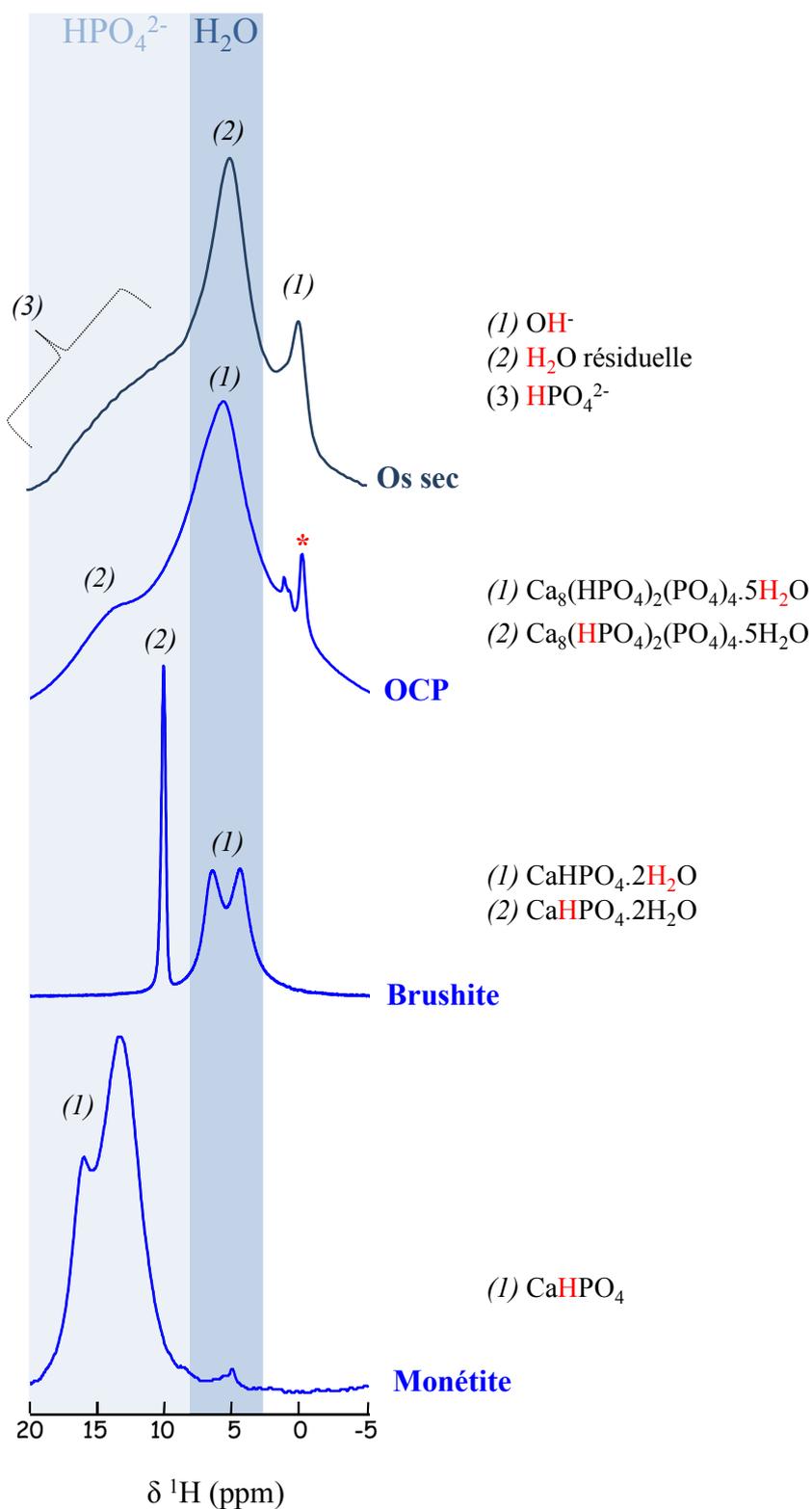


Figure 67. Spectre Double CP ^1H - ^{31}P - ^1H de l'os sec ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz, $t_{\text{CP1}} = t_{\text{CP2}} = 1$ ms) et spectres RMN MAS ^1H simple impulsion de l'OCP ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz; $B_0 = 7,05$ T), de la brushite ($\nu_{\text{rot}} = 60$ kHz; $B_0 = 16,45$ T), et de la monéite ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz; $B_0 = 7,05$ T). La faible résonance à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm observable au sein du spectre de l'OCP (*) correspond à des ions OH^- provenant d'une légère pollution d'apatite.

Ces raisons nous ont donc poussés à obtenir une attribution définitive et non ambiguë pour ces ions HPO_4^{2-} , et nous avons souhaité préciser leur localisation au sein du minéral osseux.

Dans cette optique, l'expérience de double CP « aller et retour » ^1H - ^{31}P - ^1H fut utilisée. Pour rappel, cette dernière s'est avérée particulièrement efficace afin d'acquérir un spectre ^1H résolu avec un bon rapport S/B du minéral osseux, et ceci directement à partir d'un échantillon d'**os sec** (cf. **Figure 63**). Cette expérience est donc un outil de choix afin d'étudier les dynamiques de transfert CP entre différents noyaux ^{31}P et ^1H adjacents au sein du minéral osseux. C'est ce que nous avons entrepris pour un échantillon d'**os sec** (cf. **Figure 69**). Mais, dans l'optique de réaliser une étude fine de la dynamique de polarisation croisée, nous avons ajusté les impulsions radio fréquences ^1H et ^{31}P sur la première bande de rotation ($n = \pm 1$) du profil de Hartmann-Hahn (cf. **Figure 68**).

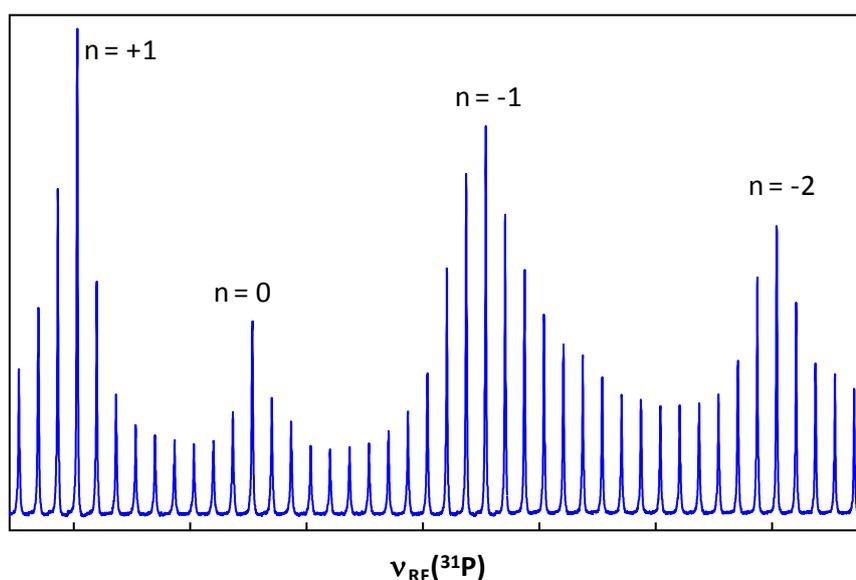


Figure 68. Profil de Hartmann-Hahn correspondant au transfert CP MAS $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$. L'impulsion radiofréquence ^{31}P varie alors que l'impulsion radiofréquence ^1H est fixe (~ 60 kHz). Les conditions optimales de transfert CP vérifient la condition suivante : $\nu_{\text{RF}}(^{31}\text{P}) = \nu_{\text{RF}}(^1\text{H}) + \nu_{\text{rot}}$ (où $\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz).

Ensuite, toujours dans l'optique d'exalter le signal provenant des espèces HPO_4^{2-} (cf. II-3-1), la valeur du premier temps de contact t_{CP1} fut fixée à 1 ms, alors que la valeur du second temps de contact t_{CP2} prenait des valeurs comprises entre 75 μs à 1000 μs , afin de permettre une édition spectrale des protons proches des ions phosphates.

Une augmentation uniforme du transfert d'aimantation correspondant respectivement aux résonances à $\delta(^1\text{H}) = 5,2$ ppm et à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, attribuée à des molécules d'eau résiduelles pour la première et à des ions OH^- au sein du domaine apatitique pour la seconde, est observée. Quant à l'évolution de la large résonance sur la gamme $\delta(^1\text{H}) = 7-18$ ppm, une augmentation uniforme du transfert d'aimantation est observée jusqu'à $t_{\text{CP}2} = 300$ μs , suivie par un comportement singulier où le transfert d'aimantation adopte un comportement oscillatoire.

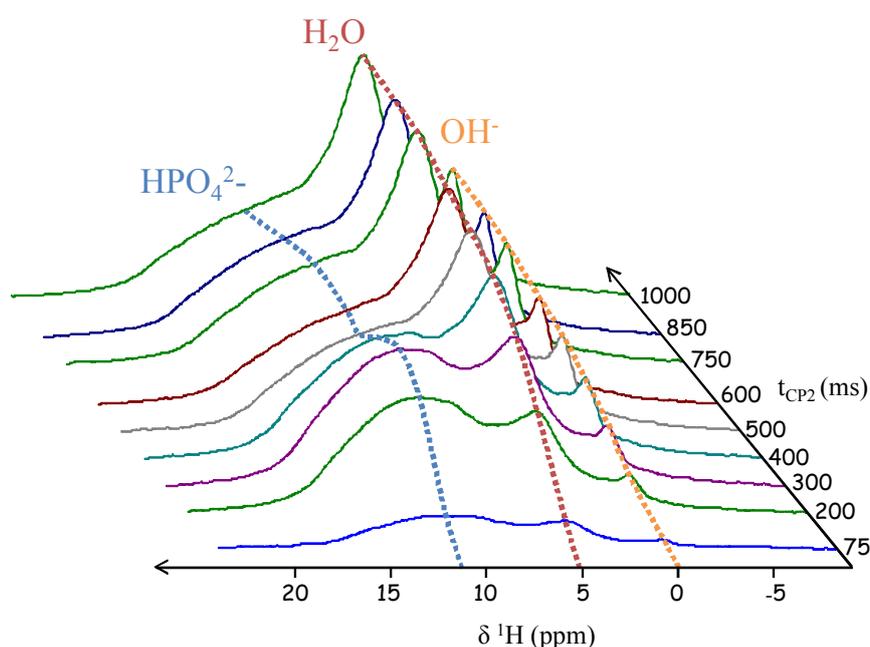


Figure 69. Dynamique de transfert CP observée grâce à l'enregistrement de spectres double CP ^1H - ^{31}P - ^1H d'os sec avec une valeur du temps de contact $t_{\text{CP}1}$ fixée à 1 ms, et celle du temps de contact $t_{\text{CP}2}$ variable (de -75 à 1000 μs). $B_0 = 7,05$ T et $\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz

Ce comportement est caractéristique de la présence d'oscillations dipolaires [29], [30], et correspond à un transfert CP cohérent entre les spins ^{31}P et ^1H . Ces oscillations dipolaires ont été modélisées le plus simplement possible à l'aide du modèle de la «paire de spin» :

$$M(t) = M_0 \cdot \exp(-t/T_{1\rho}(^1\text{H})) \cdot [(1 - 1/2 \cdot \exp(-t/T_{\text{CP}}) - 1/2 \cdot \exp(-3t/2T_{\text{CP}}) \cdot \cos(\pi D_{\text{P-H}}' \cdot t)] \quad (I)$$

où M est l'intensité du signal ; t est le temps de contact ; T_{CP} le temps de relaxation croisée ; $T_{1\rho}$ le temps de relaxation des protons dans le repère tournant ; et $D_{\text{P-H}}'$ la constante dipolaire ^1H - ^{31}P apparente. La constante dipolaire $D_{\text{P-H}}$ réelle est alors égale à $D_{\text{P-H}}' / \sqrt{2}$ [31]. La distance internucléaire entre les spins ^1H et ^{31}P est alors extraite d'après cette valeur de $D_{\text{P-H}}$:

$$D_{P-H} = (\mu_0 \cdot h \cdot \gamma_{1H} \cdot \gamma_{31P}) / (16\pi^3 \cdot d_{P-H}^3) \quad (2)$$

où d_{P-H} est la distance internucléaire au sein de la paire de spin ; γ_{1H} et γ_{31P} sont les rapports gyromagnétiques ; μ_0 est la permittivité diélectrique du vide ; et h est la constante de Planck.

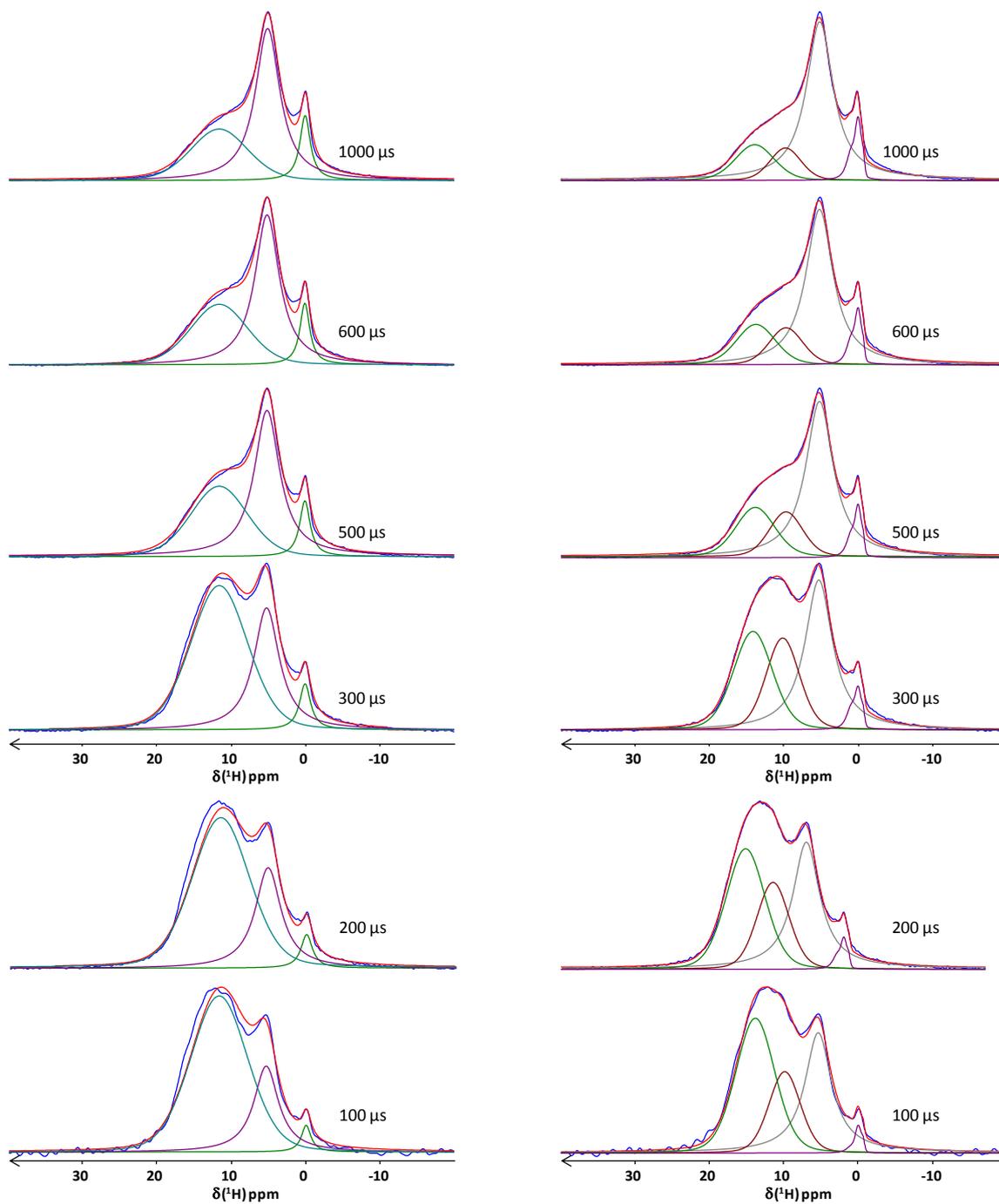


Figure 70. Spectres de double CP MAS 1H - ^{31}P - 1H extraits de la **Figure 69**, ainsi que leurs décompositions. Pour rendre compte du large signal sur la gamme $\delta(^1H) = 7$ - 18 ppm, ont été utilisés soit (i) un unique pic centré sur $\delta(^1H) = 12$ ppm (à gauche) ; soit (ii) deux pics centrés sur $\delta(^1H) = 9,8$ et $14 \pm 0,1$ ppm (à droite).

Les spectres obtenus à différents t_{CP2} (cf. **Figure 70**) furent tous décomposés afin de déterminer la variation de l'intensité des signaux 1H en fonction du temps de contact. Pour ce qui concerne le signal large sur la gamme $\delta(^1H) = 7-18$ ppm, nous nous sommes rendus compte que la décomposition était plus satisfaisante lorsque deux pics (centrés à $\delta(^1H)$ $9,8 \pm 0,1$ ppm, et $14 \pm 0,1$ ppm) étaient utilisés au lieu d'un seul (cf. **Figure 70**). Attention, nous ne prétendons pas que ce signal large ne soit composé que de deux résonances seulement, qui correspondraient à deux environnements protons distincts. Il est en effet probable qu'il soit au contraire composé d'une grande variété d'environnements conduisant à une distribution de déplacements chimiques (cf. **Figure 63**).

L'évolution de ces deux pics à $\delta(^1H) \sim 9,8$ et ~ 14 ppm a ensuite été modélisée à l'aide de l'équation (1), ce qui nous a permis d'extraire les valeurs des constantes dipolaires D_{P-H} suivantes, respectivement 4095 ± 490 Hz et 4695 ± 490 Hz (cf. **Figure 71**). Les distances $H \cdots P$ (d_{P-H}) ont ensuite été calculées. Les valeurs obtenues, respectivement $2,24 \pm 0,07$ Å, et $2,14 \pm 0,07$ Å, correspondent aux distances $H \cdots P$ attendues au sein d'espèces HPO_4^{2-} . En effet, des analyses cristallographiques par diffraction des neutrons ont permis de déterminer une distance d_{P-H} pour les ions HPO_4^{2-} de : (i) $2,19$ Å au sein de la **brushite** [32] ; et (ii) $2,08-2,25$ Å au sein de la **monétite** [33].

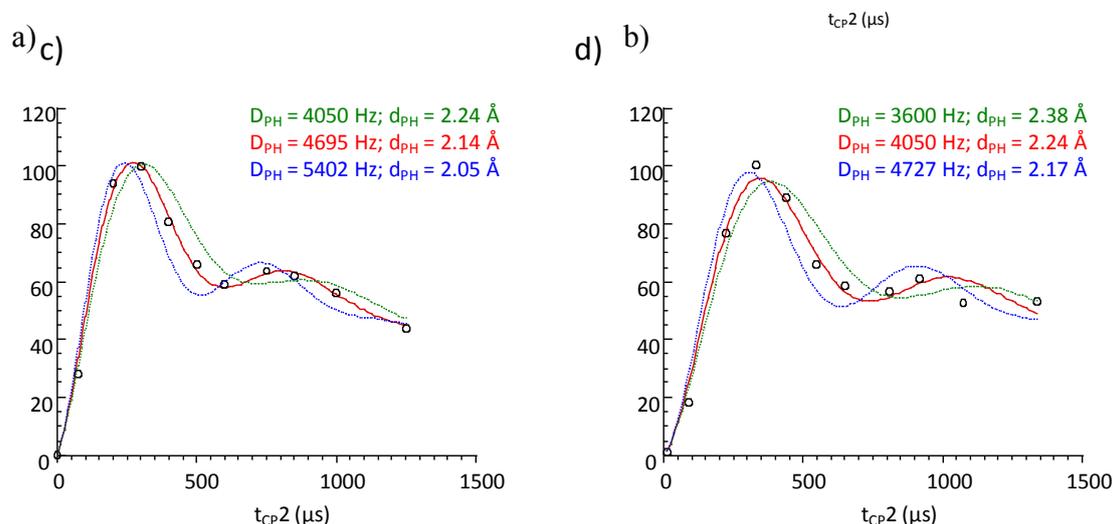


Figure 71. Simulations numériques selon l'équation (1) de l'évolution de l'aimantation : (a) du pic centré à $\delta(^1H) \sim 9,8$ ppm ; et (b) de celui centré à $\delta(^1H) \sim 14$ ppm.

Ainsi, le signal large ^1H présent sur la gamme $\delta(^1\text{H}) = 7\text{-}18$ ppm peut être attribué sans risque à des espèces HPO_4^{2-} . Par ailleurs, suite à l'expérience d'échange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ que nous avons réalisée où la totalité de ces espèces HPO_4^{2-} furent échangées (cf. **Figure 43**), il semble donc que la grande majorité de ces HPO_4^{2-} se trouvent localisés au sein du domaine non-apatitique en surface du minéral osseux. Il serait intéressant de réaliser une même expérience de dynamiques de transfert CP à partir d'un échantillon contenant des espèces dihydrogénophosphates H_2PO_4^- et de la comparer à notre expérience, afin d'étudier leur présence ou non. Cependant, leur présence semble improbable puisque des expériences d'échanges ioniques tendent à montrer que les espèces ioniques monovalentes (comme Na^+ et K^+) ne peuvent pas s'incorporer au sein du domaine non-apatitique [2]. Notons enfin que le même comportement oscillatoire a été observé pour les signaux ^1H compris entre 7 et 18 ppm pour CHA, CHA-SBF et l'échantillon d'ACP.

Il est donc possible de regrouper les différents protons qui composent le minéral osseux en 3 catégories : OH^- ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm), H_2O ($\delta(^1\text{H}) \sim 5$ ppm), et HPO_4^{2-} ($\delta(^1\text{H}) \sim$ de 7 à 18 ppm). Ces disparités importantes en termes de déplacement chimique sont imputables à leurs environnements chimiques respectifs. En effet, il est admis que la valeur du déplacement chimique d'un atome d'hydrogène augmente avec la force de la liaison H qu'il peut former avec un atome d'oxygène adjacent, $\text{OH}\cdots\text{O}$ [25], [34], comme illustré par la **Figure 72**.

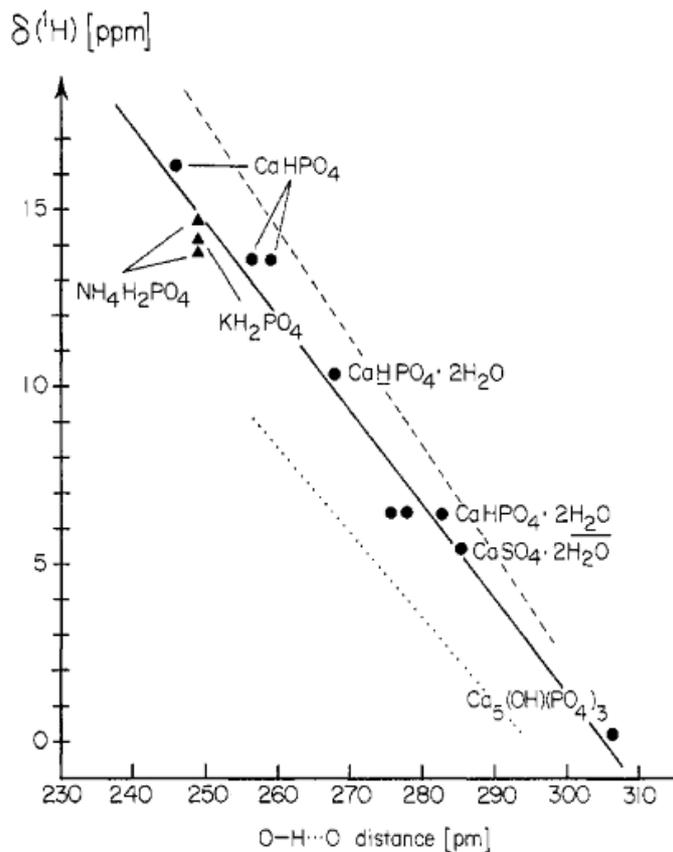


Figure 72. Corrélation entre le déplacement chimique isotrope du proton en fonction des distances $\text{OH}\cdots\text{O}$ qui existent au sein de différentes phases cristallines : l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) ; le gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ; la monétite (CaHPO_4) ; KH_2PO_4 ; et $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Cette corrélation est linéaire sur cette gamme de déplacements chimiques de 0 à 16 ppm. Image reproduite d'après James P. Yesinowski et Hellmut Eckert [25]

La signature à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm des ions OH^- localisés dans une apatite cristallisée est donc singulière. En effet, ces derniers sont alignés au sein des tunnels II (cf. I-3-2), avec une distance $\text{OH}\cdots\text{O}$ entre deux ions hydroxyles adjacents de $\sim 2,5$ Å. Cette distance importante ne permet pas la création de liaisons H fortes. Il est à noter que les espèces PO_4^{3-} les plus proches des hydroxyles sont situés à des distances encore plus importantes (~ 4 Å). Quant aux valeurs de $\delta(^1\text{H})$ élevées entre 7 et 15 ppm des HPO_4^{2-} localisés dans le domaine non-apatitique, elles indiquent la présence d'un réseau de liaisons H important au sein d'environnements chimiques distribués. Cet important réseau de liaisons H pourrait être favorisé par la présence de molécules d'eau rigides ($\delta(^1\text{H}) = 5$ ppm).

III-2-2) Etude des ions CO_3^{2-}

Il a été très récemment mis en évidence que l'incorporation des ions CO_3^{2-} au sein d'apatites de synthèse favorisait la formation d'un domaine non-apatitique [35]. Plus précisément, une proportion en domaine non-apatitique importante a été mise en évidence à partir d'une proportion massique en CO_3^{2-} supérieure à 5%. Le mécanisme de formation du domaine non-apatitique reste néanmoins à déterminer, et dans cette perspective, la détection des ions CO_3^{2-} qui y seraient incorporés est de premier intérêt.

III-2-2-a) Spectroscopie infrarouge

La technique la plus répandue pour l'étude des différents environnements chimiques des ions CO_3^{2-} du minéral osseux est la spectroscopie infrarouge [36], [37]. Ainsi, le spectre infrarouge d'un échantillon d'**os sec** est représenté sur la **Figure 73-A**. Des bandes d'absorption attribuées à de la matière organique sont logiquement observées : dues aux liaisons C-H aliphatiques vers 1900 cm^{-1} , ainsi qu'à des liaisons N-H amides vers 1600 cm^{-1} . Concernant les ions CO_3^{2-} incorporés au sein du minéral osseux, le mode de vibration ν_2 (déformation hors du plan) est observé vers 870 cm^{-1} (*cf.* étoile bleue), alors que le mode ν_3 (élongation antisymétrique) est masqué sous de nombreuses bandes d'absorption provenant de molécules organiques vers 1450 cm^{-1} (*cf.* étoile rouge). Les modes de vibrations ν_1 (élongation symétrique), et ν_3 (élongation antisymétrique) des orthophosphates du minéral sont également observés, respectivement vers 960 cm^{-1} et entre 1000 et 1200 cm^{-1} [38]. De plus, comme cela fut déjà rapporté par le passé par Christian Rey *et al.* [39], la bande correspondant à l'élongation symétrique de la liaison O-H des hydroxyles du minéral n'est pas observée (attendue à 3570 cm^{-1}).

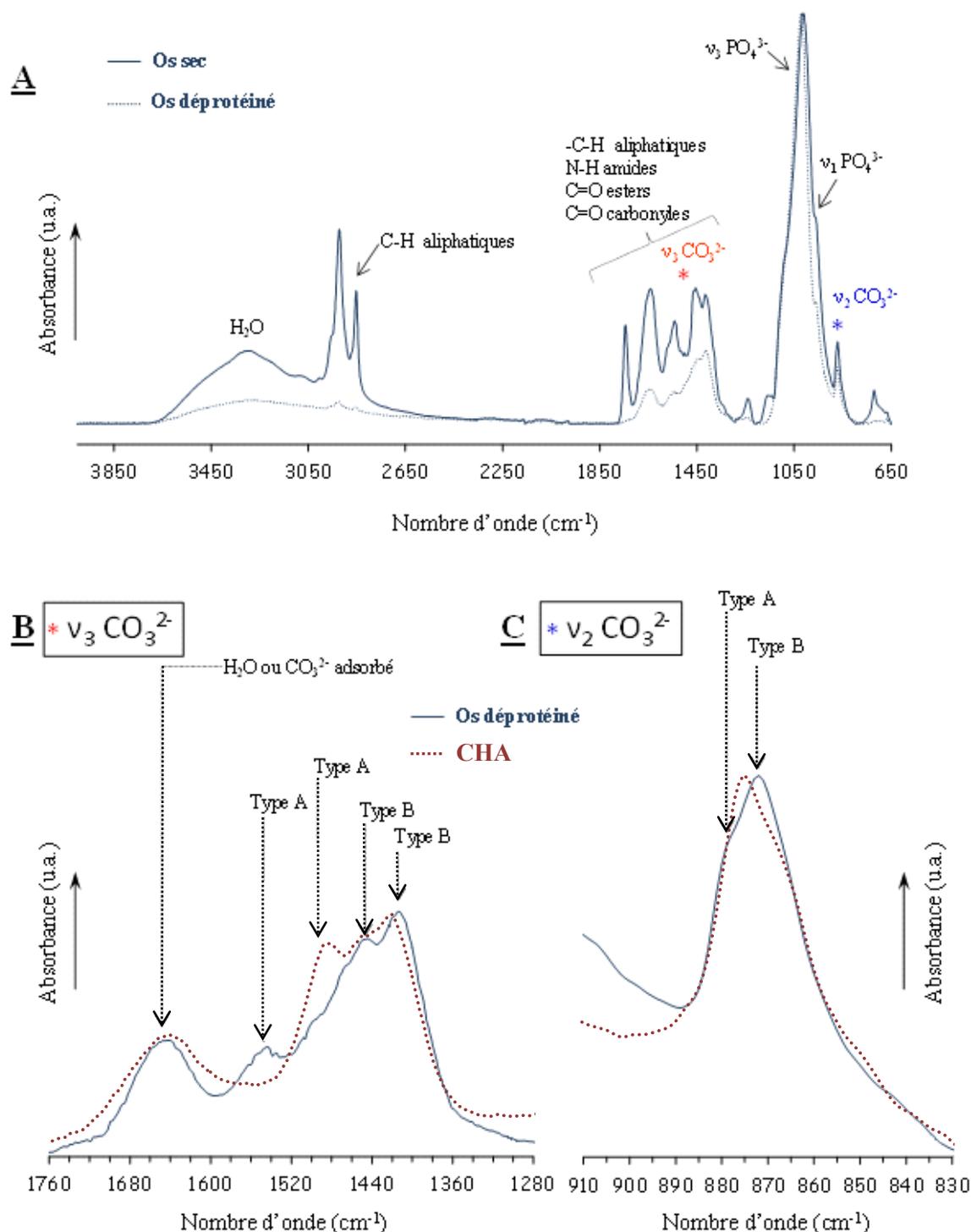


Figure 73. *A) Comparaison entre le spectre infrarouge d'un échantillon d'os sec et le spectre infrarouge du même échantillon une fois déprotéiné. B) L'agrandissement de la bande d'absorption du mode de vibration v_3 des carbonates (os déprotéiné). C) L'agrandissement de la bande d'absorption du mode de vibration v_2 des carbonates (os déprotéiné). Apparaissent également les agrandissements respectifs (non normalisés) des bandes d'absorption des modes v_3 et v_2 des carbonates de l'échantillon CHA.*

Le spectre IR du même échantillon une fois déprotéiné (par la méthode élaborée par Steve Weiner et Paul Price, *cf.* méthode n°2 de la réf. [40]) est aussi représenté sur la **Figure 73-A**. L'extraction chimique du minéral osseux rend possible l'observation du mode ν_3 des carbonates (*cf.* étoile rouge), même si de la matière organique résiduelle est encore présente. Afin d'étudier les sites d'incorporation des carbonates au sein du minéral (site A, site B...), les modes de vibrations ν_2 et ν_3 sont utilisés, dont les agrandissements sont réunis sur la **Figure 73-B**. Les allures de ces deux bandes d'absorption sont asymétriques, indiquant la présence de plusieurs environnements chimiques en CO_3^{2-} avec les principales attributions suivantes [36], [37], [41]–[45] :

- pour le mode ν_2 : les bandes des CO_3^{2-} de type B à 871 cm^{-1} , des CO_3^{2-} de type A à 878 cm^{-1} , et des CO_3^{2-} dits « labiles » à 866 cm^{-1} .
- pour le mode ν_3 : les bandes des CO_3^{2-} de type B entre 1420 et 1470 cm^{-1} et des CO_3^{2-} de type A entre 1460 et 1560 cm^{-1} . Une contribution due à des molécules organiques résiduelles n'est cependant pas à exclure ici.

Alors que les attributions des bandes dues aux ions CO_3^{2-} incorporés au sein du domaine apatitique sont relativement bien connues, celles des bandes dues aux potentiels ions CO_3^{2-} incorporés au sein du domaine non-apatitique sont rarement rapportées. Seules quelques études font écho de certains CO_3^{2-} dits « labiles » [2], [37], mais les résultats infrarouge ne permettent pas de les relier aux cristaux d'apatite.

III-2-2-b) RMN 2D ^1H - ^{13}C

La RMN, qui a permis de sonder les environnements chimiques des protons autour des sites phosphore du domaine non-apatitique, pourrait être une bonne alternative pour étudier également ceux autour des ions CO_3^{2-} . Néanmoins, du fait de la faible sensibilité vis-à-vis des noyaux ^{13}C (seul isotope stable actif en RMN avec une faible abondance naturelle, *i.e.* 1,07 %), la RMN ^{13}C est peu employée pour l'étude du minéral osseux. La présence de la matrice organique implique que le collagène soit principalement détecté [46]. Une dégradation chimique (traitement par NaOH) de la matrice organique permet néanmoins la détection des carbonates du minéral osseux [47], *via* l'apparition d'une résonance dissymétrique vers $\delta(^{13}\text{C}) \sim 169 \text{ ppm}$. Cependant, à l'image de l'infrarouge, seules les contributions des ions CO_3^{2-} en site A, B et AB du domaine apatitique sont généralement

utilisées pour attribuer le spectre ^{13}C [48]–[50]. De plus, on ne peut pas exclure une altération du domaine non-apatitique suite au traitement chimique.

Nous avons donc décidé d'étudier une apatite biomimétique enrichie en ^{13}C . Pour ce faire, la synthèse par diffusion de vapeurs d'ammoniac, permettant l'obtention de l'apatite carbonatée CHA (*cf.* **Figure 50**) fut adaptée, avec l'utilisation d'un précurseur d'ions carbonates NaHCO_3 enrichi à 100% en ^{13}C . L'échantillon obtenu de cette manière fut appelé **CHA- ^{13}C** . Le spectre IR de CHA est représenté sur la **Figure 73-B**, où l'incorporation de carbonates est avérée en raison de la présence des bandes d'absorption des modes ν_3 et ν_2 des carbonates.

Afin de détecter les ions CO_3^{2-} éventuellement incorporés au sein du domaine non-apatitique, l'expérience HetCor ^1H - ^{13}C a été utilisée. Ainsi, un spectre HetCor ^1H - ^{13}C fut tout d'abord enregistré à partir de l'échantillon CHA- ^{13}C à l'état sec (*cf.* **Figure 74**). Les ions CO_3^{2-} qui corrént avec les ions OH^- à $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm (*cf.* la tache de corrélation (*vi*)) sont ceux incorporés au sein du domaine apatitique : ils apparaissent sous la forme de trois résonances, centrées respectivement à $\delta(^{13}\text{C}) = 168,3\text{ppm}$; $169,6$ ppm ; et $170,5$ ppm. Des attributions relative à leur site cristallographique d'insertion ont été proposés [48]–[50] :

- CO_3^{2-} de type B pour les résonances centrées à $\delta(^{13}\text{C}) = 169,6$ ppm et $170,5$ ppm.
- CO_3^{2-} de type AB pour la résonance centrée à $\delta(^{13}\text{C}) \sim 168,3\text{ppm}$.

Il est ainsi à noter que **CHA- ^{13}C** est une apatite où les CO_3^{2-} de type B sont majoritaires, puisque aucune contribution provenant d'ions CO_3^{2-} de type A attendue à $\delta(^{13}\text{C}) = 166,5$ ppm n'est observée ici (pour $t_{\text{CP}} = 1\text{ms}$). Quant à la faible résonance observée à $\delta(^1\text{H}) = 1,3$ ppm sur la dimension proton (flèches rouges), elle est attribuée à des ions OH^- proches de CO_3^{2-} de type B [50].

Une seconde tâche de corrélation (*vi*), très distribuée sur la dimension proton, est également observée (*cf.* **Figure 74**). Ainsi, par analogie avec les attributions du spectre ^1H discutées précédemment, nous détectons ici des ions CO_3^{2-} qui corrént avec les espèces protonées du domaine non-apatitique : les molécules d'eau résiduelles à $\delta(^1\text{H}) \sim 5.5$ ppm ainsi que les HPO_4^{2-} sur la gamme $\delta(^1\text{H}) \sim 7-15$ ppm. Ceci est un premier indice de la présence d'ions CO_3^{2-} incorporés au sein du domaine non-apatitique de **CHA- ^{13}C** . Rappelons qu'une

expérience similaire a déjà été rapportée par le passé pour une fluoroapatite carbonatée de type-B de synthèse enrichie en ^{13}C [2].

Nous avons néanmoins poussé les investigations, afin de prouver de façon encore plus probante la présence de CO_3^{2-} dans le domaine de surface des cristaux de $\text{CHA-}^{13}\text{C}$. Dans cette optique, une expérience HetCor $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ a été réalisée à partir de l'échantillon $\text{CHA-}^{13}\text{C}$ humide (+ 10 μL d'eau osmosée directement rajoutée dans le rotor, cf. **Figure 74**). Dans ce cas, la large tache de corrélation (vi) (auparavant observée à l'état sec) disparaît au détriment d'une tache de corrélation étroite (viii) à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm sur la dimension proton. Par analogie avec les expériences HetCor $^1\text{H-}^{31}\text{P}$ réalisées sur de l'**os frais**, et sur **CHA** et **CHA-SBF** humides, ce signal intense à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm est attribué à des molécules d'eau fortement adsorbées en surface des particules. **On démontre ainsi que certains ions CO_3^{2-} se trouvent incorporés au sein du domaine non-apatitique hydrophile en surface des particules de $\text{CHA-}^{13}\text{C}$.**

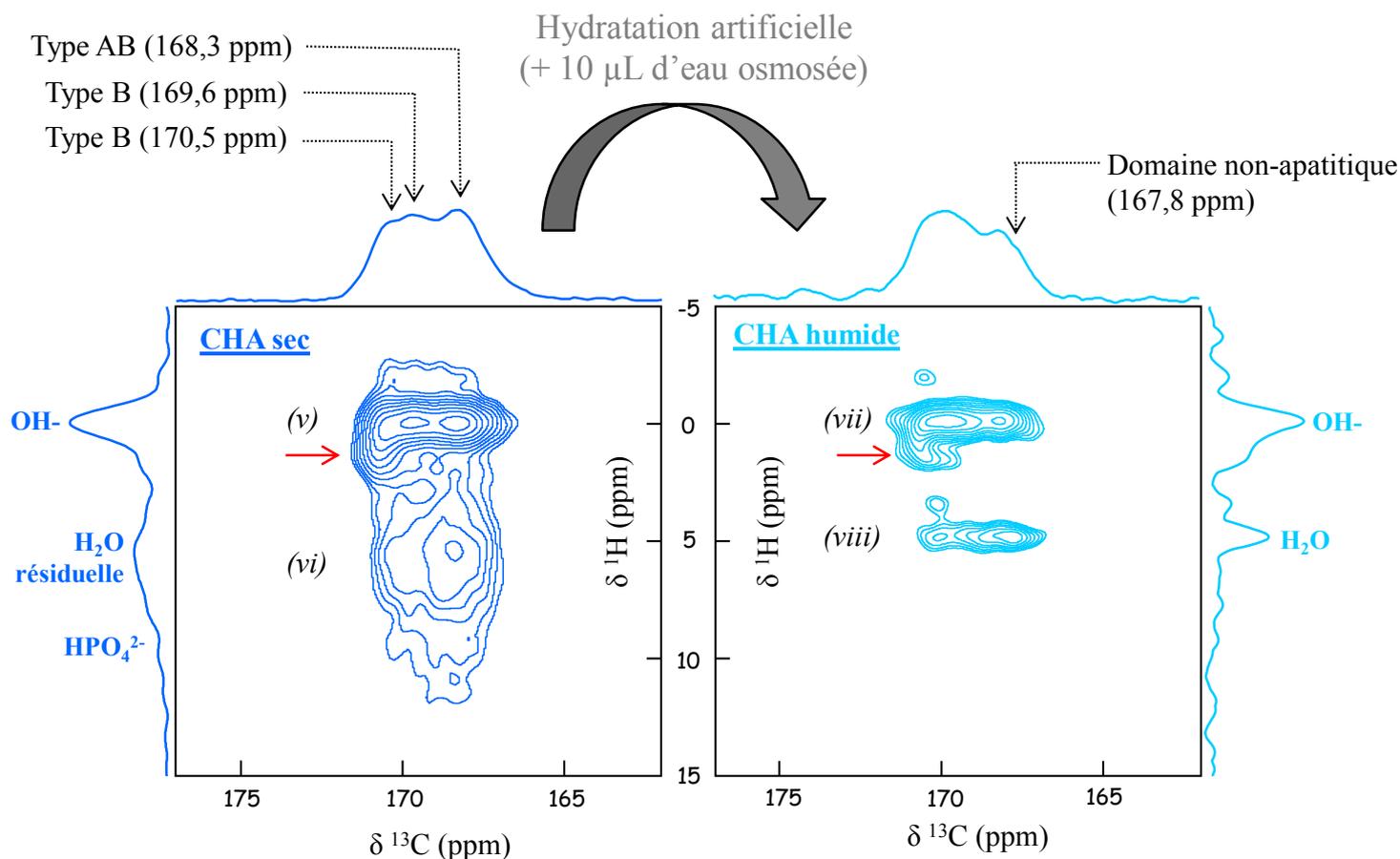


Figure 74. Comparaison entre le spectre 2D HetCor $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ d'un échantillon d'apatite biomimétique carbonatée enrichie en carbone-13 $\text{CHA-}^{13}\text{C}$ ($\nu_{\text{rot}} = 14$ kHz, $t_{\text{CP}} = 1$ ms), et celui du même échantillon une fois hydraté artificiellement suite à l'ajout de 10 μL d'eau osmosée ($\nu_{\text{rot}} = 8$ kHz, $t_{\text{CP}} = 1$ ms). $B_0 = 7,05$ Tesla

Les spectres ^{13}C reconstruits correspondant au domaine apatitique et au domaine non-apatitique de $\text{CHA-}^{13}\text{C}$ ont été obtenus respectivement à partir des taches de corrélation (vii) et (viii) (cf. **Figure 75**). On constate que les ions carbonates présents dans le domaine non-apatitique semblent avoir un déplacement chimique ^{13}C qui s'étend de 167 à 171 ppm avec un maximum autour de $\sim 167,8$ ppm, ce qui les distingue des carbonates du domaine apatitique qui eux s'étendent de 168 à 172 ppm.

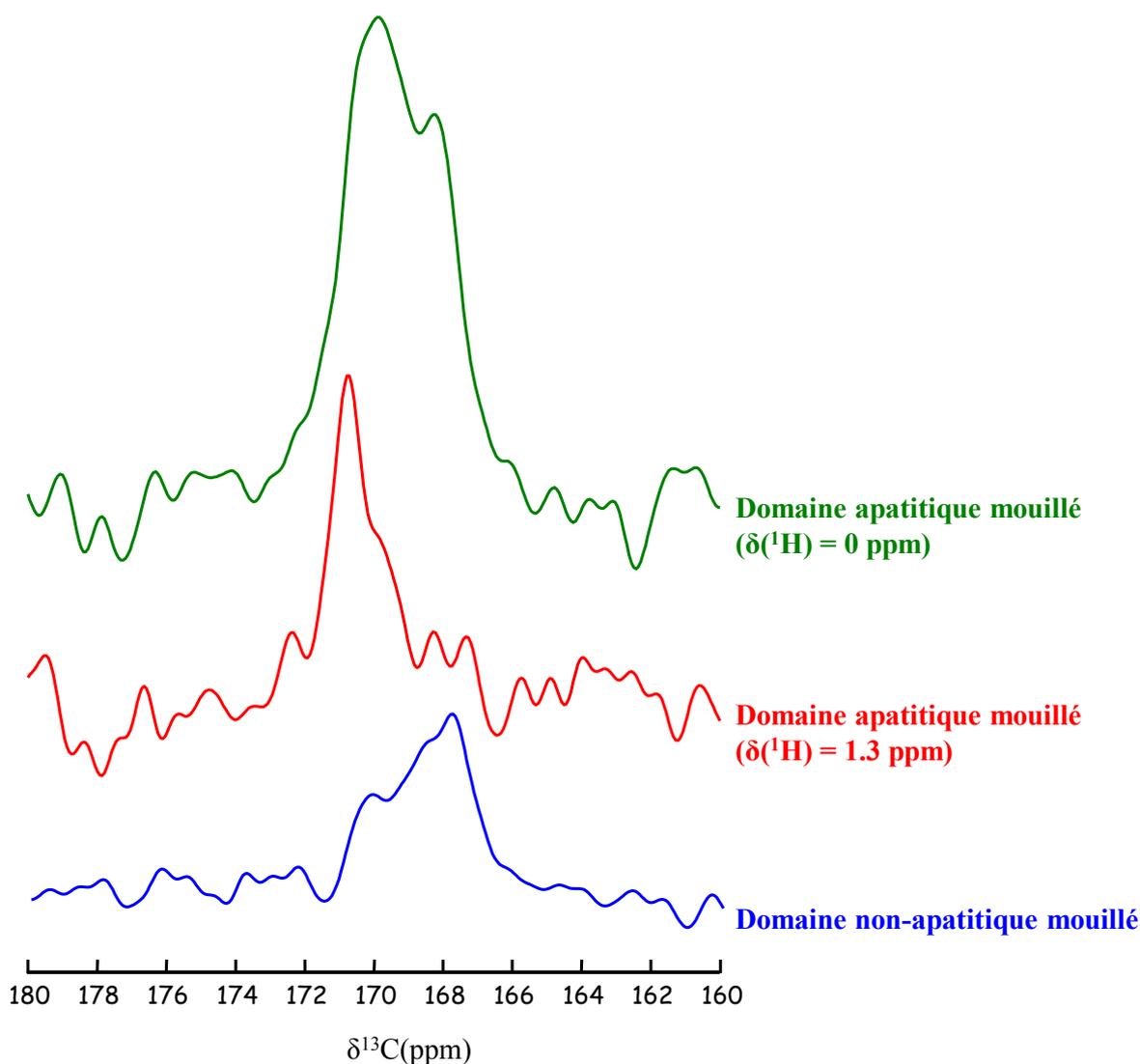


Figure 75. Comparaison entre les spectres ^{13}C reconstruits correspondant au domaine apatitique de $\text{CHA-}^{13}\text{C}$ ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm et $\delta(^1\text{H}) = 1.3$ ppm) et au domaine non-apatitique ($\delta(^1\text{H}) = 4,9$ ppm), provenant de la carte 2D HetCor de la **Figure 74**.

Il est très difficile de remonter aux proportions respectives en ions carbonates au sein des domaines apatitique et non apatitique de $\text{CHA-}^{13}\text{C}$. En effet, pour cela il faudrait décomposer avec une bonne précision le spectre ^{13}C quantitatif correspondant, or nous

n'avons pas obtenu de résultat satisfaisant jusqu'à présent. Néanmoins, nous constatons que la proportion d'ions carbonates présents dans le domaine non-apatitique n'est pas négligeable devant celle correspondant au domaine apatitique.

Il est délicat d'en tirer des conclusions similaires pour le minéral osseux. Néanmoins, les nombreuses similitudes entre le minéral osseux et **CHA** pourrait suggérer également une présence importante de carbonates dans le domaine non-apatitique du minéral osseux.

III-2-3) Etude des ions Ca^{2+}

Nous avons poursuivi l'étude de la composition chimique du domaine de surface de **CHA** par l'étude par RMN du noyau ^{43}Ca qui est l'isotope actif en RMN du calcium. Sa faible abondance naturelle nous a conduits à synthétiser un échantillon de **CHA** enrichi à 60% en ^{43}Ca nommé **CHA- ^{43}Ca** (voir la section « Matériels et méthodes » pour le protocole de synthèse détaillé). Deux résonances sont détectées sur le spectre RMN MAS ^{43}Ca (cf. **Figure 76**) qui correspondent aux deux sites cristallographiques du calcium présent dans la structure apatitique (cf. **Figure 11**) [51], ce qui atteste de la réussite de l'enrichissement sélectif de **CHA** en ^{43}Ca .

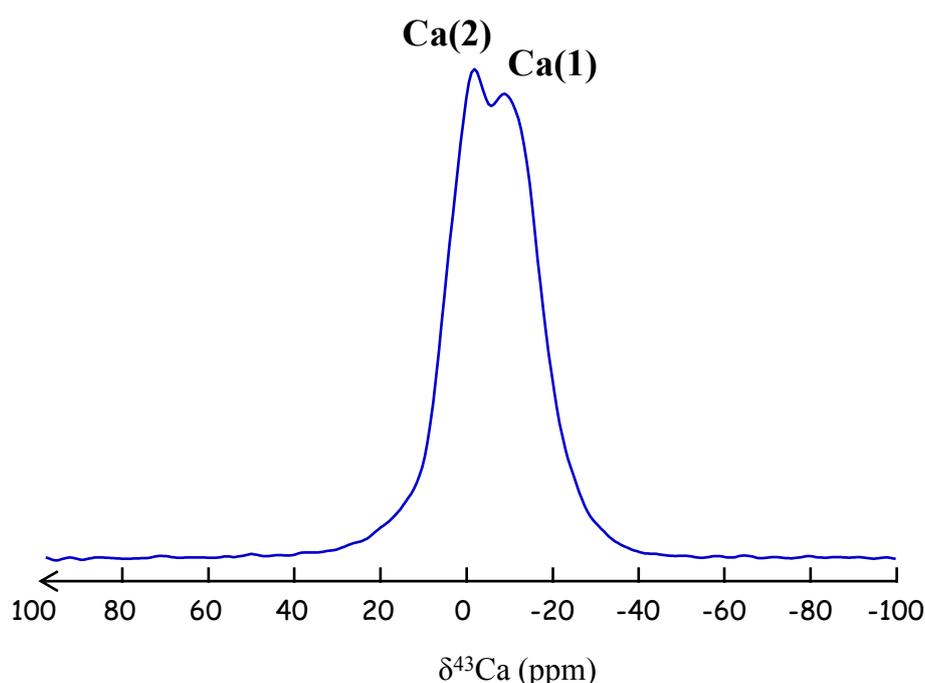


Figure 76. Spectre RMN MAS du ^{43}Ca de **CHA- ^{43}Ca** . $B_0 = 16,45 \text{ T}$ et $\nu_{\text{rot}} = 22 \text{ kHz}$

Afin d'étudier les proximités spatiales entre les noyaux ^1H et ^{43}Ca , nous nous sommes tournés vers l'expérience TRAPDOR. Cette expérience, qui utilise l'interaction dipolaire ^1H - ^{43}Ca , conduit au déphasage des résonances ^1H proches spatialement des sites ^{43}Ca . La **Figure 77** présente le spectre ^1H de **CHA- ^{43}Ca** à l'état sec avec et sans irradiation ^{43}Ca ainsi que le spectre différence. Ce dernier prouve que les signaux ^1H déphasés durant l'irradiation correspondent aux ions OH^- ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm) et à des molécules d'eau résiduelle ($\delta(^1\text{H}) = 5,2$ ppm). **La présence d'ion Ca^{2+} à proximité de ces molécules d'eau résiduelle du domaine non-apatitique est donc avérée.** Il est à noter que les résonances ^1H caractéristiques des ions HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique ($\delta(^1\text{H}) = 7 - 18$ ppm) ne sont pas détectées à cause de leur faible intensité combinée à un temps de relaxation $T_2(^1\text{H})$ trop court. En effet, le temps d'écho pour cette expérience correspond à 10 périodes de rotor soit 0,45 ms. Il est intéressant de noter que les résonances fines entre 2 et 4 ppm qui correspondent à des impuretés ne sont pas soumises à un effet TRAPDOR et qu'elles ne sont donc pas couplées au ^{43}Ca .

La présence d'ions Ca^{2+} au sein du domaine non-apatitique de **CHA- ^{43}Ca** n'est pas une surprise en soit puisque leur présence était attendue pour des raisons d'électroneutralité. Précédemment, des études XANES (« X-ray Absorption Near Edge Structure ») au seuil-K du Ca avait déjà montré qu'il existait des environnements spécifiques pour les ions Ca^{2+} dans des apatites nanocristallines qui n'étaient pas retrouvés dans des apatites stœchiométriques [52].

De la même manière que pour la présence des ions CO_3^{2-} , il est difficile de conclure définitivement sur la présence d'ions Ca^{2+} en surface du minéral osseux. Néanmoins, pour des raisons d'électroneutralité nous pouvons fortement les suspecter.

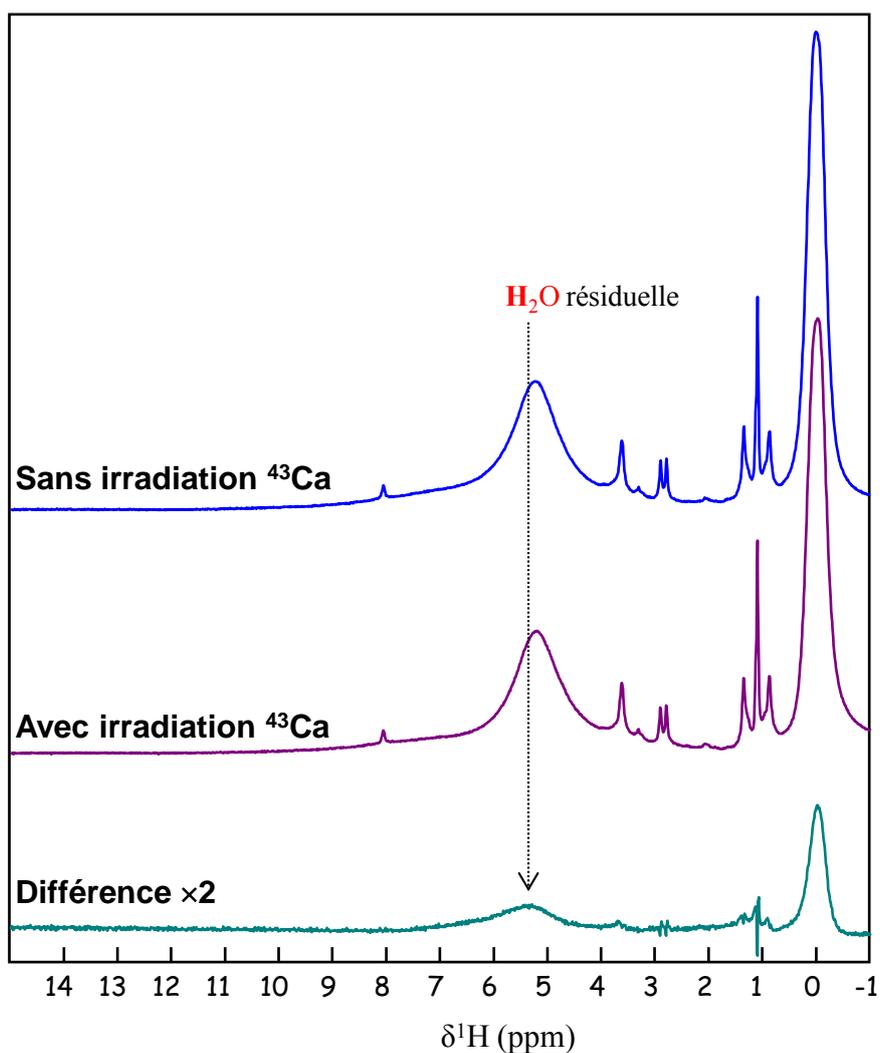


Figure 77. Expérience TRAPDOR $^1\text{H-}^{43}\text{Ca}$ pour $\text{CHA-}^{43}\text{Ca}$: comparaison entre les spectres ^1H sans et avec irradiation ^{43}Ca . Le spectre « différence » est aussi indiqué. L'expérience a été enregistrée sur un spectromètre Avance 700, $\nu_{\text{rot}} = 22$ kHz, une radiofréquence ^{43}Ca de 25 kHz a été appliquée pendant 10 périodes de rotor soit 0,45 ms.

III-3 / Conclusion

Les résultats exposés au sein de ce chapitre nous ont permis de montrer que le domaine non-apatitique du minéral osseux est très désordonné et possède des réponses spectroscopiques proche de celles d'un phosphate de calcium amorphe. De plus, nous avons montré que ce domaine est riche en espèces HPO_4^{2-} au contraire du domaine apatitique. Enfin, l'analyse d'apatites biomimétiques spécifiquement enrichies en ^{13}C et ^{43}Ca a permis de montrer que les ions CO_3^{2-} et Ca^{2+} sont présents dans leur domaine non-apatitique.

Si nous étendons ces résultats au minéral osseux, il semble donc que son **domaine de surface corresponde à un phosphate de calcium amorphe de type ACP fortement hydraté et principalement formé d'ions divalents : Ca^{2+} , CO_3^{2-} et HPO_4^{2-}** . En rassemblant les résultats issus des **chapitres II & III**, il est alors possible de proposer une représentation schématique de l'organisation d'un cristal d'une apatite osseuse (cf. **Figure 78**). Celle-ci fût réalisée à l'échelle, puisque nous avons tenu compte du fait qu'environ 45 % des phosphore se trouvent en surface du cristal au sein du domaine non-apatitique.

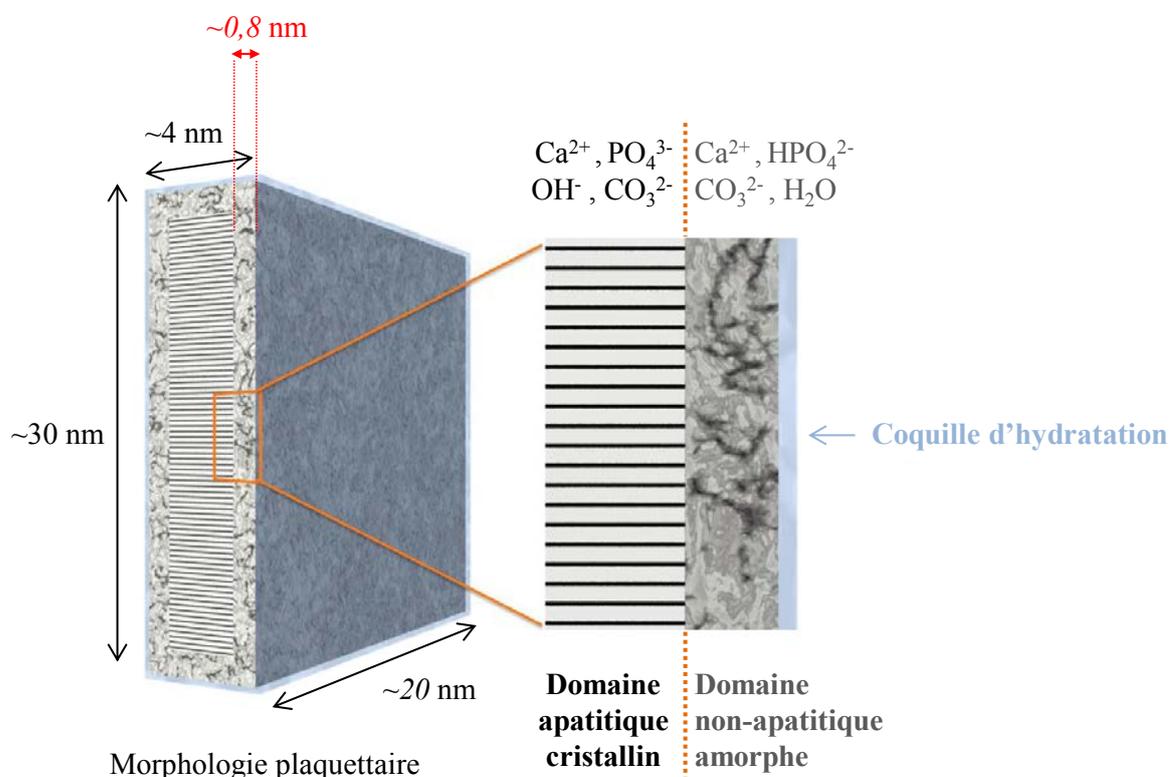


Figure 78 : Représentation schématique d'une plaquette d'apatite osseuse.

Références bibliographiques

- [1] Y. Wu, J. L. Ackerman, H.-M. Kim, C. Rey, A. Barroug, et M. J. Glimcher, « Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel, and synthetic hydroxyapatites », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 17, n° 3, p. 472-480, mars 2002.
- [2] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, et A. Barroug, « Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, n° 2, p. 198-205, 2007.
- [3] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, et M. Epple, « A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite », *Magn. Reson. Chem.*, vol. 44, n° 6, p. 573-580, mai 2006.
- [4] C. Drouet, « Apatite Formation: Why It May Not Work as Planned, and How to Conclusively Identify Apatite Compounds », *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 1-12, 2013.
- [5] E. Davies, K. H. Muller, W. C. Wong, C. J. Pickard, D. G. Reid, J. N. Skepper, et M. J. Duer, « Citrate bridges between mineral platelets in bone », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 14, p. E1354-E1363, avr. 2014.
- [6] S.-J. Huang, Y.-L. Tsai, Y.-L. Lee, C.-P. Lin, et J. C. C. Chan, « Structural Model of Rat Dentin Revisited », *Chem. Mater.*, vol. 21, n° 13, p. 2583-2585, juill. 2009.
- [7] J. C. Heughebaert, « Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques », INP, Toulouse, 1977.
- [8] F. Betts et A. S. Posner, « An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate », *Mater. Res. Bull.*, vol. 9, n° 3, p. 353-360, mars 1974.
- [9] A. S. Posner et F. Betts, « Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure », *Acc. Chem. Res.*, vol. 8, n° 8, p. 273-281, août 1975.
- [10] C. Combes et C. Rey, « Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials », *Acta Biomater.*, vol. 6, n° 9, p. 3362-3378, sept. 2010.
- [11] J. D. Termine et E. D. Eanes, « Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations », *Calcif. Tissue Res.*, vol. 10, n° 1, p. 171-197, 1972.
- [12] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, et M. J. Glimcher, « Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo », *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 22, n° 4, p. 310-317, 2004.
- [13] A. Tofghi, S. Mounic, P. Chakravarthy, C. Rey, et D. Lee, « Setting Reactions Involved in Injectable Cements Based on Amorphous Calcium Phosphate », *Key Eng. Mater.*, vol. 192-195, p. 769-772, 2001.
- [14] Y. Politi, D. R. Batchelor, P. Zaslansky, B. F. Chmelka, J. C. Weaver, I. Sagi, S. Weiner, et L. Addadi, « Role of Magnesium Ion in the Stabilization of Biogenic Amorphous Calcium Carbonate: A Structure-Function Investigation », *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 1, p. 161-166, janv. 2010.
- [15] A. L. Boskey et A. S. Posner, « Magnesium stabilization of amorphous calcium phosphate: A kinetic study », *Mater. Res. Bull.*, vol. 9, n° 7, p. 907-916, juill. 1974.
- [16] N. Vandecandelaere, C. Rey, et C. Drouet, « Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, n° 11, p. 2593-2606, nov. 2012.

- [17] R. Legros, N. Balmain, et G. Bonel, « Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 41, n° 3, p. 137–144, 1987.
- [18] D. Farlay, G. Panczer, C. Rey, P. D. Delmas, et G. Boivin, « Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral », *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 28, n° 4, p. 433–445, juill. 2010.
- [19] S. Ouizat, A. Barroug, A. Legrouri, et C. Rey, « Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation », *Mater. Res. Bull.*, vol. 34, n° 14–15, p. 2279–2289, nov. 1999.
- [20] G. Cho, « Detection of Hydroxyl Ions in Bone Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy », *Science*, vol. 300, n° 5622, p. 1123–1127, mai 2003.
- [21] R. A. Santos, R. A. Wind, et C. E. Bronnimann, « ^1H CRAMPS and ^1H - ^{31}P HetCor Experiments on Bone, Bone Mineral, and Model Calcium Phosphate Phases », *J. Magn. Reson. B*, vol. 105, n° 2, p. 183–187, oct. 1994.
- [22] A. Kaflak-Hachulska, A. Samoson, et W. Kolodziejski, « ^1H MAS and ^1H ? ^{31}P CP/MAS NMR Study of Human Bone Mineral », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 73, n° 5, p. 476–486, oct. 2003.
- [23] Y. Wu, M. J. Glimcher, C. Rey, et J. L. Ackerman, « A unique protonated phosphate group in bone mineral not present in synthetic calcium phosphates. Identification by phosphorus-31 solid state NMR spectroscopy », *J. Mol. Biol.*, vol. 244, n° 4, p. 423–435, déc. 1994.
- [24] A. J. Taylor, E. Rendina, B. J. Smith, et D. H. Zhou, « Analyses of mineral specific surface area and hydroxyl substitution for intact bone », *Chem. Phys. Lett.*, vol. 588, p. 124–130, nov. 2013.
- [25] J. P. Yesinowski et H. Eckert, « Hydrogen environments in calcium phosphates: proton MAS NMR at high spinning speeds », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, n° 21, p. 6274–6282, oct. 1987.
- [26] Y.-H. Tseng, J. Zhan, K. S. K. Lin, C.-Y. Mou, et J. C. C. Chan, « High resolution ^{31}P NMR study of octacalcium phosphate », *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, vol. 26, n° 2, p. 99–104, sept. 2004.
- [27] E. Davies, M. J. Duer, S. E. Ashbrook, et J. M. Griffin, « Applications of NMR Crystallography to Problems in Biomineralization: Refinement of the Crystal Structure and ^{31}P Solid-State NMR Spectral Assignment of Octacalcium Phosphate », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 30, p. 12508–12515, août 2012.
- [28] A. W. Graham, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, vol. Academic Press, Volume 73 vol. 2011.
- [29] L. Müller, A. Kumar, T. Baumann, et R. Ernst, « Transient Oscillations in NMR Cross-Polarization Experiments in Solids », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 32, n° 25, p. 1402–1406, juin 1974.
- [30] R. Hester, J. Ackerman, V. Cross, et J. Waugh, « Resolved Dipolar Coupling Spectra of Dilute Nuclear Spins in Solids », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 34, n° 16, p. 993–995, avr. 1975.
- [31] P. Bertani, J. Raya, P. Reinheimer, R. Gougeon, L. Delmotte, et J. Hirschinger, « distance determination in fluoride-containing octadecasil by Hartmann–Hahn cross-polarization under fast magic-angle spinning », *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, vol. 13, n° 4, p. 219–229, mai 1999.
- [32] N. A. Curry et D. W. Jones, « Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate: a neutron-diffraction investigation », *J. Chem. Soc. Inorg. Phys. Theor.*, p. 3725, 1971.

- [33] M. Catti, G. Ferraris, et S. A. Mason, « Low-temperature ordering of hydrogen atoms in CaHPO₄ (monetite): X-ray and neutron diffraction study at 145 K », *Acta Crystallogr. B*, vol. 36, n° 2, p. 254-259, févr. 1980.
- [34] F. Pourpoint, C. Gervais, L. Bonhomme-Coury, T. Azaïs, C. Coelho, F. Mauri, B. Alonso, F. Babonneau, et C. Bonhomme, « Calcium Phosphates and Hydroxyapatite: Solid-State NMR Experiments and First-Principles Calculations », *Appl. Magn. Reson.*, vol. 32, n° 4, p. 435-457, déc. 2007.
- [35] Y. Wang, S. Von Euw, G. Laurent, C. Crevant, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, N. Nassif, et T. Azaïs, « Impact of collagen confinement vs. ionic substitutions on the local disorder in bone and biomimetic apatites », *Mater. Horiz.*, vol. 1, n° 2, p. 224, 2014.
- [36] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I. R. Dickson, et M. J. Glimcher, « The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 45, n° 3, p. 157-164, mai 1989.
- [37] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, et M. J. Glimcher, « Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 49, n° 4, p. 251-258, oct. 1991.
- [38] E. Balan, S. Delattre, D. Roche, L. Segalen, G. Morin, M. Guillaumet, M. Blanchard, M. Lazzeri, C. Brouder, et E. K. H. Salje, « Line-broadening effects in the powder infrared spectrum of apatite », *Phys. Chem. Miner.*, vol. 38, n° 2, p. 111-122, févr. 2011.
- [39] C. Rey, J. L. Miquel, L. Facchini, A. P. Legrand, et M. J. Glimcher, « Hydroxyl groups in bone mineral », *Bone*, vol. 16, n° 5, p. 583-586, mai 1995.
- [40] S. Weiner et P. A. Price, « Disaggregation of bone into crystals », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 39, n° 6, p. 365-375, 1986.
- [41] M. C. Chang et J. Tanaka, « FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde », *Biomaterials*, vol. 23, n° 24, p. 4811-4818, déc. 2002.
- [42] A. Antonakos, E. Liarokapis, et T. Leventouri, « Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites », *Biomaterials*, vol. 28, n° 19, p. 3043-3054, juill. 2007.
- [43] M. E. Fleet et X. Liu, « Type A–B carbonate chlorapatite synthesized at high pressure », *J. Solid State Chem.*, vol. 181, n° 9, p. 2494-2500, sept. 2008.
- [44] M. E. Fleet et X. Liu, « Location of type B carbonate ion in type A–B carbonate apatite synthesized at high pressure », *J. Solid State Chem.*, vol. 177, n° 9, p. 3174-3182, sept. 2004.
- [45] M. E. Fleet, « Infrared spectra of carbonate apatites: ν_2 -Region bands », *Biomaterials*, vol. 30, n° 8, p. 1473-1481, mars 2009.
- [46] P. Zhu, J. Xu, N. Sahar, M. D. Morris, D. H. Kohn, et A. Ramamoorthy, « Time-Resolved Dehydration-Induced Structural Changes in an Intact Bovine Cortical Bone Revealed by Solid-State NMR Spectroscopy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n° 47, p. 17064-17065, déc. 2009.
- [47] N. Nassif, F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, et M. M. Giraud-Guille, « *In Vivo* Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite », *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 12, p. 3653-3663, juin 2010.
- [48] K. Beshah, C. Rey, M. J. Glimcher, M. Schimizu, et R. G. Griffin, « Solid state carbon-13 and proton NMR studies of carbonate-containing calcium phosphates and enamel », *J. Solid State Chem.*, vol. 84, n° 1, p. 71-81, janv. 1990.
- [49] T. Isobe, S. Nakamura, R. Nemoto, M. Senna, et H. Sfihi, « Solid-State Double Nuclear Magnetic Resonance Study of the Local Structure of Calcium Phosphate Nanoparticles

- Synthesized by a Wet-Mechanochemical Reaction », *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, n° 20, p. 5169-5176, mai 2002.
- [50] F. Babonneau, F. Babonneau, C. Bonhomme, S. Hayakawa, et A. Osaka, « Solid State NMR Characterization of Nano-crystalline hydroxy-carbonate Apatite Using ^1H - ^{31}P - ^{13}C Triple Resonance Experiments », *MRS Proc.*, vol. 984, janv. 2006.
- [51] D. Laurencin, A. Wong, J. V. Hanna, R. Dupree, et M. E. Smith, « A High-Resolution ^{43}Ca Solid-State NMR Study of the Calcium Sites of Hydroxyapatite », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 8, p. 2412-2413, févr. 2008.
- [52] D. Eichert, M. Salomé, M. Banu, J. Susini, et C. Rey, « Preliminary characterization of calcium chemical environment in apatitic and non-apatitic calcium phosphates of biological interest by X-ray absorption spectroscopy », *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 60, n° 6, p. 850-858, juill. 2005.

Chapitre IV /
Organisation 3D des cristaux d'apatite

Chapitre IV / Organisation 3D des cristaux d'apatite	188
Introduction	188
IV-1 / Les techniques utilisées : Cryo-MET & WAXD	191
IV-1-1) Cryo-MET	191
IV-1-2) WAXD	191
IV-2 / Rôle de l'eau à l'interface minéral-minéral	193
IV-2-1) Comportement de CHA et CHA-SBF en milieu aqueux	193
IV-2-1-a) Observations par cryo-MET	193
IV-2-1-b) Analyses par WAXD	196
IV-2-2) Comportement de HA en milieu aqueux	198
IV-2-3) Comportement de CHA-aiguilles en milieu aqueux	199
IV-2-4) Obtention de plaquettes d'apatite dépourvues de domaine non-apatitique de surface	202
IV-2-4-a) Les différents protocoles expérimentaux	202
IV-2-4-b) Les différentes caractérisations : DRX, MET et RMN	203
IV-2-5) Comportement de CHA-200 en milieu aqueux	206
IV-2-5-a) Etude par RMN	206
IV-2-5-b) Observations par cryo-MET	207
IV-2-5-c) Analyses par WAXD	207
IV-2-6) Comportement de CHA sous vide	208
IV-2-7) Organisation 3D des cristaux d'apatite osseuse	213
IV-2-7-a) Comparaison avec l'organisation de CHA et CHA-SBF dans l'eau	213
IV-2-7-b) Etude d'un échantillon de minéral osseux extrait chimiquement	214
- Etude des propriétés d'hydrophilie par RMN	215
- Observations par MET	216
- Observations par cryo-MET	217
- Analyses par WAXD	218
IV-3 / Mécanisme de formation des agglomérats orientés de plaquettes	220
IV-4 / Conclusion	226

Chapitre IV / Organisation 3D des cristaux d'apatite

Introduction

Comme nous l'avons vu, le tissu osseux est un matériau biologique hautement hiérarchisé, dont l'organisation tridimensionnelle des briques élémentaires (cristaux d'apatite et fibrilles de collagène) est très bien décrite [1], [2] (*cf.* **Figure 2**). Cependant, des questions persistent à propos des mécanismes qui contrôlent les processus de la biominéralisation osseuse. Parmi eux, le débat reste ouvert à propos de la nature et des fonctions des composés qui sont impliqués dans l'organisation 3D des cristaux d'apatite au sein des fibrilles de collagène. Pour rappel, cette organisation s'opère de sorte que les plaquettes s'agencent localement avec leurs larges faces (100) parallèles les unes aux autres, alors que leurs axes cristallographiques c sont parallèles à l'axe longitudinal des fibrilles de collagène (*cf.* **Figure 16**). **A l'heure actuelle, il est communément admis que seules certaines biomolécules templates (collagène et/ou PNCs) contrôlent l'organisation 3D des cristaux d'apatite osseuse *in vivo* (*cf.* **Figures 18, 19 & 20**).** Tout commencerait à l'étape de nucléation, qui serait gouvernée par l'affinité chimique de certains résidus de la biomolécule template avec les précurseurs ioniques en solution, comme par exemple celle des groupements carboxylates des résidus glutamates et aspartates des SIBLINGs avec les ions calcium (*cf.* I-4-2 & I-4-3). Puis, il est proposé que la biomolécule template soit structurée de façon périodique (telle la DMP-1 sous forme de feuillet β au contact d'ions Ca^{2+} [3]), permettant l'apparition des germes d'apatite en des points bien précis le long de son squelette (*cf.* **Figure 20**). Enfin, des phénomènes de croissances épitaxiales successives permettraient la propagation ordonnée des cristaux d'apatite au sein de la matrice organique pour former un réseau continu (matrice minérale) (*cf.* **Figure 20**).

Quant aux biomolécules incriminées, des expériences de RMN tendent à montrer que des ions citrates [4] ainsi que des chaînes de polysaccharides des protéoglycanes [5], [6] se trouvent à proximité du minéral *in vivo* (respectivement à $\sim 3\text{-}5$ Å, et à $5\text{-}6$ Å) ; alors que le collagène se trouverait à ~ 9 Å du minéral pour un échantillon d'os frais, contre $\sim 7,6$ Å pour un échantillon d'os en partie déshydraté [7]. D'un autre côté, des expériences plus spécifiques ont montré que la DMP-1 était capable d'induire le coalignement de cristaux d'apatite préformés selon leur axe c en solution [8]. D'autres études ont observé la nucléation puis la croissance orientée de cristaux d'apatite au sein de fibrilles de collagène en présence de

polyélectrolytes de synthèse (utilisés afin de mimer les SIBLINGs) [9]–[11]. Pour finir, le collagène a été aussi proposé comme acteur de la minéralisation *via* sa capacité à fixer les ions calcium et phosphates [12].

D'un autre côté, nous avons démontré que le domaine non-apatitique du minéral osseux était de nature très hydrophile, lequel engendre la présence de molécules d'eau fortement adsorbées en surface des cristaux d'apatite *in vivo* (*cf.* **Figures 40 & 42**).

Ces molécules d'eau seraient donc au plus près des cristaux d'apatite *in vivo*, formant de cette manière une véritable coquille d'hydratation rigide, pour reprendre la formule de W. F. Neuman *et al.* [13], [14]. De cette manière, lorsque deux cristaux d'apatite sont en contact, il est imaginable qu'avant même toute biomolécule, cela soit les molécules d'eau provenant de leur coquille d'hydratation qui gouverne l'interface minéral-minéral.

Par ailleurs, une grande partie de ces molécules d'eau n'est plus détectée suite à une simple déshydratation de l'échantillon d'os à température ambiante (*cf.* **Figure 40**). Une telle observation est ainsi en accord avec le modèle proposé par Erin Wilson *et al.* [15] (*cf.* **Figure 27**). D'un autre côté, la teneur en eau du tissu osseux diminue naturellement lors du vieillissement d'un individu [16], [17], et Jeffrey Nyman *et al.* proposent que cette diminution concernerait principalement l'eau interstitielle au sein de la porosité collagène-apatite, et non pas l'eau « libre » [18]. En parallèle, de nombreuses études sur les propriétés mécaniques de l'os ont mis en lumière qu'elles étaient altérées suite à sa déshydratation [19]–[24], à savoir : la rigidité, la résistance à la traction et la dureté augmentent ; alors que la contrainte à la rupture et la viscoélasticité diminuent. De plus, une étude plus poussée propose que la perte de l'eau associée au collagène diminuerait la dureté de l'os, alors que celle associée au minéral en diminuerait la résistance à la traction ainsi que la dureté [25]. La proposition faite par Jitin Samuel *et al.*, à savoir que l'eau de la porosité collagène-apatite favoriserait l'adhésion entre la matrice organique et la matrice inorganique va également dans ce sens [26]. Ces résultats suggèrent que l'eau contribue aux propriétés mécaniques de l'os, et font écho à une vieille théorie qui propose qu'il devrait en partie sa résistance à l'hydrodynamique [27]–[29] (où l'eau, une fois compressée, serait capable de disperser les contraintes mécaniques en transférant les charges dans toutes les directions). Ceci est à mettre en perspective avec la poromécanique appliquée à l'os, qui le décrit comme une phase solide poreuse saturée en eau, et essaie de prédire le mouvement des fluides une fois sous pression [30]. Cette théorie

implique que l'eau au sein de la porosité collagène-apatite (*i.e.* l'eau au contact du minéral), soit quasiment immobile, comme le suggère également nos résultats RMN.

Par ailleurs, précédemment à notre étude montrant que le domaine non-apatitique était le responsable du caractère hydrophile de la surface du minéral osseux, plusieurs hypothèses ont été émises par Christian Rey et ses collègues concernant les potentiels rôles *in vivo* d'un tel domaine de surface [31], [32] :

- celui-ci pourrait servir à immobiliser et à concentrer les précurseurs ioniques de l'apatite en surface des cristaux et ainsi favoriser leur croissance.
- celui-ci étant métastable, il pourrait potentiellement accroître la solubilité des cristaux d'apatite sous l'action des ostéoclastes.
- celui-ci pourrait agir comme un réservoir ionique pour assurer les équilibres physico-chimiques du fluide extracellulaire.
- celui-ci pourrait avoir des propriétés d'adsorption particulières envers les biomolécules (dont les PNCs), dont les mécanismes restent encore à définir de manière plus précise.

En définitive, l'interface minéral-minéral est gouvernée à l'échelle moléculaire par la présence de molécules d'eau « rigides », dont la perte semble affecter les propriétés mécaniques de l'os à l'échelle macroscopique. Par ailleurs, il se trouve que les cristaux d'apatite au sein du tissu osseux mature ne sont pas isolés mais sont tous associés les uns avec les autres suite à leur organisation 3D. Il a été proposé que cette association soit telle, que les cristaux d'apatite forment un *continuum* ayant sa propre intégrité structurale, même après le retrait de la matrice organique (même si le manque d'information concernant la quantité résiduelle de matrice organique questionne les résultats de cette étude) [33]. **Ce sont les raisons pour lesquelles, nous nous sommes posé la question si les molécules d'eau à l'interface minéral-minéral avaient un potentiel rôle structurant envers le minéral osseux *in vivo*.**

IV-1 / Les techniques utilisées : Cryo-MET & WAXD

Afin de comprendre le rôle joué par la coquille d'hydratation rigide autour des cristaux d'apatite *in vivo*, nous avons entrepris des études *in vitro* par cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET), ainsi que par diffraction des rayons X aux grands angles (WAXD, pour Wide-angle X-ray Diffraction) en transmission.

IV-1-1) Cryo-MET

Toutes les observations de cryo-MET ont été réalisées en collaboration avec Gérard Pehau-Arnaudet de l'institut Pasteur (UMR 3528, Biologie structurale des processus cellulaires et maladies infectieuses). Cette technique permet l'observation des cristaux d'apatite (osseuse et biomimétique) en conservant leur coquille d'hydratation, afin d'étudier le rôle de cette dernière sur l'interface minéral-minéral.

En pratique, l'échantillon d'apatite sous forme de poudre est d'abord dispersé dans de l'eau osmosée, à une concentration élevée de 5 mg/mL. Le mélange est ensuite inséré dans un bain à ultrasons pour une période de 10 minutes, dans le but de disperser les cristaux d'apatite le plus possible. Suite à cela, le mélange est placé sous agitation modérée pendant 45 minutes, puis laissé au repos pendant les 15 minutes précédant sa cryofixation. Par la suite, on prélève 5 μ L du mélange à l'aide d'une pipette, que l'on dépose sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone à trous. La grille est alors insérée à l'intérieur d'un cryo-plongeur, où la température et le taux de l'humidité de l'air sont fixés, respectivement à 25°C et 85 %. Dans un premier temps, le surplus d'eau recouvrant la grille est absorbée plus ou moins longtemps au contact d'un papier filtre, afin d'obtenir l'épaisseur de glace désirée. Ensuite, la grille est plongée à grande vitesse dans un bain d'éthane liquide à -174°C, lui-même refroidi par un bain d'azote liquide à -196°C. Cette étape permet la vitrification de l'eau du mélange, figeant ainsi les particules d'apatite dans l'état dans lequel elles se trouvaient en solution. La grille est ensuite conservée dans un porte échantillon contenant un réservoir d'azote liquide avant son observation au microscope.

IV-1-2) WAXD

Des expériences de WAXD ont été réalisées afin de déterminer l'orientation adoptée par les cristaux d'apatite une fois dispersés en milieux aqueux. En pratique, le

faisceau de rayons X (diamètre = 400 μm , au rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$) vient frapper l'échantillon (*i.e.* un mélange poudre d'apatite + eau) qui se trouve au sein d'un capillaire en borosilicate (diamètre = 1 mm). L'expérience étant réalisée sous vide, le capillaire fut préalablement scellé avec de la cire, permettant ainsi une conservation optimale de l'hydratation de l'échantillon. Ensuite, le signal diffracté est récolté en mode transmission à l'aide d'un détecteur plan (*i.e.* une image plate, $15 \times 15 \text{ cm}^2$), qui se trouve à une distance de 58,6 mm par rapport à l'échantillon. Puis, l'intégration radiale de l'image plate permet de récolter un diffractogramme WAXD 1D. Enfin, le signal de fond, comprenant un important signal de diffusion de l'eau, fut supprimé à l'aide du logiciel Fullprof (voir section « Matériels et méthodes »). Deux procédures différentes afin de mouiller la poudre ont été expérimentées :

(i) La première où la poudre est en premier lieu introduite sèche dans le capillaire, suivi de l'injection de l'eau à l'aide d'une seringue.

(ii) La seconde est similaire à celle décrite pour les expériences de cryo-MET, c'est-à-dire où le mélange poudre + eau est réalisé au préalable (à une concentration de 5 mg/mL). Le mélange est alors placé dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes, agité de façon modérée pendant 45 minutes, et enfin laissé au repos pendant 15 minutes. Ce mélange est alors prélevé, puis injecté au sein du capillaire à l'aide d'une seringue.

Des diffractogrammes WAXD des échantillons à l'état sec ont aussi été enregistrés sur des échantillons également introduits dans un capillaire scellé. Une fois les diffractogrammes des échantillons secs et mouillés comparés, les deux procédures se sont avérées avoir la même tendance. Cependant, l'étape d'hydratation de la procédure (i) engendre un flux d'eau le long du capillaire, lequel pourrait favoriser l'orientation des particules suite à leur confinement. Ainsi, seule la procédure (ii) qui semble la plus optimale fut retenue. Remarquons cependant qu'*in vivo*, la pression engendrée par le flux du fluide extracellulaire pourrait mener également à favoriser l'orientation des plaquettes au sein des fibrilles de collagène où il est décrit la présence de canaux reliant différentes zones de gap [34], [35].

IV-2 / Rôle de l'eau à l'interface minéral-minéral

IV-2-1) Comportement de CHA et CHA-SBF en milieu aqueux

Nous nous sommes d'abord tournés vers les apatites biomimétiques **CHA** et **CHA-SBF**. Il s'agit de candidats appropriés afin de mimer l'interface minéral-minéral *in vivo*, puisqu'au même titre que le minéral osseux : leur domaine non-apatitique de surface est très hydrophile (*cf.* **Figure 52**) ; et leurs cristaux sont sous la forme de plaquettes de taille nanométrique (*cf.* **Figure 50**).

IV-2-1-a) Observations par cryo-MET

Les clichés de cryo-MET à faible grandissement des suspensions de **CHA** et **CHA-SBF** dans l'eau apparaissent au sein de la **Figure 79**. Pour chaque échantillon, de nombreuses zones très contrastées et donc très denses en plaquettes sont observées, et ont été entourées par des ellipses rouges. Un tel comportement était attendu car la concentration en plaquettes est beaucoup plus importante que celle utilisée en MET standard (environ 10 fois supérieure), et les particules sont très hydrophiles.

La **Figure 80** rassemble quelques exemples de ces zones denses en plaquettes dans le cas de l'échantillon **CHA**, observées à plus fort grandissement. **Il apparaît dorénavant qu'il s'agit d'agglomérats de plaquettes ordonnées (d'une épaisseur de $\sim 2,3 \pm 0,2$ nm), lesquelles sont agencées de sorte que leurs larges faces (100) se trouvent être parallèles les unes aux autres.** Ces plaquettes s'empilent ainsi latéralement (*cf.* doubles flèches bleues), mais également longitudinalement (*cf.* doubles flèches rouges). Il est à noter qu'une telle observation nécessite que ces plaquettes soient exposées selon leurs tranches, et leurs larges faces (100) sont donc strictement parallèles au faisceau électronique.

De tels agglomérats de plaquettes ordonnées sont également observés dans le cas de l'échantillon **CHA-SBF** (épaisseur de $\sim 1,4 \pm 0,1$ nm, *cf.* **Figure 81**). La **Figure 81-A** correspond au rectangle blanc de la **Figure 79** à un plus fort grandissement, tandis que la **Figure 81-B** correspond au rectangle blanc de la **Figure 81-A**. La façon avec laquelle les plaquettes de **CHA-SBF** sont empilées les unes avec les autres semble plus régulière.

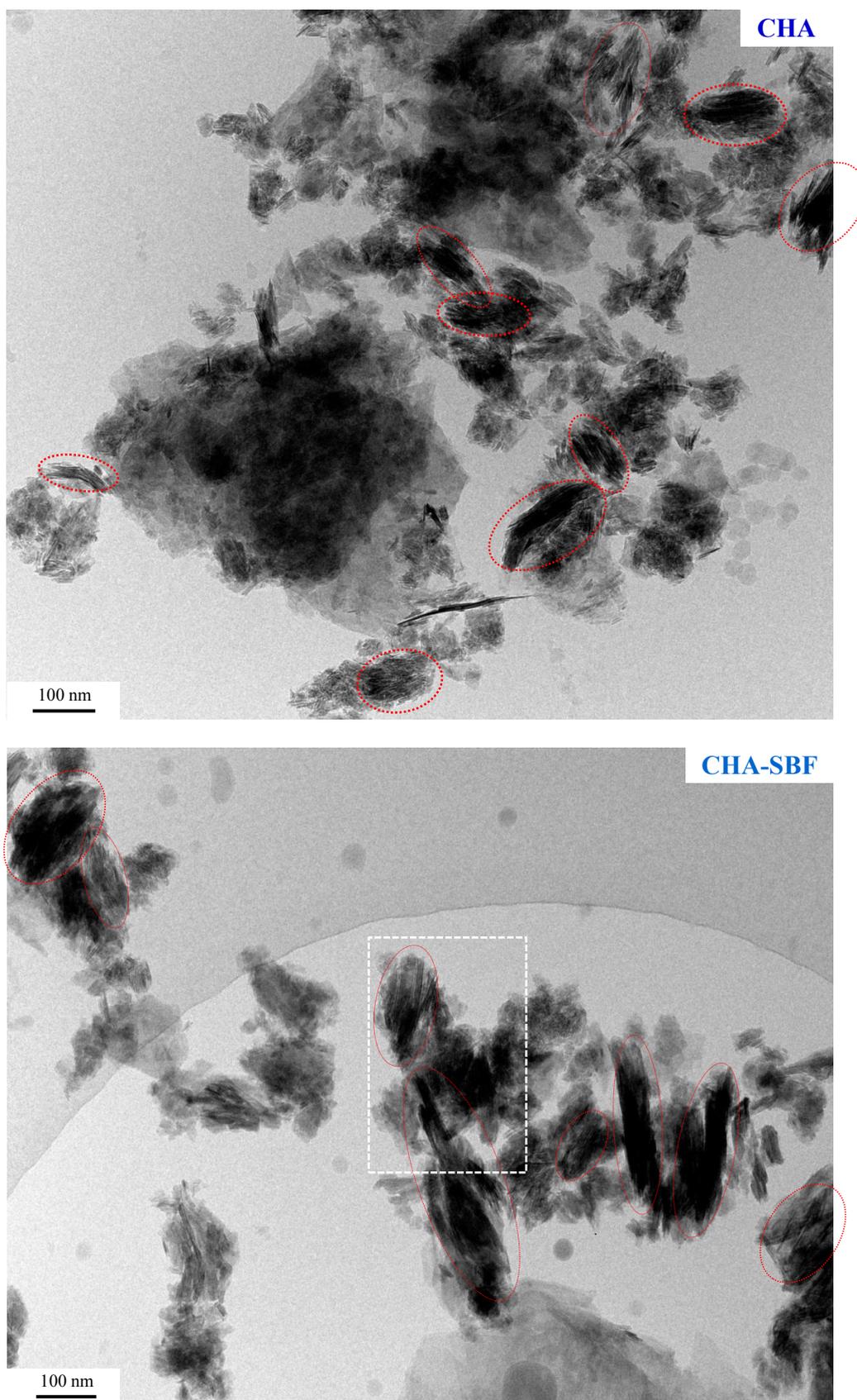


Figure 79. Clichés de cryo-MET des suspensions de CHA et CHA-SBF dans l'eau.

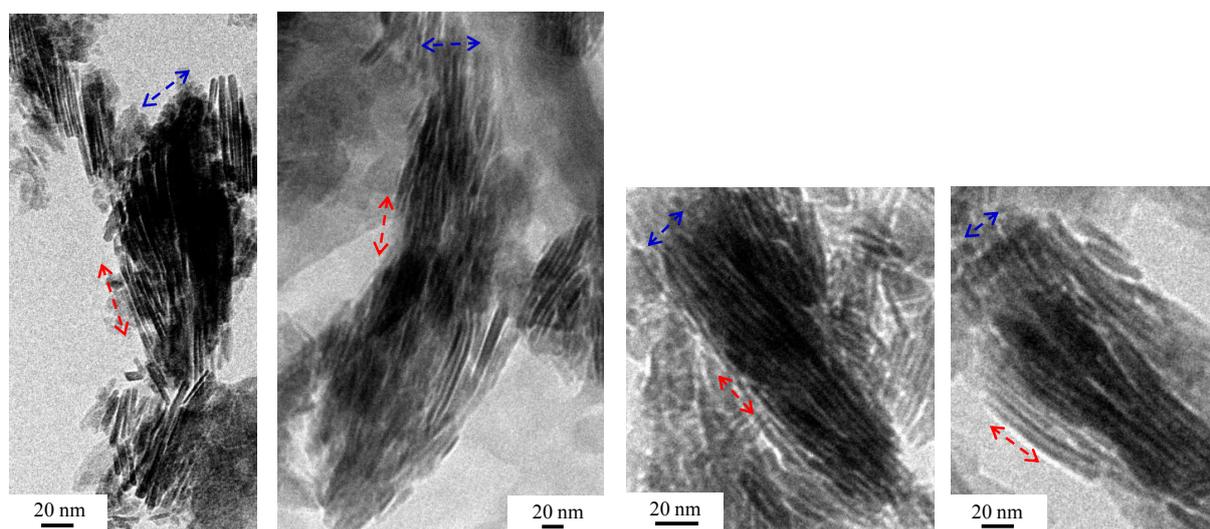


Figure 80. Clichés de cryo-MET des agglomérats de plaquettes ordonnées au sein de la suspension de **CHA** dans l'eau. Les doubles flèches rouges indiquent la direction de leur empilement longitudinal, alors que les doubles flèches bleues indiquent la direction de leur empilement latéral.

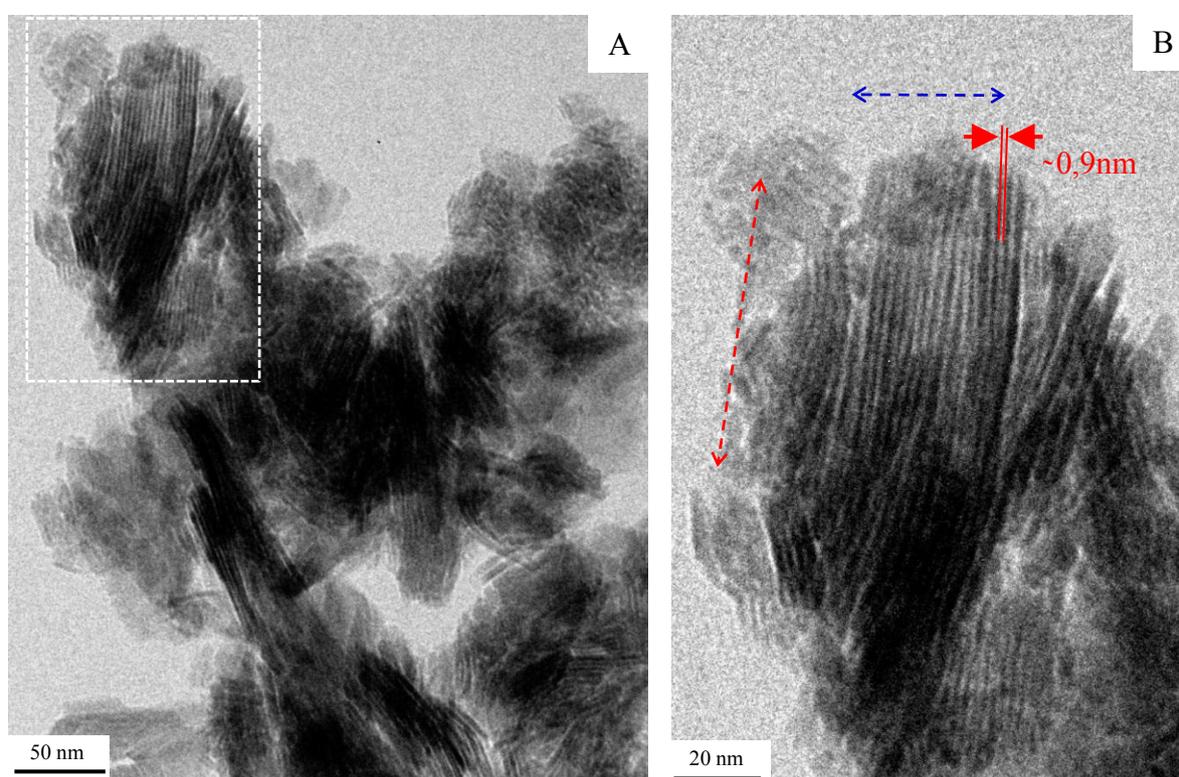


Figure 81. Clichés de cryo-MET d'un agglomérat de plaquettes ordonnées au sein de la suspension de **CHA-SBF** dans l'eau, où **(B)** correspond au rectangle blanc montré dans **(A)** à un plus fort grandissement. Par ailleurs, **(A)** correspond au rectangle blanc montré dans la **Figure 1** à un plus fort grandissement.

Une telle différence pourrait s'expliquer par le fait que les plaquettes de **CHA-SBF** possèdent des tailles relativement monodisperses (*i.e.* longueur 30-50 nm, largeur 10-30 nm, et épaisseur $\sim 1,4-4$ nm), alors que celles de **CHA** sont assez polydisperses (*i.e.* longueur 30-200 nm, largeur 20-50 nm, et épaisseur $\sim 2-9$ nm, *cf.* **Figure 50**). Plus particulièrement, leur empilement latéral (*cf.* double flèche bleue) laisse apparaître distinctement une périodicité, puisqu'une étroite zone moins contrastée (d'une épaisseur de $\sim 0,9 \pm 0,1$ nm) est observée entre deux plaquettes adjacentes (*cf.* **Figure 81-B**). Dans le cas de **CHA**, cette zone moins contrastée est épaisse d'environ $1,3 \pm 0,2$ nm. Il est envisageable que cette zone soit occupée par les molécules d'eau fortement adsorbées en surface des particules (et/ou leur domaine non-apatitique à condition que celui-ci soit moins dense).

Par ailleurs, l'épaisseur des plaquettes de **CHA** et **CHA-SBF** impliquées au sein de ces agglomérats ordonnés est extrêmement fine (respectivement $\sim 2,3 \pm 0,2$ nm, et $\sim 1,4 \pm 0,1$ nm), et les plaquettes plus épaisses ne semblent ainsi pas capables de s'organiser. Néanmoins, ces épaisseurs de plaquettes extrêmement fines correspondent à celles mesurées pour de l'os cortical de bovin adulte, où approximativement 98% des plaquettes avaient une épaisseur entre $\sim 0,6$ et ~ 2 nm ($\pm 0,2$ nm) [36].

Enfin, à la vue des morphologies parfois très irrégulières des plaquettes (*cf.* **Figure 50**), il est surprenant de ne pas réussir à discerner la jonction entre deux plaquettes adjacentes selon l'empilement longitudinal (*cf.* double flèche rouge).

IV-2-1-b) Analyses par WAXD

Les clichés de cryo-MET ont révélé un auto-assemblage des plaquettes d'apatites biomimétiques en milieux aqueux, avec à la fois : un empilement latéral régulier, et un agencement longitudinal régulier. Des analyses WAXD ont également été réalisées afin de déterminer si une telle organisation était également observée par diffraction des rayons X. Ainsi, les diffractogrammes WAXD de **CHA** et **CHA-SBF** secs et en suspension dans l'eau ont été enregistrés puis comparés (*cf.* **Figure 82**).

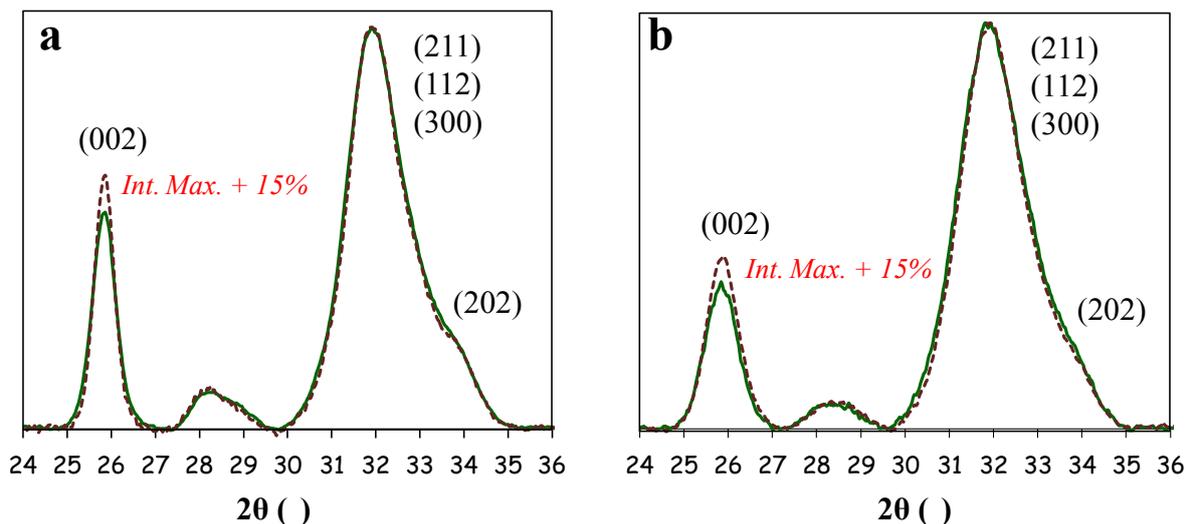


Figure 82. Diffractogrammes WAXD 1D de la poudre sèche (traits verts) et mouillée (traits pointillés bordeaux) de **CHA (a)** et **CHA-SBF (b)**.

Les raies de diffraction caractéristiques de l'apatite sont observée à la fois pour les échantillons secs, et pour les échantillons mouillés, à savoir : la raie (002) à $2\theta \sim 25,9^\circ$, et les raies (211), (112), (300) et (202) juxtaposées sur la gamme $2\theta \sim 31,8-35,1^\circ$. Cependant, en normalisant les diffractogrammes secs et mouillés sur le massif formé par ces raies juxtaposées, on se rend compte que **l'intensité maximale de la raie (002) augmente une fois l'échantillon mouillé (+ 15 %)**, tandis que sa largeur reste quasiment inchangée.

Afin de confirmer cette tendance, les diffractogrammes ont été décomposés afin de remonter à l'intensité maximale individuelle de chacune des raies juxtaposées sur la gamme $2\theta \sim 31,8-35,1^\circ$ (où les positions et les largeurs des raies furent fixées, cf. **Figure 83**). Le rapport de l'intensité maximale de la raie (002) sur l'intensité maximale de la raie (300) augmente lorsque que l'échantillon est mouillé, à savoir 1,50 vs 1,83 pour **CHA**, et 0,69 vs 0,86 pour **CHA-SBF** (soit respectivement + 22 % et + 25 %). Ainsi, alors que l'intensité maximale de la raie (002) augmente, celle de la raie (300) diminue (cf. **Figure 83**). **Cela suggère que : (i) l'eau est un acteur sur l'organisation des plaquettes de CHA et CHA-SBF ; et (ii) cet auto-assemblage s'opère ici de manière plus importante longitudinalement (i.e. selon l'axe *c* des cristaux), que latéralement.**

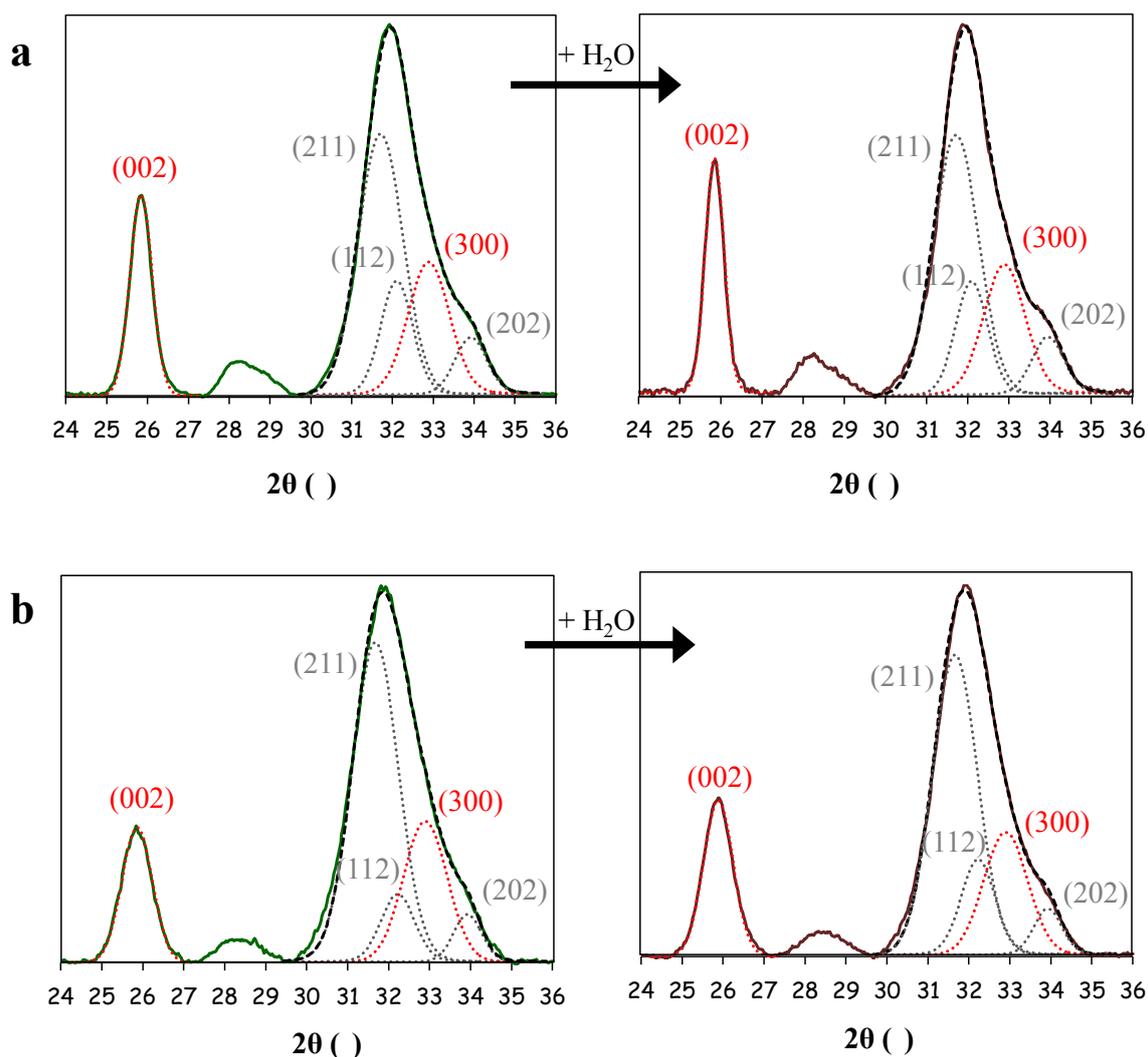


Figure 83. Décomposition des diffractogrammes WAXD 1D de la poudre sèche (à gauche) et mouillée (à droite) de **CHA (a)** et **CHA-SBF (b)**. Le massif formé par la juxtaposition des 4 raies (211), (112), (300) et (202) sur la gamme $2\theta \sim 31,8-35,1^\circ$, fut décomposé en laissant les intensités libres, mais en fixant les positions et les largeurs des raies.

IV-2-2) Comportement de HA en milieu aqueux

Le comportement des particules de l'apatite stœchiométrique **HA** en milieu aqueux a également été observé par cryo-MET (*cf.* **Figure 84**). Cette fois-ci, aucune orientation des particules ne fut observée, ni même de zones très denses en particules. Cependant, il s'agit ici d'un système très dissemblable à celui du minéral osseux, puisque les particules de HA : (i) ont une morphologie sous la forme de bâtonnets (longueur $\sim 30-100$ nm et largeur ~ 25 nm) ; (ii) ne possèdent pas de domaine non-apatite hydrophile (*cf.* **Figure 37**) ; et (iii) donc elles ne sont capables de fortement absorber des molécules d'eau à leur surface (*cf.* **Figure 59**).

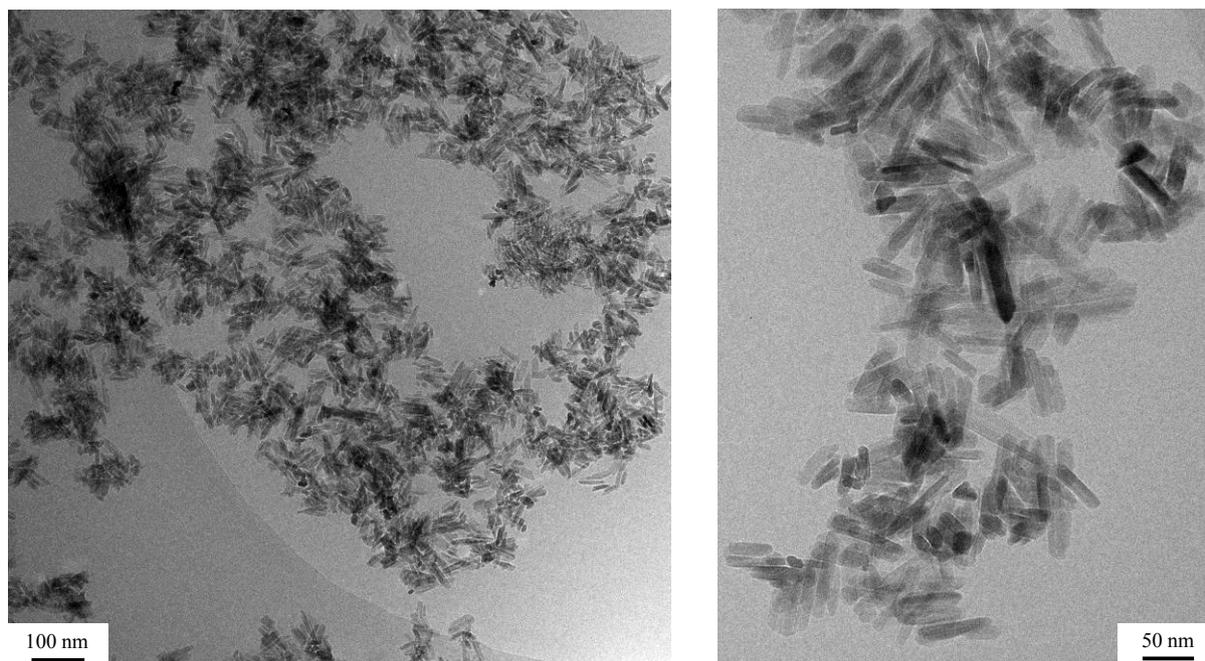


Figure 84. Clichés de cryo-MET d'une suspension dans l'eau de l'échantillon d'apatite stœchiométrique *HA*.

IV-2-3) Comportement de *CHA*-aiguilles en milieu aqueux

Dans le but d'étudier l'importance de la morphologie plaquettaire sur l'organisation de particules d'apatite en milieux aqueux, une apatite carbonatée (possédant un domaine non-apatitique) sous forme d'aiguilles fut synthétisée (appelée **CHA-aiguilles**). Pour ce faire, le protocole de la synthèse par diffusion de vapeurs d'ammoniac a été utilisé à l'identique, à l'exception de la solution réactionnelle qui fut laissée sous agitation continue lors de la précipitation.

Premièrement, seule une phase cristalline d'apatite est détectée par diffraction des rayons X (*cf.* **Figure 85-a**). Ensuite, les aiguilles d'apatite ainsi formées ont une longueur allant d'environ 50 à 120 nm, et une épaisseur d'environ 10-15 nm (*cf.* **Figure 85-b**).

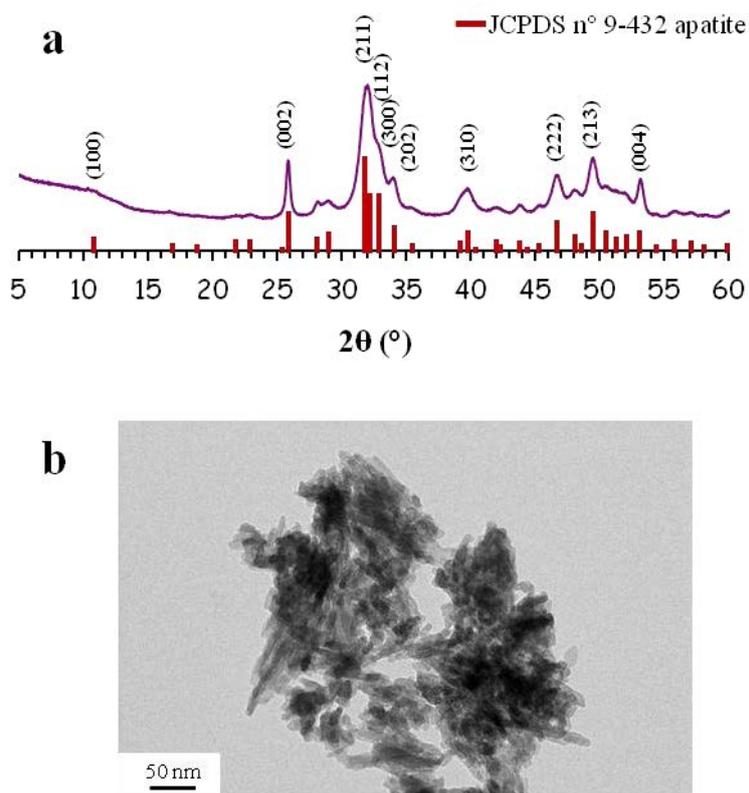


Figure 85. (a) *Diffraction X sur poudre obtenu au rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$ de l'échantillon **CHA-aiguilles**.* (b) *Cliché obtenu en microscopie électronique en transmission (MET) de **CHA-aiguilles**, préalablement dispersé dans de l'éthanol absolu.*

Une expérience RMN HetCor ^1H - ^{31}P fut enregistrée à partir de **CHA-aiguilles** à l'état sec, et a permis d'y vérifier la présence d'un domaine non-apatite (*cf.* l'observation de la tache de corrélation (ii), **Figure 86**).

Ensuite, deux clichés de cryo-MET de la suspension de **CHA-aiguilles** dans l'eau sont réunis au sein de la **Figure 87**. Plusieurs zones très denses en aiguilles sont observées, dont quelques unes ont été entourées à l'aide d'ellipses rouges (*cf.* **Figure 87-A**). Une observation à un plus fort grandissement permet de constater que les aiguilles semblent la plupart du temps orientées de façon aléatoire les unes par rapport aux autres (*cf.* **Figure 87-B**), à l'exception de très rares cas où elles s'orientent localement dans la même direction (*cf.* **Figure 88**, non sans rappeler l'organisation des plaquettes de **CHA** et **CHA-SBF** humides).

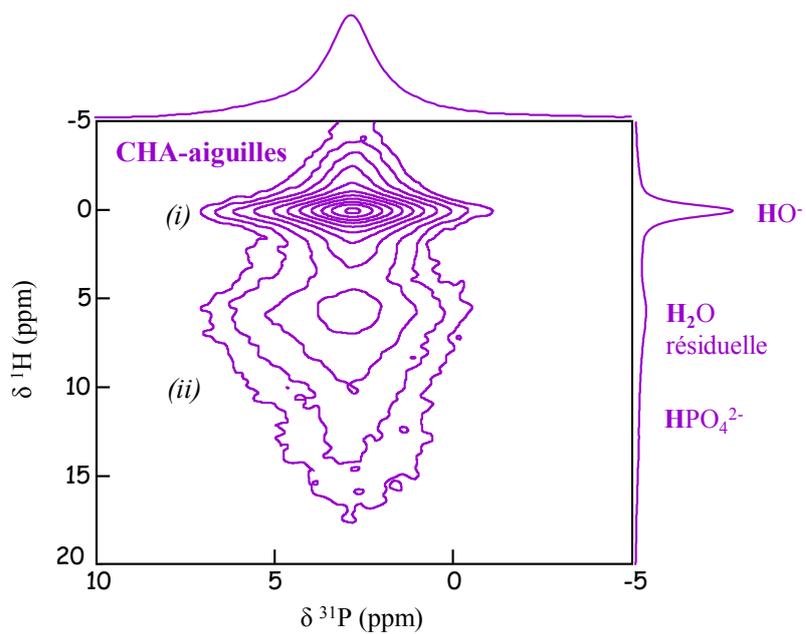


Figure 86. Spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P de **CHA-aiguilles** à l'état sec ($v_{\text{rot}} = 14 \text{ kHz}$, $t_{\text{CP}} = 1 \text{ ms}$). $B_0 = 7,05 \text{ Tesla}$

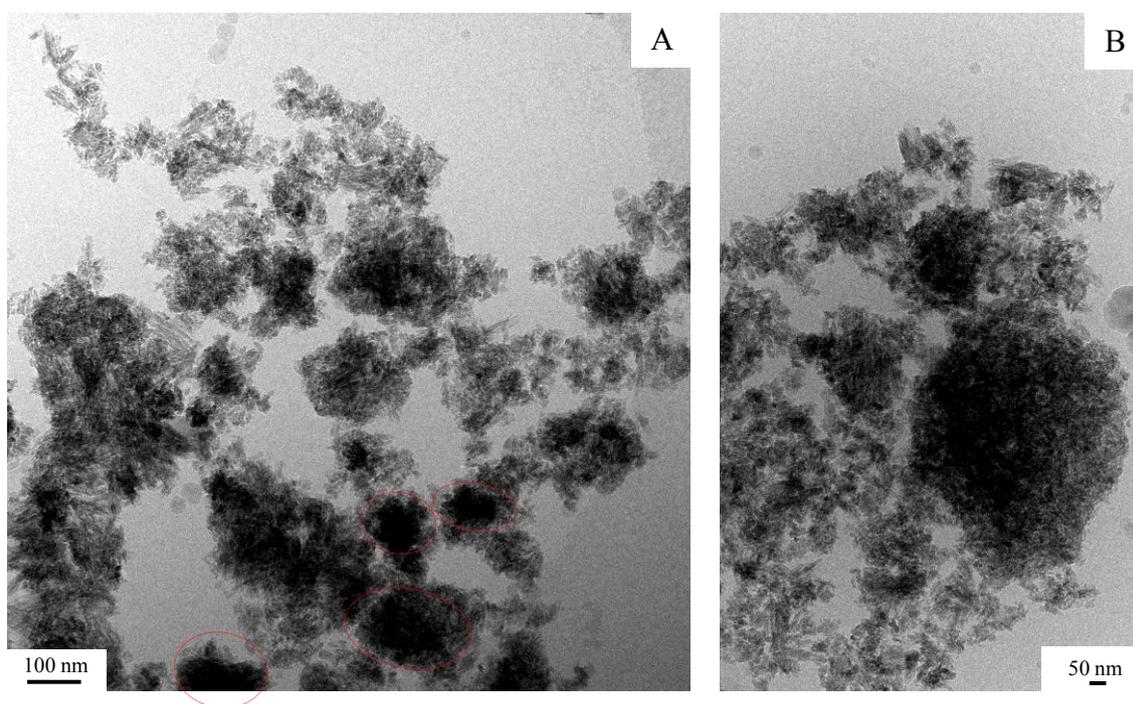


Figure 87. Clichés de cryo-microscopie électronique en transmission d'une suspension de l'échantillon **CHA-aiguilles** dans l'eau.

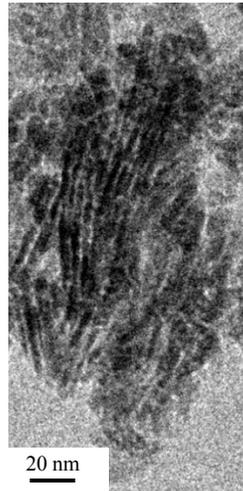


Figure 88. Cliché de cryo-MET d'un rare agglomérat formé de particules coalignées au sein de la suspension de **CHA-aiguilles** dans l'eau.

En définitive, alors que les particules de **HA** et de **CHA-aiguilles** ont des morphologies et des tailles voisines, seules celles de **CHA-aiguilles** ont une forte tendance à s'agglomérer en milieux aqueux. Ces observations suggèrent qu'ici : *(i)* l'agglomération des particules est favorisée en présence du domaine non-apatite hydrophile de surface ; et *(ii)* une morphologie plaquettaire semble être favorable pour la formation de nombreux empilements de particules coalignées (cf. Figures 79, 80 & 81).

IV-2-4) Obtention de plaquettes d'apatite dépourvues de domaine non-apatitique de surface

IV-2-4-a) Les différents protocoles expérimentaux

Dans le but d'étudier l'implication du domaine non-apatitique hydrophile sur l'agglomération et l'organisation des plaquettes d'apatites biomimétiques en milieux aqueux, des plaquettes d'apatite dépourvues de ce dernier ont été préparées. Pour ce faire, un traitement thermique ainsi que trois traitements chimiques différents ont été infligés à un échantillon de **CHA**, permettant l'obtention des échantillons suivants :

- **CHA-200** : De la poudre de **CHA** fut répandue au sein d'une boîte de Petri, puis placée dans une étuve chauffante à 200°C pendant 5 jours.
- **CHA-pH14** : De la poudre de **CHA** (C = 0,2 % en masse) fut dispersée au sein d'une solution aqueuse de **NaOH** concentrée (pH = 14). Ce mélange fut agité continuellement

pendant 1 journée, durée pendant laquelle il fut inséré dans un bain à ultrasons de manière répétée afin de disperser les particules.

- **CHA-pH7,4** : De la poudre de CHA (0,2 % en masse) fut dispersée dans de l'eau osmosée, où le pH fut immédiatement ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution aqueuse de HCl (0,2 % en masse) Ce mélange fut agité continuellement pendant 2 jours, avec également plusieurs séances au sein d'un bain à ultrasons.
- **CHA-pH5** : De la poudre de CHA (C = 0,2 % en masse) fut dispersée au sein d'une solution aqueuse de HCl diluée (pH = 5). Ce mélange fut agité continuellement pendant 1 journée, avec également plusieurs séances au sein d'un bain à ultrasons.

Le pH final après les 3 traitements chimiques fut mesuré afin de vérifier qu'il n'avait pas évolué. Le traitement thermique infligé à **CHA-200** avait pour but de déshydrater le domaine non-apatitique de surface, et de potentiellement favoriser sa « cristallisation ». Les traitements chimiques à pH alcalin et à pH acide avaient pour but de dissoudre le domaine non-apatitique de surface tout en conservant le domaine apatitique de cœur (avec : $pka\ H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} = 7,4$; $pka\ HPO_4^{2-}/PO_4^{3-} = 12,4$, dans l'eau, à 25°C). Enfin, le traitement chimique à pH physiologique avait pour but de profiter du phénomène de maturation du domaine non-apatitique, potentiellement accéléré à l'aide des séances successives dans le bain à ultrasons.

IV-2-4-b) Les différentes caractérisations : DRX, MET et RMN

Les diffractogrammes de rayons X sur poudre de **CHA-200**, **CHA-pH14**, **CHA-pH7,4** et **CHA-pH5** confirment qu'aucune phase cristalline supplémentaire n'est apparue suite à ces différents traitements (*cf. Figure 89*).

Ensuite, des observations par MET de ces échantillons (préalablement dispersés dans de l'éthanol absolu) ont été réalisées, afin de déterminer les conséquences des différents traitements sur les morphologies des particules (*cf. Figure 90*). Les plaquettes de **CHA-200** semblent avoir conservé leur taille et leur morphologie, avec des bordures angulaires bien marquées (*cf. flèches bleues, Figure 90-a*). Au contraire, les plaquettes de **CHA-pH14**, **CHA-pH7,4** et **CHA-pH5** ont été dégradées suite à leur traitement chimique respectif. En effet, leurs tailles semblent avoir largement diminuées, et leurs bordures ont été rognées et sont désormais arrondies (*cf. flèches bleues, Figure 90-b, c & d*).

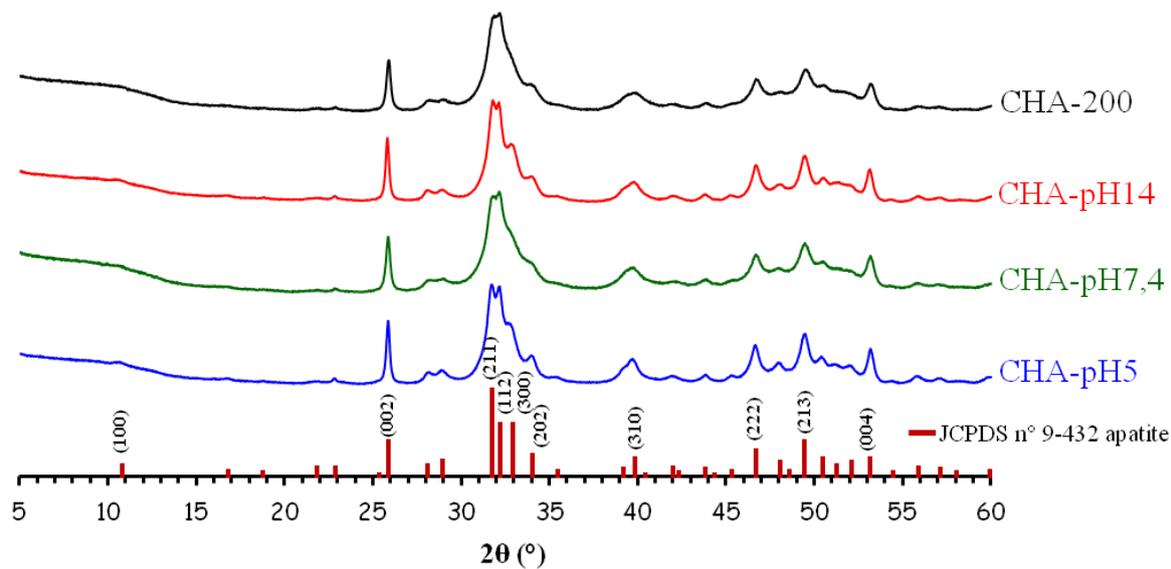


Figure 89. Diffractogrammes de rayons X sur poudre obtenus avec le rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$, des échantillons *CHA-200*, *CHA-pH14*, *CHA-pH7,4* et *CHA-pH5*.

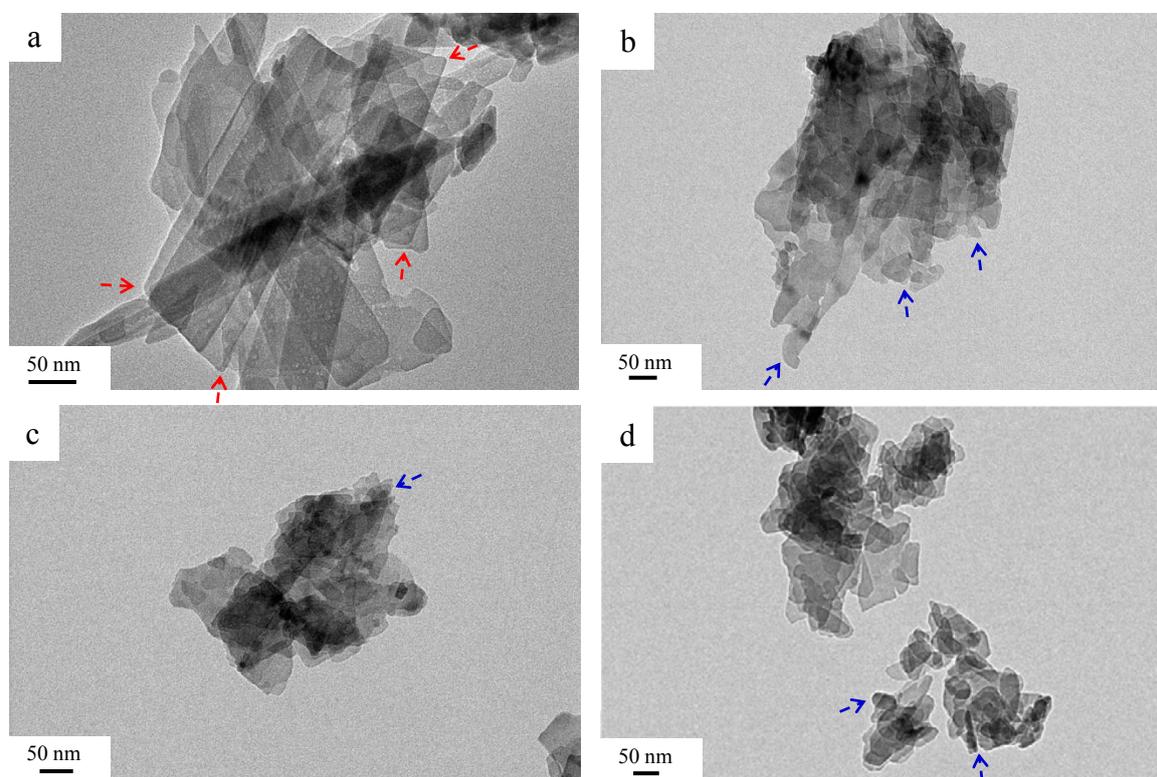


Figure 90. Clichés de MET des échantillons : *CHA-200* (a) ; *CHA-pH14* (b) ; *CHA-pH7,4* (c) ; et *CHA-pH5* (d).

Enfin, des expériences HetCor ^1H - ^{31}P ont été réalisées sur ces différents échantillons de CHA afin de sonder l'efficacité du traitement quant à la « suppression » de leur domaine non-apatitique de surface (cf. **Figure 91** à comparer avec la **Figure 52**).

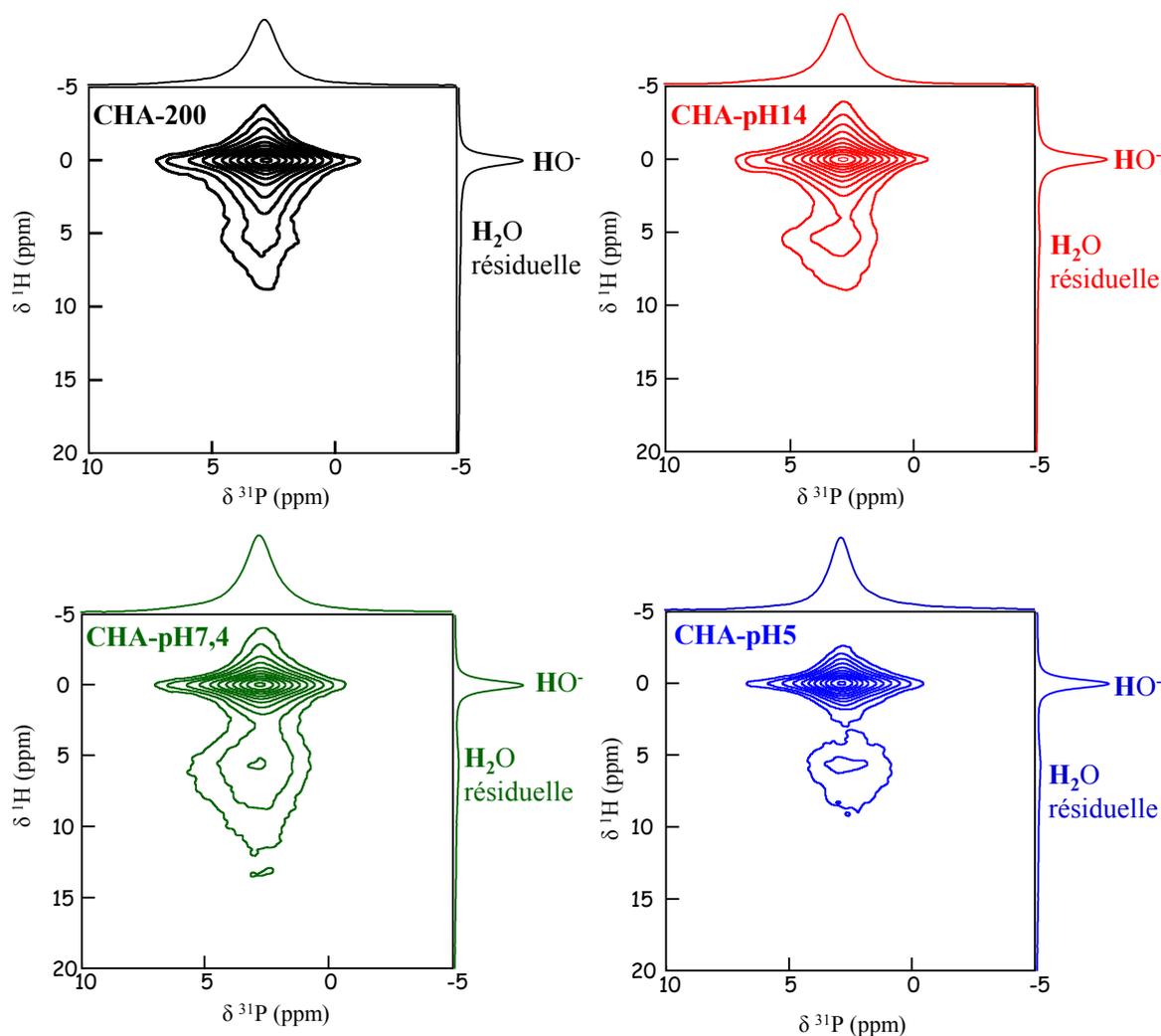


Figure 91. Spectres 2D HetCor ^1H - ^{31}P ($v_{\text{rot}} = 14\text{k Hz}$, $t_{\text{CP}} = 1\text{ ms}$) des échantillons CHA traités afin de « supprimer » leur domaine non-apatitique : thermiquement (**CHA-200**) ; et chimiquement (**CHA-pH14**, **CHApH7,4** et **CHA-pH5**). $B_0 = 7,05\text{ Tesla}$

Dorénavant, les espèces HPO_4^{2-} du domaine non-apatitique (attendues sur la gamme $\delta(^1\text{H}) \sim 7\text{-}18\text{ ppm}$) ne sont plus détectées pour **CHA-200**, **CHA-pH14** et **CHA-pH5**, signe de l'efficacité de ces traitements. Cependant, une tache de corrélation entre des molécules d'eau résiduelles (à $\delta(^1\text{H}) \sim 5,5\text{ ppm}$) et certains phosphores de surface est toujours observée, suggérant l'existence d'un léger domaine non-apatitique persistant. D'un autre côté, une comparaison rapide avec le spectre HetCor ^1H - ^{31}P de CHA de la **Figure 52**, permet de se

rendre compte que la proportion en espèces HPO_4^{2-} ne semble avoir que légèrement diminuée pour **CHA-7,4**.

En définitive, le traitement thermique qui consiste à chauffer l'échantillon **CHA** pendant 5 jours à 200°C semble être le protocole le plus approprié pour notre étude. En effet, cela a permis à la fois : (i) de conserver intacte la morphologie des plaquettes ; et (ii) de dénaturer le domaine non-apatite de sorte qu'il ne soit quasiment plus détecté à l'aide de l'expérience HetCor ^1H - ^{31}P .

IV-2-5) Comportement de **CHA-200** en milieu aqueux

IV-2-5-a) Etude par RMN

Tout d'abord, afin d'étudier ses propriétés d'hydrophilie, **CHA-200** fut étudié une fois mouillé à l'aide de l'expérience RMN HetCor ^1H - ^{31}P (*i.e.* + 10 μL d'eau osmosée directement introduite sur la poudre dans le rotor). Les projections de la dimension ^1H des expériences HetCor ^1H - ^{31}P réalisées sur **CHA** et **CHA-200** mouillés sont réunis au sein de la **Figure 92**. Par rapport au signal des OH^- ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm), le signal provenant des molécules d'eau fortement adsorbées en surface des particules ($\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm) est nettement moins intense pour **CHA-200** que pour **CHA** (réduction d'environ 80 à 90 %).

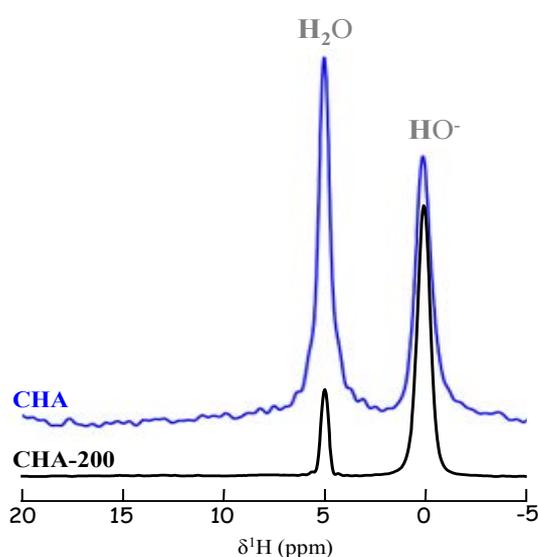


Figure 92. Les projections de la dimension ^1H des expériences HetCor ^1H - ^{31}P de **CHA** et **CHA-200** humides ($v_{\text{rot}} = 14\text{k Hz}$, $t_{\text{CP}} = 1\text{ ms}$). $B_0 = 7,05\text{ Tesla}$

La suppression du domaine non-apatitique de **CHA-200** a donc logiquement modifié ses propriétés d'hydrophilie. La poudre semble adsorber dorénavant une quantité largement moindre de molécules d'eau à sa surface.

IV-2-5-b) Observations par cryo-MET

Des observations d'une suspension de **CHA-200** dans l'eau furent réalisées par cryo-MET (*cf.* **Figure 93**). Les plaquettes de **CHA-200** ont moins tendance à s'agglomérer une fois mouillées que celles de **CHA**, puisque moins de zones denses en plaquettes sont observées (*cf.* ellipses rouges, **Figure 93-a**).

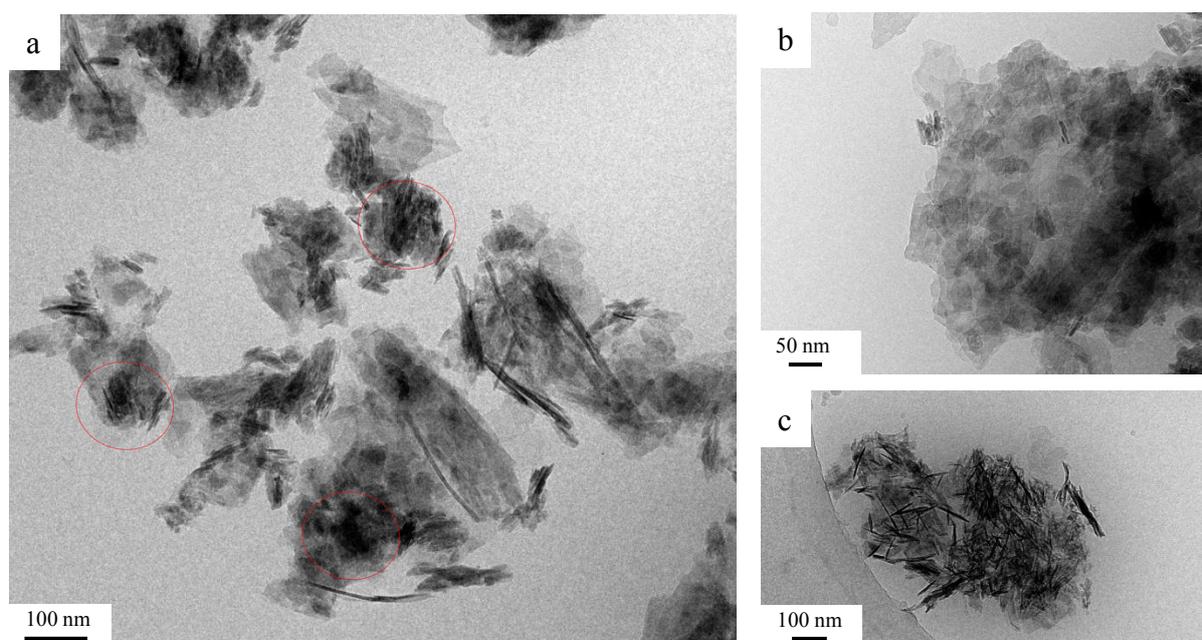


Figure 93. Clichés de cryo-MET d'une suspension de **CHA-200** dans l'eau.

De plus, les plaquettes de **CHA-200** semblent orientées aléatoirement les unes par rapport aux autres, et ceci est vérifié aussi bien lorsqu'elles sont exposées selon leur grande face (*cf.* **Figure 93-b**), que selon leur tranche (*cf.* **Figure 93-c**).

IV-2-5-c) Analyses par WAXD

Pour compléter l'étude, les diffractogrammes WAXD de **CHA-200** sec et en suspension dans l'eau ont été acquis et comparés (*cf.* **Figure 94**). Cette fois-ci, l'intensité de la raie 002 à $2\theta \sim 25,9^\circ$ reste identique, peu importe que l'échantillon soit sec ou mouillé. Cela

confirme les observations faites par cryo-MET, à savoir qu'aucun empilement de plaquettes co-alignées ne se forme lorsque **CHA-200** est en suspension dans l'eau. Ainsi, bien qu'il soit probable qu'une morphologie plaquettaire puisse favoriser un empilement orienté [37], rien de tel n'est observé pour **CHA-200** en absence de domaine non-apatitique.

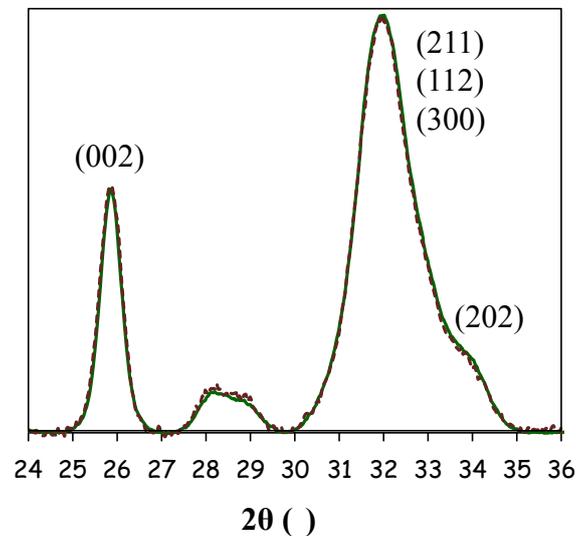


Figure 94. Diffractogramme WAXD 1D de la poudre sèche (trait vert) et mouillée (traits pointillés bordeaux) de **CHA-200**.

De cette manière, l'implication du domaine non-apatitique hydrophile sur l'organisation des plaquettes d'apatites biomimétiques (cf. Figures 79, 80, 81 & 82) est mise en évidence, dont le mécanisme d'auto-assemblage sera discuté ultérieurement (cf. IV-4). Par ailleurs, cela confirme que l'augmentation relative de l'intensité de la raie (002) observée dans le cas de **CHA** et **CHA-SBF**, ne peut pas être imputée à un effet d'orientation des plaquettes suite à leur confinement au sein du capillaire.

IV-2-6) Comportement de CHA sous vide

Dans le but d'étudier spécifiquement l'implication des molécules d'eau sur l'organisation des plaquettes, **CHA** a été observé à l'état sec sous vide. Pour ce faire, une grille préalablement utilisée lors des observations faites par cryo-MET fut récupérée, séchée à température ambiante, puis observée à nouveau par MET standard cette fois-ci (cf. **Figure 95**).

De nombreux agglomérats de plaquettes sont une nouvelle fois observés, et sont entourés par des ellipses rouges (*cf.* **Figure 95-a**). Il est néanmoins important de noter qu'ici, au contraire de la cryo-MET, la formation de certains agglomérats a pu être favorisée suite à l'évaporation de l'eau de la grille. Une observation faite à plus fort grandissement, confirme que certains de ces agglomérats sont formés par des plaquettes coalignées (*cf.* **Figure 95-b**). Ces observations suggèrent qu'une organisation rémanente peut subsister même après le retrait des molécules d'eau, mais un nombre moins conséquent de plaquettes semblent être impliquées. De plus, l'espace présent entre deux plaquettes adjacentes et attribué à l'existence d'une fine couche de molécules d'eau (*cf.* **Figures 80 & 81**), n'est dorénavant plus observé. En effet, les plaquettes de **CHA** semblent ici directement en contact les unes avec les autres (voir les flèches bleues de la **Figure 95-b**), mais seule une exposition de leurs larges faces strictement parallèles au faisceau électronique permettrait de le confirmer. **Une telle observation renforce ainsi l'idée de l'implication de molécules d'eau à l'interface minéral-minéral.**

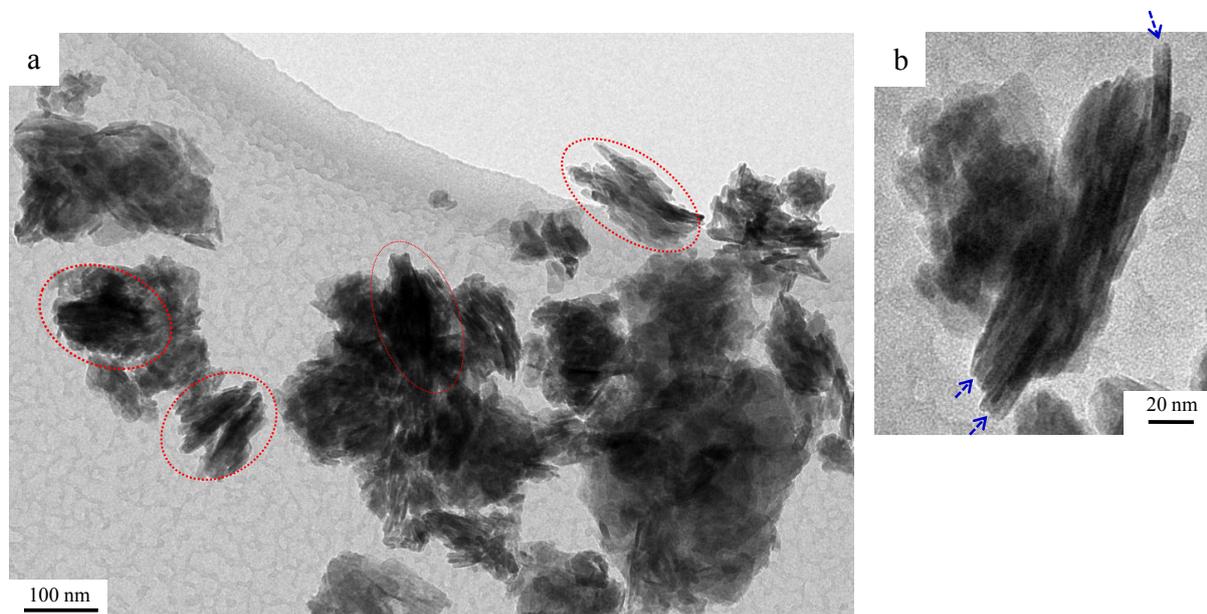


Figure 95. Clichés MET de **CHA**. La grille utilisée ici provient d'une observation antérieure réalisée par cryo-MET, où **CHA** fut donc préalablement dispersé dans l'eau.

Des observations par MET standard où l'échantillon **CHA** fut préalablement dispersé dans l'éthanol absolu ont également été réalisées (*cf.* **Figure 96**). Il est à noter que les conditions de préparation des échantillons pour leur observation en MET se différencient largement de celles de cryo-MET, à savoir : (i) nécessité d'utiliser une concentration faible en poudre lors de sa dispersion dans le solvant ; et (ii) présence de potentiels artefacts liés à l'étape d'évaporation du solvant.

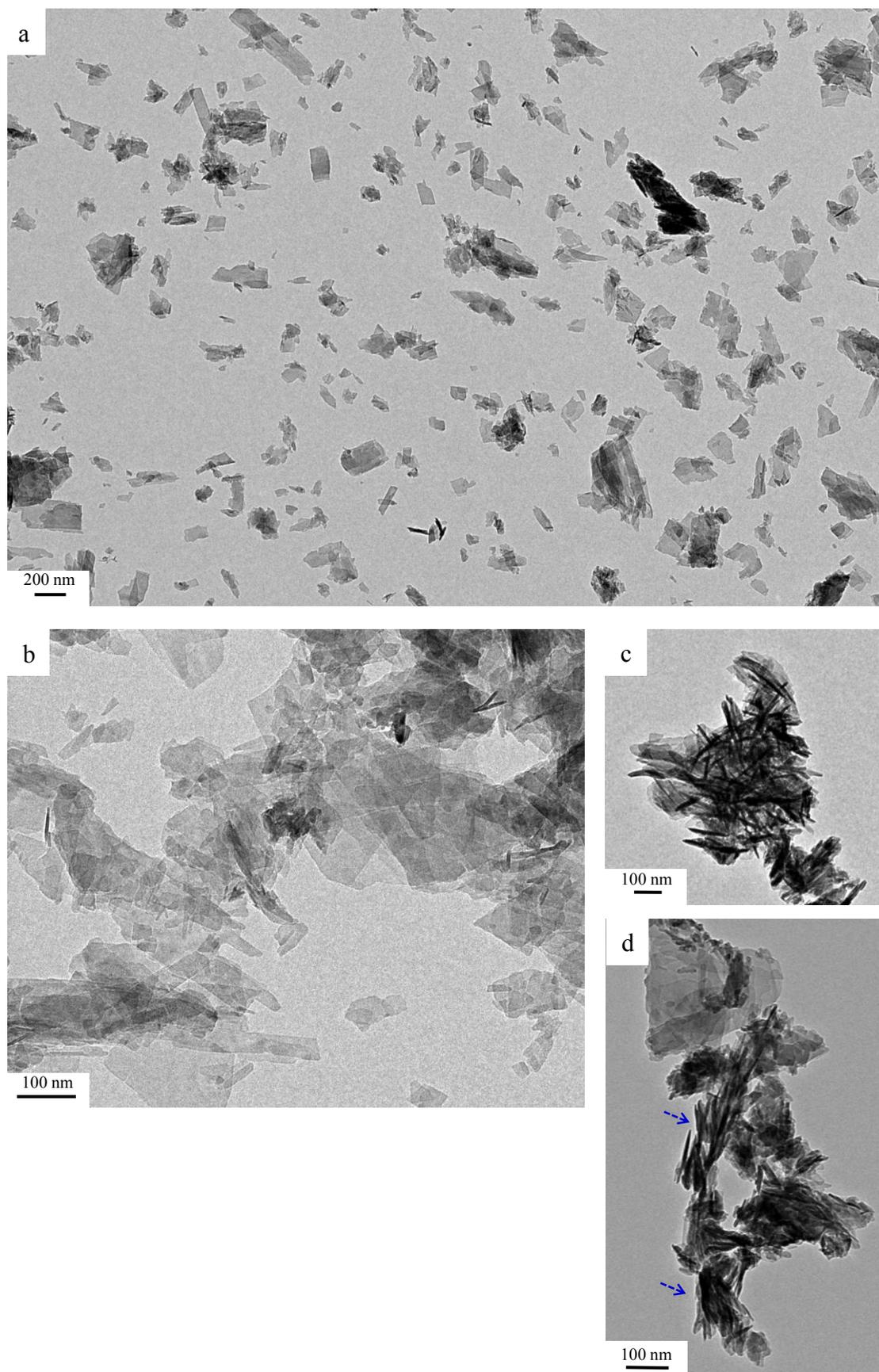


Figure 96. Clichés de MET de *CHA*, préalablement dispersé dans de l'éthanol absolu.

Malgré cela, plusieurs informations peuvent être extraites à partir de ces observations. Tout d'abord, les plaquettes de **CHA** semblent ici avoir singulièrement moins tendance à s'agglomérer les unes avec les autres. En effet, une observation réalisée à faible grandissement révèle la présence de nombreuses plaquettes individuelles (*cf.* **Figure 96-a**). Ce cas de figure n'est strictement jamais observé par cryo-MET lorsqu'elles sont dispersées dans l'eau. Cependant, quelques zones denses en plaquettes sont observées, mais les plaquettes y sont généralement orientées aléatoirement les unes par rapport aux autres (*cf.* les **Figures 96-b & 96-c**, où elles sont exposées respectivement, selon leurs larges faces, et selon leurs tranches). De plus, quelques zones où sont présentes un nombre restreint de plaquettes coalignées sont parfois observées (*cf.* flèches bleues, **Figure 96-d**).

Néanmoins, des observations par MET-tomographie de l'agglomérat de plaquettes de la **Figure 96-d** (avec une inclinaison de la grille de -62° à $+55^\circ$), ne révèlent pas d'organisation importante, régulière et à longue distance (*cf.* **Figure 97**). Seule une organisation locale à plus petite échelle est observée. **Ces observations suggèrent que la présence d'eau est essentielle afin que des agglomérats avec un nombre conséquent de plaquettes coalignées puissent se former.**

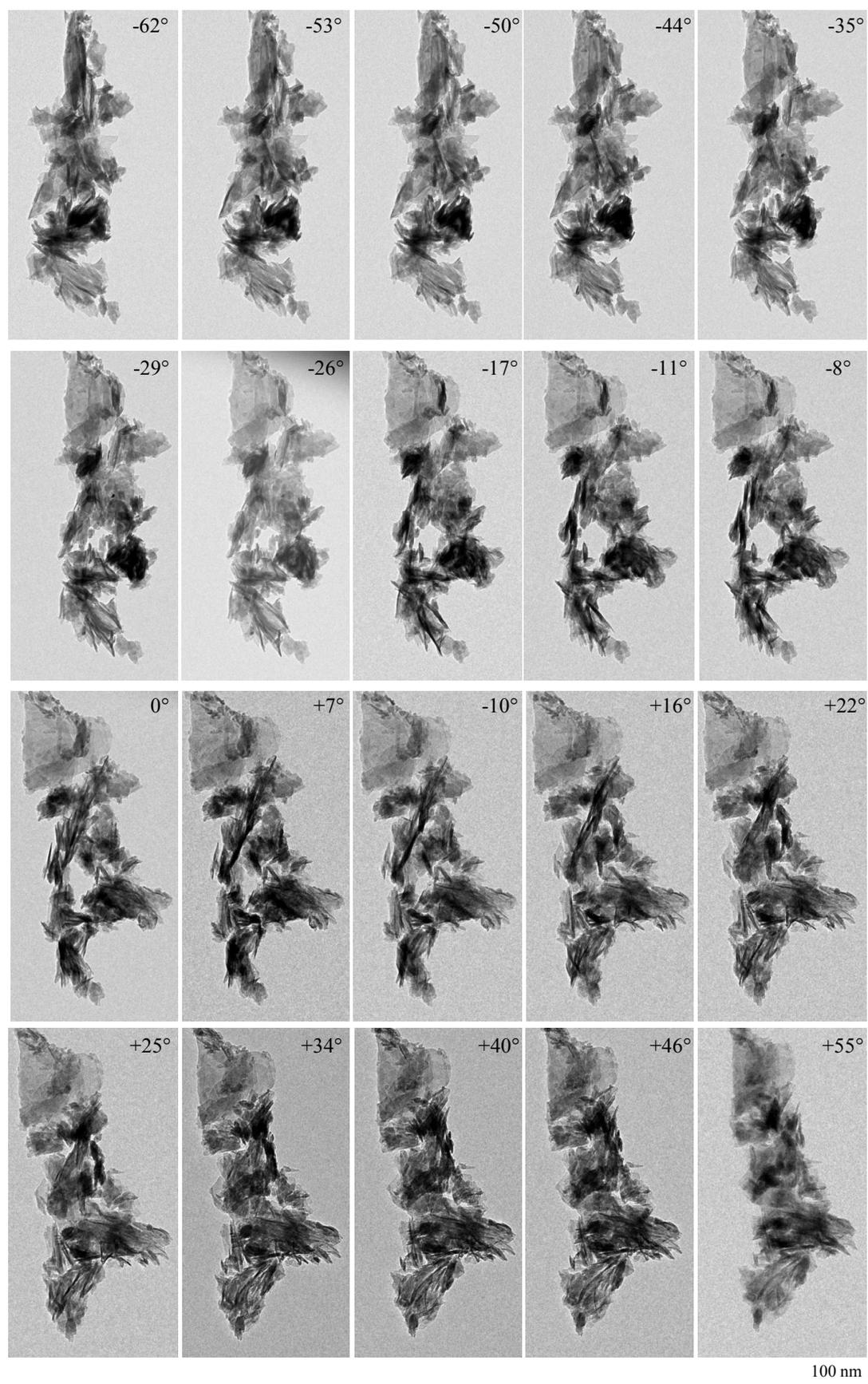


Figure 97. Clichés de MET-tomographie de l'agglomérat de plaquettes provenant de la **Figure 17-d** (échantillon **CHA**, préalablement dispersé dans de l'éthanol absolu).

IV-2-7) Organisation 3D des cristaux d'apatite osseuse

IV-2-7-a) Comparaison avec l'organisation de CHA et CHA-SBF dans l'eau

Un cliché MET d'une coupe ultra fine (~80 nm) d'un échantillon d'os avec sa matrice organique apparaît au sein de la **Figure 98-a**, coupe réalisée perpendiculairement aux larges faces (100) des plaquettes. Les plaquettes d'apatite osseuse y sont donc exposées selon leur tranche, et le cliché révèle leur organisation 3D (*i.e.* coalignement selon l'axe cristallographique *c*) sur plusieurs centaines de nanomètres (ici ~300 nm selon l'orientation longitudinale). En parallèle, des clichés réalisés par cryo-MET des suspensions des apatites biomimétiques CHA-SBF et CHA dans l'eau sont également présentés (*cf.* **Figures 98-b & 98-c**). Il s'avère que, aussi bien pour l'organisation 3D du minéral osseux *in vivo*, que pour l'organisation 3D des apatites biomimétiques *in vitro*, une étroite couche moins contrastée entre deux plaquettes adjacentes empilées latéralement est observée. Cette dernière a également été observée suite à des observations réalisées par MET-HR sur de l'os spongieux [38] ainsi que de la dentine [39], laquelle fut attribuée à la présence de collagène. De plus, il est à noter que certains agglomérats de plaquettes coalignées de **CHA-SBF** dans l'eau (dont la taille est similaire à celle des plaquettes d'apatite osseuse), présentent, tout comme le minéral osseux, une organisation 3D à longue distance (c'est-à-dire jusqu'à ~370 nm selon l'empilement longitudinal (double flèche rouge), et jusqu'à ~100 nm selon l'empilement latéral (double flèche bleue), *cf.* **Figure 99**).

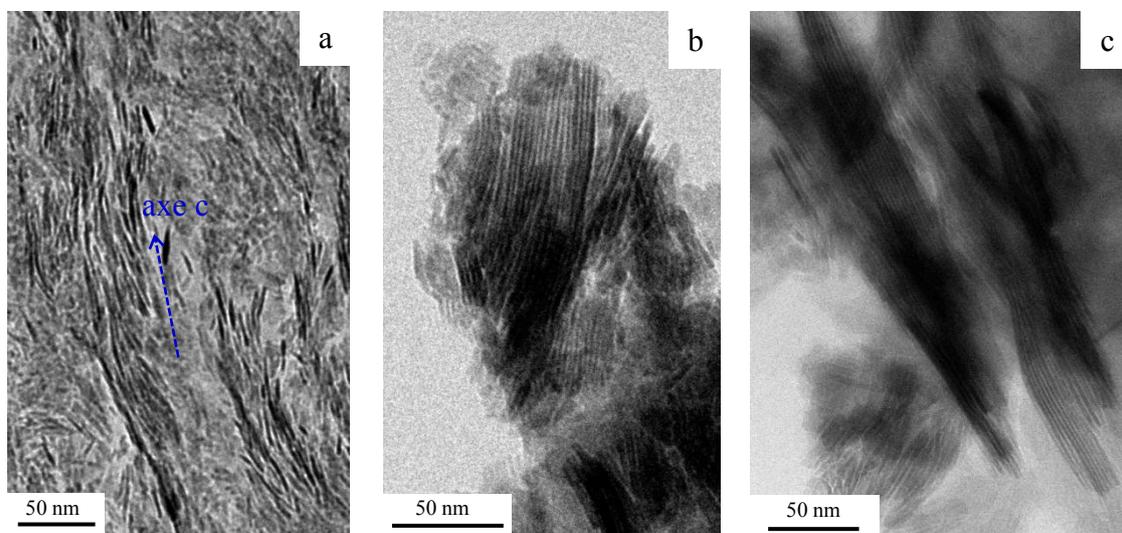


Figure 98. (a) Cliché de MET d'une coupe fine (~80 nm) d'un échantillon d'os frais « brut » ; (b) Cliché de cryo-MET d'une suspension de **CHA-SBF** dans l'eau ; (c) cliché de cryo-MET d'une suspension de **CHA** dans l'eau.

Il apparait donc, de manière inattendue, que l'organisation 3D des plaquettes d'apatite osseuse *in vivo* est similaire à celle observée *in vitro* pour des plaquettes d'apatite biomimétique dispersée dans l'eau. Alors que les plaquettes d'apatite osseuse sont imbriquées dans un échafaudage de matière organique (*i.e.* les fibrilles de collagène), celles des apatites biomimétiques se sont auto-assemblées dans une solution aqueuse dépourvue de tout additif organique. **Ces observations prouvent ainsi que l'eau, plus particulièrement l'eau fortement adsorbée à la surface des particules *via* le domaine non-apatitique hydrophile, est un acteur majeur de l'organisation 3D des plaquettes d'apatite osseuse.**

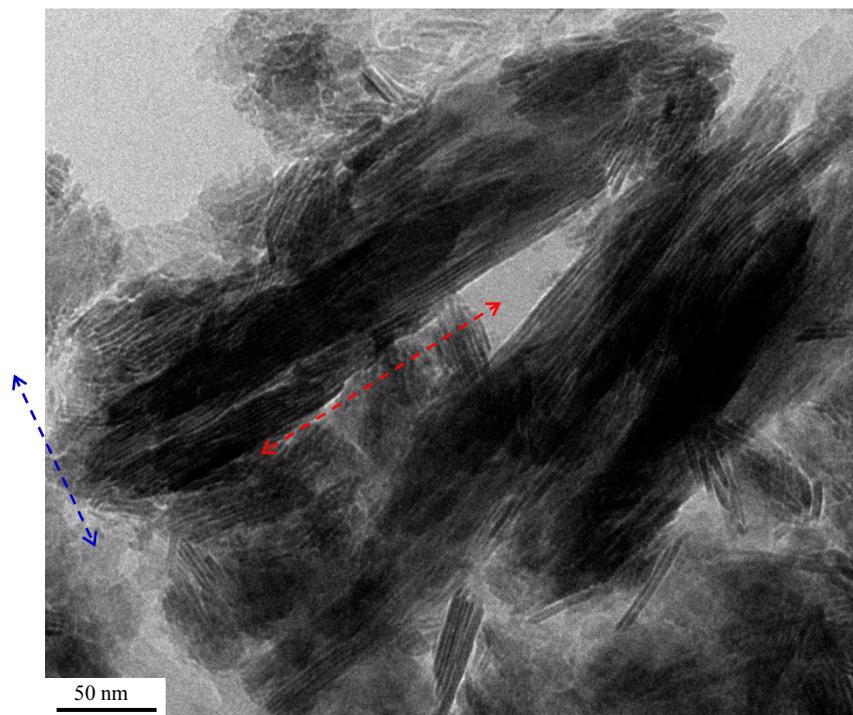


Figure 99. Cliché de cryo-MET d'une suspension de **CHA-SBF** dans l'eau. Des agglomérats formés par un grand nombre de plaquettes co-alignées sont observés, où l'empilement longitudinal (double flèche rouge) et l'empilement latéral (double flèche bleue) s'opèrent sur de longues distances (*i.e.* respectivement jusqu'à 370 nm, et jusqu'à ~150 nm).

IV-2-7-b) Etude d'un échantillon de minéral osseux extrait chimiquement

Dans le but de vérifier si un tel phénomène d'organisation 3D induite par des molécules d'eau peut se transposer *in vivo*, un échantillon de minéral osseux extrait chimiquement (**os déprotéiné**) fut également étudié. Dans l'optique de préserver son domaine non-apatitique hydrophile, la méthode d'extraction relativement douce élaborée par Steve Weiner et Paul Price fut une nouvelle fois utilisée (*cf.* méthode n°2 de l'article [40]).

- Etude des propriétés d'hydrophilie par RMN

La première étape a consisté à évaluer les conséquences de l'extraction chimique sur les propriétés d'hydrophilie du minéral. Pour ce faire, la comparaison entre le spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P de l'échantillon **d'os déprotéiné sec**, et celui du même échantillon une fois hydraté artificiellement (+ 10 μL d'eau osmosée ajoutée directement dans le rotor) est présentée au sein de la **Figure 100**.

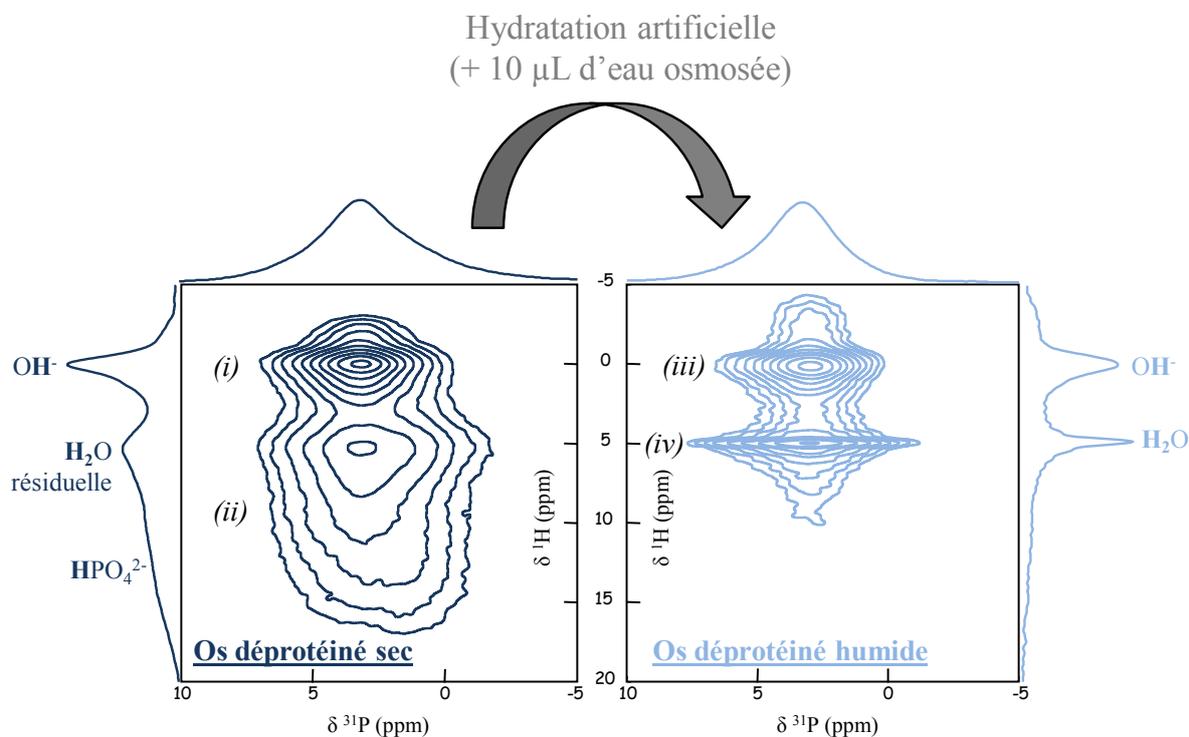


Figure 100. Comparaison entre le spectre 2D HetCor ^1H - ^{31}P d'un échantillon d'os déprotéiné sec ($v_{\text{rot}} = 14$ kHz, $t_{\text{CP}} = 1$ ms), et celui du **même échantillon hydraté** artificiellement suite à l'ajout de 10 μL d'eau osmosée directement dans le rotor ($v_{\text{rot}} = 8$ kHz, $t_{\text{CP}} = 10$ ms, $B_0 = 7,05$ Tesla). A travers l'observation de la tache de corrélation (iv), la carte 2D de l'échantillon d'os déprotéiné humide révèle la présence d'une quantité importante de molécules fortement adsorbées à sa surface.

Tout d'abord, la présence de la seconde tache de corrélation (ii) pour l'échantillon sec, confirme que le domaine non-apatitique de surface fut en partie conservé lors de l'extraction chimique du minéral. Ensuite, l'observation de l'intense tache de corrélation (iv) à $\delta(^1\text{H}) \sim 4,9$ ppm, révèle la présence de nombreuses molécules d'eau fortement adsorbée en surface de l'échantillon humide. Ainsi, les propriétés d'hydrophilie du minéral osseux ne semblent pas avoir été altérées lors de son extraction.

- *Observations par MET*

Des observations par MET standard des plaquettes d'apatite osseuse extraites révèlent que, lorsqu'elles sont préalablement dispersées dans de l'éthanol absolu, elles présentent une dispersion importante sur la grille (*cf.* **Figure 101-a**). Une observation à un plus fort grossissement confirme la morphologie plaquettaire des cristaux (*cf.* **Figure 101-b**).

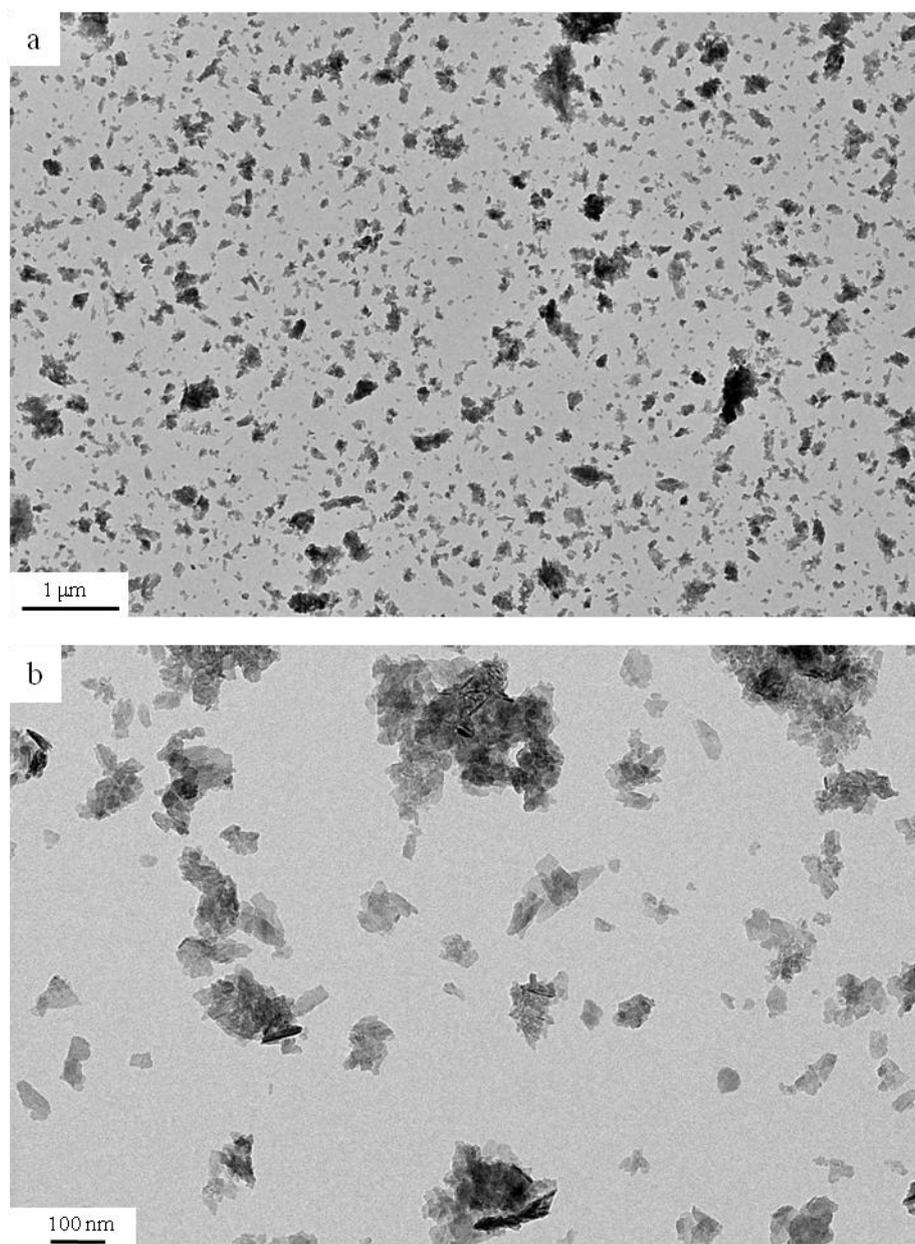


Figure 101. Clichés de MET d'un échantillon d'os *déprotéiné*, préalablement dispersé dans de l'éthanol absolu (**a**), et de l'eau (**b**).

- *Observations par cryo-MET*

Le comportement des plaquettes d'apatite osseuse extraites en milieu aqueux a finalement été observé par cryo-MET, avec une procédure de préparation identique à celle décrite pour **CHA** et **CHA-SBF**.

Tout d'abord, un cliché à faible grandissement laisse apparaître quelques agglomérats de plaquettes (*cf.* **Figure 102**).

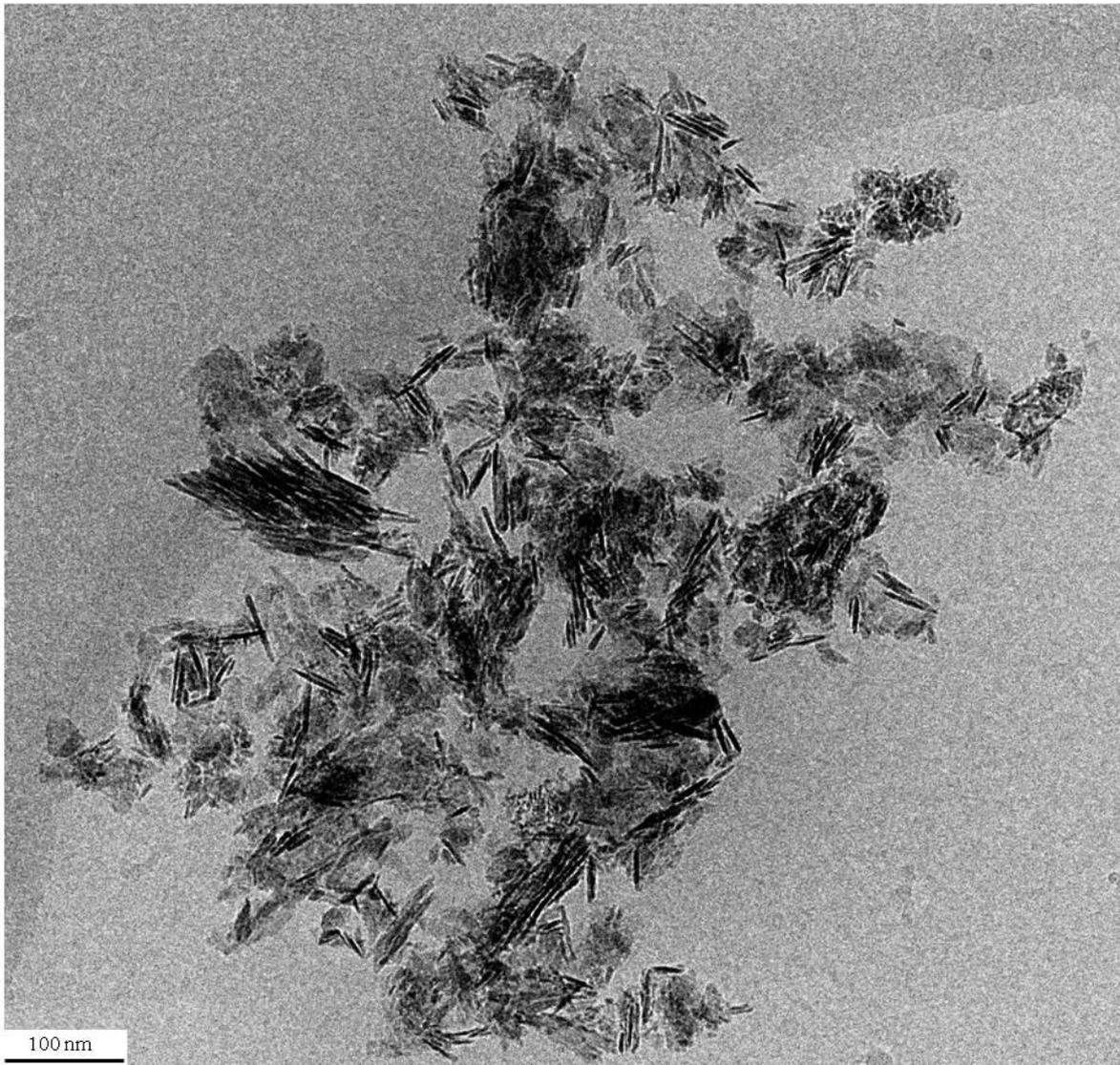


Figure 102. Cliché de cryo-MET d'une suspension dans l'eau d'un échantillon d'os déprotéiné.

Ensuite, les clichés obtenus à plus fort grossissement révèlent la présence de quelques agglomérats de plaquettes co-alignées (d'une épaisseur de $\sim 2,5-3,6$ nm, cf. **Figure 103**), lesquels rappellent fortement ceux observés pour **CHA** et **CHA-SBF** (cf. **Figures 80 & 81**). Malgré le retrait des protéines, une zone moins contrastée entre deux plaquettes empilées latéralement est toujours observée, et possède une épaisseur d'environ $1,3 \pm 0,2$ nm. Néanmoins, la taille de agglomérats semble légèrement plus petite, jusqu'à ~ 250 nm en ce qui concerne l'empilement longitudinal, et jusqu'à ~ 80 nm pour l'empilement latéral.

Cependant, il est difficile d'exclure ici la présence de fragments non-dispersés provenant du tissu osseux originel. Par ailleurs, la présence de matière organique résiduelle (estimée à $\sim 10-15$ % en masse par ATG), pourrait limiter le degré de liberté des plaquettes, et ainsi contrecarrer leur aggrégation. Enfin, le domaine non-apatitique de certaines particules pourrait avoir été partiellement dissous lors du retrait des protéines, bien que l'expérience HetCor $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ ait révélé qu'une grande proportion de ce dernier était conservée. Néanmoins, une procédure permettant une élimination totale de la matière organique, tout en conservant intact le domaine non-apatitique, n'a jamais été proposée à ce jour.

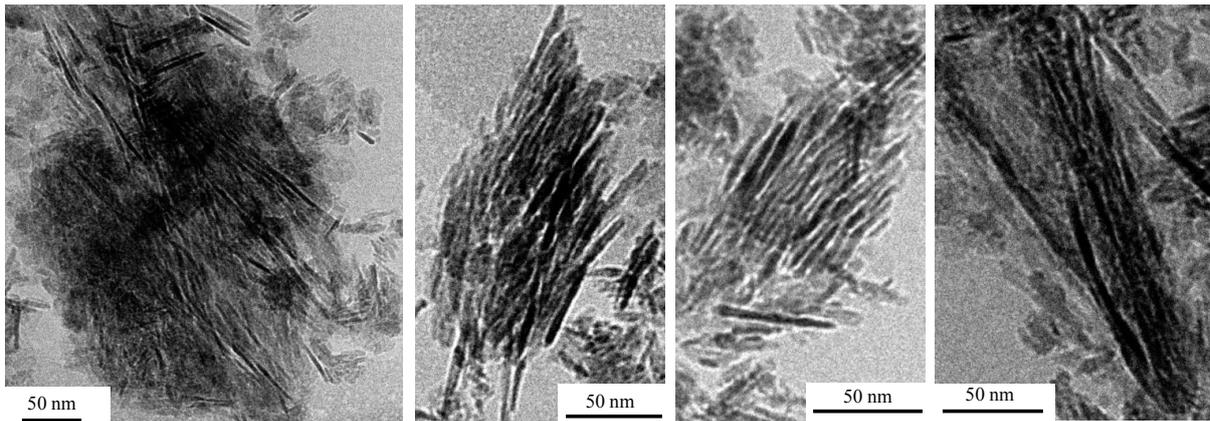


Figure 103. Clichés de cryo-MET d'une suspension d'un échantillon d'os déprotéine dans l'eau, qui révèlent la présence d'agglomérats de plaquettes coalignées.

- *Analyses par WAXD*

Pour compléter l'étude, les diffractogrammes WAXD de l'échantillon d'os déprotéiné sec et en suspension dans l'eau ont été acquis et comparés (cf. **Figure 104**). L'intensité de la raie 002 à $2\theta \sim 25,9^\circ$ n'est pas influencée par la présence d'eau. Ainsi, les agglomérats organisés observés en cryo-MET semblent de taille trop petite, et surtout en

nombre trop restreint, pour qu'une orientation globale des plaquettes soit observée en WAXD. Une étude par rayonnement synchrotron pourrait être pertinente à ce stade afin de sonder d'éventuels plus petits agrégats.

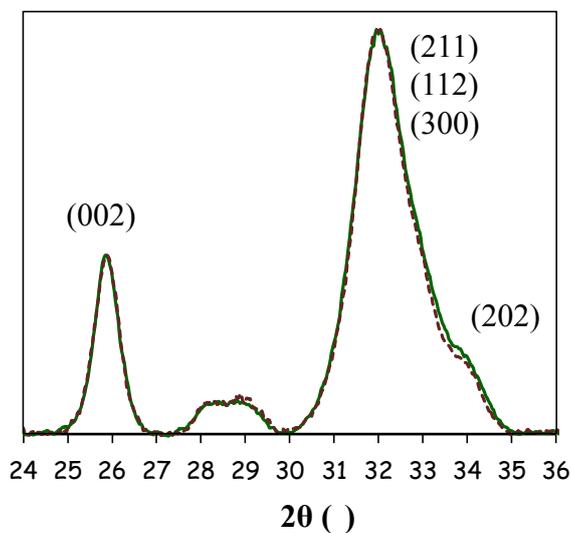


Figure 104. Diffractogramme WAXD 1D de la poudre sèche (trait vert) et mouillée (traits pointillés bordeaux) d'un échantillon d'os déprotéiné.

IV-3 / Mécanisme de formation des agglomérats orientés de plaquettes

Nous avons également essayé d'appréhender le mécanisme par lequel les plaquettes d'apatite (osseuse et biomimétique) s'agglomèrent les unes avec les autres de façon orientées pour conduire à cet assemblage 3D. Dans cette optique, afin d'être certain que le domaine non-apatitique en surface des particules n'ait subi aucune altération, les apatites biomimétiques furent utilisées. Cependant, alors que ces agglomérats orientés sont naturellement observés suite aux processus de biominéralisation, des structures rayonnantes rappelant la forme d'une fleur (des sphérolites) sont généralement observées suite à une synthèse en laboratoire (*cf.* **Figure 105**).

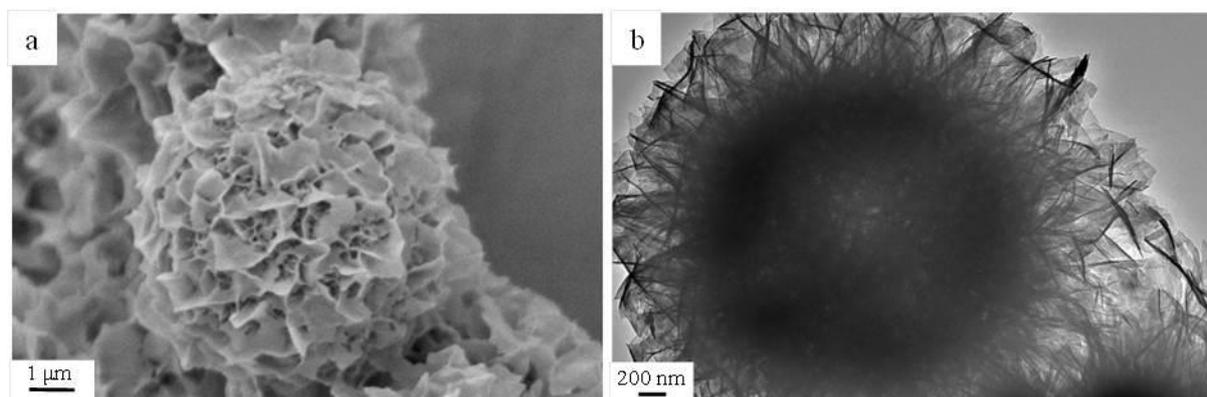


Figure 105. Agglomérat de plaquettes de *CHA* (sous la forme d'une sphérolite), observé en *MEB* (**a**) et en *MET* (**b**).

Dans le but de déterminer si les plaquettes de *CHA* adoptaient leur orientation commune lors de la formation des sphérolites, des observations par ultramicrotomie *MET* ont été réalisées. Ces sphérolites étant relativement fragiles, aucune étape de centrifugation ni de broyage ne leur a été infligée en fin de synthèse, mais seulement un séchage modéré à 37°C pendant plusieurs jours. Une fois déshydratées, elles ont été incluses dans un bloc de résine, lequel fut découpé en sections très fines (~70-80 nm) à l'aide d'un ultramicrotome. Enfin, ces coupes microtomiques furent déposées sur des grilles de cuivre (recouvertes d'un film de carbone) pour leur observation par *MET*.

Ainsi, un cliché d'ensemble d'une sphérolite d'environ 3,7 μm de diamètre apparaît au sein de la **Figure 106-a**. Un cliché réalisé à plus fort grandissement du cœur de cette sphérolite permet de se rendre compte qu'il semble moins dense en plaquettes (*cf.* **Figure 106-b**). Les clichés des **Figures 106-c & 106-d** correspondent respectivement, au

rectangle bleu et au rectangle orange de la **Figure 106-a**. Les zones plus contrastées correspondent à des plaquettes exposées selon leur tranche, où elles semblent adopter une orientation radiale en direction de la surface de la sphérolite (*cf.* flèches rouges). Des zones présentant 3 ou 4 plaquettes coalignées sont parfois observées, mais aucune n'implique un nombre conséquent de plaquettes comme ce fut le cas lors des observations réalisées par cryo-MET (*cf.* **Figure 80**). Ces résultats suggèrent que l'organisation des plaquettes de **CHA** n'est pas une rémanence de leur processus de précipitation. Au contraire, cela tend à prouver qu'elles possèdent une véritable capacité intrinsèque à s'organiser lorsqu'elles se trouvent en milieu aqueux.

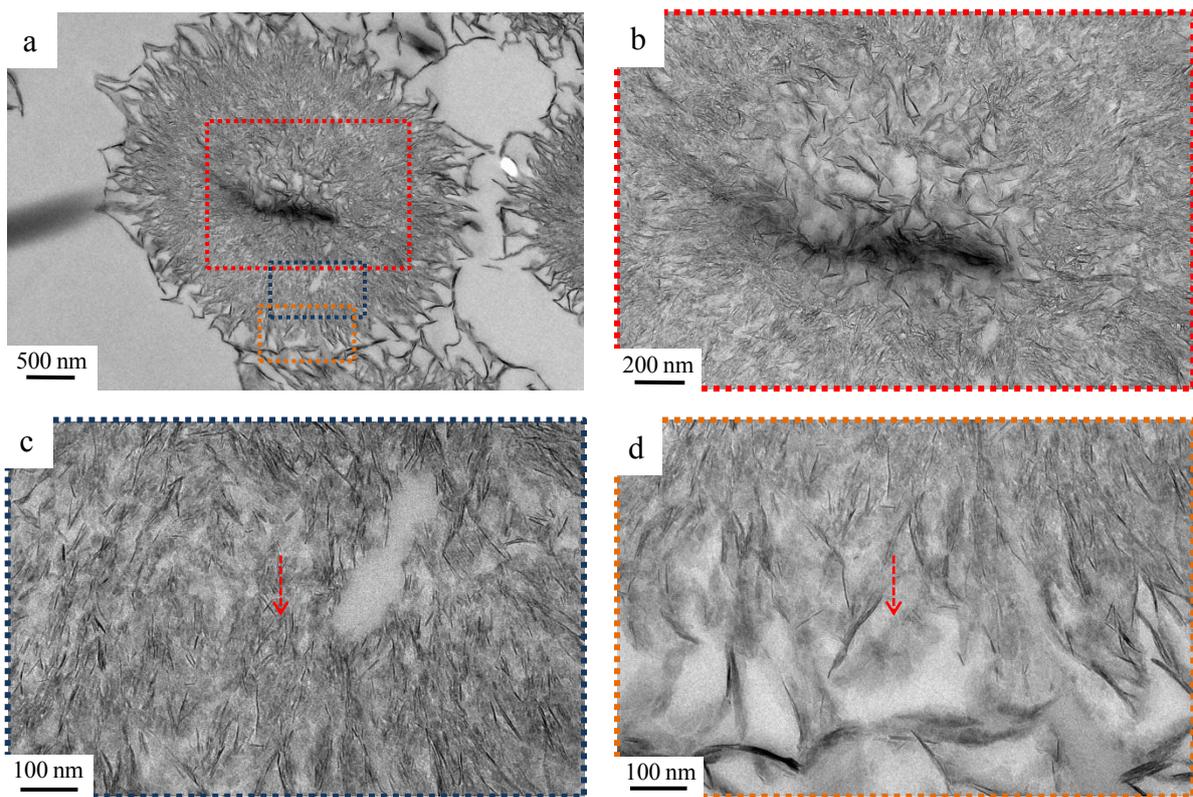


Figure 106. Clichés d'ultramicrotomie MET d'une sphérolite formée d'un agglomérat de plaquettes de **CHA**, où (b), (c), et (d) correspondent respectivement, au rectangle rouge, au rectangle bleu et au rectangle orange de (a).

Afin de décrire la nature de l'interface minéral-minéral, certaines propriétés physicochimiques de surface des différentes apatites de synthèse (**HA**, **CHA**, **CHA-SBF** et **CHA-200**) en solution ont été étudiées : (i) la charge globale des particules (au plan de glissement), à l'aide de mesures du potentiel ζ ; et (ii) les propriétés amphotériques *via* la mesure de l'évolution du pH. En pratique, la poudre d'apatite fut d'abord dispersée dans de l'eau osmosée (pH \sim 5,5), à une concentration de 0,02 % en masse. Le mélange ainsi formé fut

inséré dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Ensuite, l'évolution du potentiel ζ en surface des particules, ainsi que l'évolution du pH de la solution, ont été suivis au cours du temps à 20, 40 et 120 minutes (à compter du moment où les échantillons furent immergés dans l'eau).

échantillon	potentiel ζ (mV)
HA	$-2,5 \pm 0,6$
CHA	$5,0 \pm 0,5$
CHA-SBF	$-1,6 \pm 0,9$
CHA-200	$3,8 \pm 0,3$

Tableau 8. Valeur du potentiel ζ en surface des particules de **HA** ($pH \sim 6,5$), et des particules de **CHA**, **CHA-SBF** et **CHA-200** ($pH \sim 7$ à 8).

La caractéristique la plus notable est le fait que la charge de surface mesurée soit très faible pour tous les échantillons (*cf.* **Tableau 8**), laquelle n'évolue que très peu au cours du temps. Ces observations indiquent que le potentiel au plan de glissement du solvant est proche de celui des molécules d'eau libres, ce qui exclut tout mécanisme d'auto-assemblage basé sur des interactions électrostatiques entre les particules d'apatite (pour tous les échantillons).

La variation du pH en fonction du temps révèle l'existence d'échanges ioniques entre les particules d'apatite biomimétique et l'eau (*cf.* **Figure 107**), où les ions HPO_4^{2-} et CO_3^{2-} seraient principalement concernés [41], [42]. En effet, pour les 3 échantillons où un domaine non-apatitique de surface est présent (**CHA**, **CHA-SBF**, et **CHA-200** dans une moindre mesure), le pH passe instantanément d'une valeur de $\sim 5,5$ (le pH de l'eau osmosée) à une valeur proche de 8, puis évolue progressivement après 120 min vers une valeur proche du pH physiologique $\sim 7,4 \pm 0,2$. Un tel pouvoir tampon des particules d'apatite en solution est souvent relaté dans la littérature, et ceci sur une large gamme de pH allant de ~ 4 à ~ 10 [43]–[45]. Par ailleurs, cet important échange ionique entre la surface des particules d'apatite et la solution, allié au phénomène de maturation du domaine non-apatitique, rendent délicate la mesure de la charge de surface des particules à l'aide de leur titration chimique. D'un autre côté, pour la suspension aqueuse de **HA** où aucun domaine non-apatitique de surface n'est présent, aucune évolution du pH n'est observée, lequel se stabilise vers une valeur de 6,5. Ces résultats suggèrent que le domaine non-apatitique de surface manifeste des propriétés

amphotériques permettant de réguler le pH de la solution dans laquelle il se trouve vers une valeur proche du pH physiologique (*i.e.* $\sim 7,4$). Par ailleurs, un tel pH est parfois rapporté comme étant le point isoélectrique de certaines apatites de synthèse [43], [45].

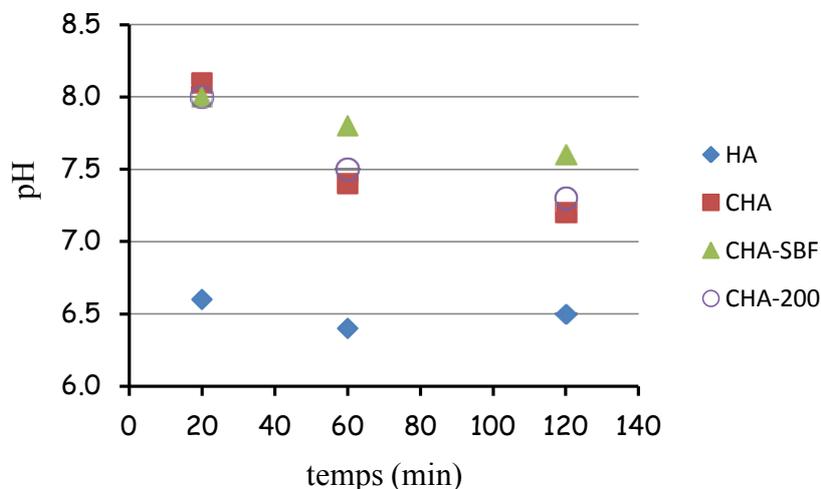


Figure 107. Evolution du pH au cours du temps des suspensions aqueuses de *HA*, *CHA*, *CHA-SBF* et *CHA-200* (à une concentration de $\sim 0,02$ % en masse).

Ainsi, l'absence conjuguée de fortes forces électrostatiques entre les plaquettes d'apatite et de tout adjuvant organique qui pourrait permettre une stabilisation stérique, exclut deux des principaux mécanismes de stabilisation colloïdale (*i.e.* électrostatique et stérique) qui pourraient expliquer le degré d'organisation observé [37]. D'un autre côté, notre étude a confirmé l'existence d'une coquille d'hydratation rigide en surface des particules d'apatite en milieux aqueux. De cette manière, il est envisageable que l'attraction entre deux plaquettes d'apatite adjacentes implique les molécules d'eau de leur coquille d'hydratation respective, à travers : (i) des forces de van der Waals ; et (ii) un réseau coopératif de liaisons H. Un même mécanisme d'attraction par le biais de molécules d'eau a été proposé par le passé seulement pour l'adhésion entre la matrice inorganique et la matrice organique [26].

Cependant, si un tel mécanisme se vérifie, il serait attendu que l'empilement des plaquettes se fasse de sorte qu'elles partagent ensemble la plus grande surface possible, conduisant ainsi à un empilement principalement latéral (*i.e.* avec leur larges faces (100) parallèles les unes aux autres). Un tel empilement latéral est généralement observé en cryo-MET, où les agglomérats de **CHA**, **CHA-SBF** et du **minéral osseux extrait chimiquement** peuvent présenter jusqu'à ~ 20 plaquettes empilées latéralement (*cf.* **Figures 81, 82 & 99**).

Ceci est néanmoins différent lors des analyses WAXD des suspensions de **CHA** et **CHA-SBF** dans l'eau, où un empilement principalement longitudinal est observé (cf. **Figure 82**). L'origine de cette divergence n'est pas claire, mais rappelons qu'il s'agit de deux dispositifs différents (l'un sur une grille et l'autre au sein d'un capillaire).

Par ailleurs, ceci peut être mis en perspective avec le fait qu'il est difficile de discerner la jonction entre deux plaquettes adjacentes selon l'empilement longitudinal (où aucune zone moins contrastée n'est observée). Une telle observation est très inattendue du fait de l'irrégularité importante de la morphologie des plaquettes, et un potentiel effet d'optique dû à une exposition particulière des agglomérats n'est pas à exclure. Néanmoins, si une telle configuration s'avèrerait authentique, cela voudrait dire que la jonction entre deux plaquettes adjacentes se fait *via* un strict appariement de leur face cristallographique (001) respective, rappelant un phénomène d'attachement orienté. L'existence d'un tel phénomène d'attachement orienté n'a pour l'instant jamais été avérée lors de la biominéralisation d'une quelconque espèce animale. Néanmoins, il a été décrit *in vitro* pour des superstructures cristallines de CaCO_3 qui sont assemblées par un attachement orienté 3D de nanoparticules de vaterite. A la différence de notre système, celles-ci sont bien cristallisées en surface et l'appariement cristallographique se fait *via* des ponts ioniques (NH_4^+) [46].

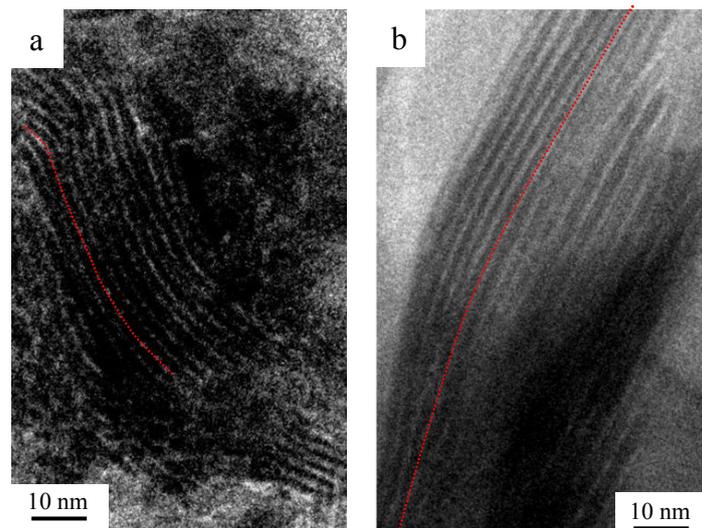


Figure 108. Clichés de cryo-MET d'une suspension dans l'eau de : (a) **CHA-SBF** ; (b) **CHA**. Ces derniers révèlent la présence d'agglomérats de plaquettes où l'empilement longitudinal s'effectue de façon légèrement courbé (cf. lignes pointillés rouges).

Des plus, il arrive également que l'empilement longitudinal des plaquettes ne se fasse pas de façon rectiligne, mais au contraire de façon légèrement courbé (*cf.* lignes pointillées rouges, **Figure 108**), rappelant cette fois-ci un phénomène d'attachement orienté imparfait [47]. De telles observations pourrait indiquer qu'ici, le domaine non-apatitique ne se développe pas sur la face (001) des cristaux d'apatite. Néanmoins, une étude à plus haute résolution serait pertinente pour confirmer cette supposition. De nombreux efforts restent ainsi à fournir dans le but d'obtenir une meilleure connaissance du mécanisme d'agglomération orientée des plaquettes d'apatite. Dans cette optique, des observations par cryo-tomographie MET, ainsi que l'observation de leur formation *in situ* par MET-HR à l'aide d'un porte objet liquide [48], semblent particulièrement prometteuses.

IV-4 / Conclusion

Les observations de cryo-MET et les analyses WAXD ont révélé une organisation obtenue par auto-assemblage à longue distance des cristaux d'apatite biomimétique (avec leurs larges faces (100) parallèles, et un co-alignement de leurs axes cristallographiques c), sous 3 conditions : (i) la présence d'eau ; (ii) la présence d'un domaine non-apatitique hydrophile en surface des cristaux; et (iii) une morphologie des cristaux sous forme de plaquette (de taille nanométrique).

Ces plaquettes d'apatite biomimétique forment ainsi des structures organisées en 3D, lesquelles sont similaires à celles observées pour les plaquettes d'apatite osseuse *in vivo* (au contact des protéines non-collagéniques, et confinées au sein des fibrilles de collagène). Des structures organisées de plus petites tailles ont également été observées lors de la dispersion dans l'eau de plaquettes d'apatite osseuse extraites chimiquement. **En définitive, ces résultats suggèrent de manière inattendue que, l'eau, une fois fortement adsorbée en surface du minéral du fait de la présence du domaine non-apatitique, favorise l'agglomération ainsi que l'organisation locale des plaquettes d'apatite osseuse *in vivo*.** C'est la toute première fois qu'un tel rôle structurant est attribué aux molécules d'eau lors de la biominéralisation osseuse, rôle auparavant attribué seulement aux biomolécules (collagène, PNCs...). Un tel comportement est particulièrement adapté localement lorsque les plaquettes d'apatite ne sont pas directement en contact avec la surface des fibrilles de collagène, comme à l'intérieur des zones de gap, ou à l'intérieur des espaces extrafibrillaires de la MEC où les fibrilles ne sont pas co-alignées. Il est intéressant de remarquer qu'*in vivo* la trame organique permet une organisation plus périodique de ces plaquettes. Cette dernière pourrait être aussi expliquée par une polydispersité moins importante de la taille des plaquettes.

Les résultats de cette thèse font ainsi écho à plusieurs études récentes remettant directement en cause l'obligation de biomolécules spécifiques pour favoriser l'organisation 3D des cristaux d'apatite. C'est notamment le cas d'une étude réalisée par Yan Wang *et al.*, où une organisation 3D des cristaux fut observée en absence de tout additif organique autre que le collagène, en utilisant à la place une solution réactionnelle avec des concentrations en précurseurs ioniques largement supérieures à celles rencontrées *in vivo* [49]. D'autres études ont montré qu'une organisation 3D des cristaux d'apatite était possible en milieu inerte, c'est-

à-dire lorsque leur croissance s'effectuait à l'intérieur de pores cylindriques de 25 à 300 nm de diamètre (recouverts d'alumine) [50], [51].

Par ailleurs, il est connu que les propriétés mécaniques de l'os, notamment sa résistance aux fractures, résultent en grande partie de la façon avec laquelle les plaquettes d'apatite sont co-alignées les unes avec les autres [52], [53]. Puisque nous avons montré que ce co-alignement ainsi que l'adhésion entre les plaquettes impliquent les molécules d'eau interfaciales, alors la perte de ces dernières altérerait théoriquement les propriétés mécaniques de l'os. Une telle conclusion est à mettre en perspective avec les études montrant la diminution des propriétés mécanique de l'os suite à sa déshydratation [19]–[26], notamment celles qui proposent que la perte de l'eau associée au minéral en diminuerait la résistance à la traction ainsi que la dureté [25]. Enfin, le fait qu'une couche minérale désordonnée se trouve en surface de particules au sein d'autres biomatériaux calcifiés (telles les plaquettes d'aragonite au sein de la nacre [54]), pourrait permettre de comprendre l'amélioration substantielle des propriétés mécaniques de divers matériaux composites naturels. Ceci est particulièrement significatif pour ceux qui contiennent une très faible proportion en composés organiques (*i.e.* ~3 % en masse seulement dans la nacre). Enfin, nos résultats suggèrent que d'autres composants pourraient jouer un rôle aux interfaces plus important que prévu comme récemment montré pour les ions calcium en interaction avec le collagène non fibrillé [55]. Les interfaces organo-minérales des tissus minéralisés restent des objets d'étude très complexe.

Références Bibliographiques

- [1] S. Weiner et H. D. Wagner, « The material bone: structure-mechanical function relations », *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, n° 1, p. 271–298, 1998.
- [2] N. Reznikov, R. Shahar, et S. Weiner, « Bone hierarchical structure in three dimensions », *Acta Biomater.*, vol. 10, n° 9, p. 3815–3826, sept. 2014.
- [3] G. He, T. Dahl, A. Veis, et A. George, « Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1 », *Nat. Mater.*, vol. 2, n° 8, p. 552–558, août 2003.
- [4] Y.-Y. Hu, A. Rawal, et K. Schmidt-Rohr, « Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 52, p. 22425–22429, déc. 2010.
- [5] C. Jaeger, N. S. Groom, E. A. Bowe, A. Horner, M. E. Davies, R. C. Murray, et M. J. Duer, « Investigation of the Nature of the Protein–Mineral Interface in Bone by Solid-State NMR », *Chem. Mater.*, vol. 17, n° 12, p. 3059–3061, juin 2005.
- [6] E. R. Wise, S. Maltsev, M. E. Davies, M. J. Duer, C. Jaeger, N. Loveridge, R. C. Murray, et D. G. Reid, « The Organic–Mineral Interface in Bone Is Predominantly Polysaccharide », *Chem. Mater.*, vol. 19, n° 21, p. 5055–5057, oct. 2007.
- [7] R. K. Rai et N. Sinha, « Dehydration-Induced Structural Changes in the Collagen–Hydroxyapatite Interface in Bone by High-Resolution Solid-State NMR Spectroscopy », *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, n° 29, p. 14219–14227, juill. 2011.
- [8] E. Beniash, A. S. Deshpande, P. A. Fang, N. S. Lieb, X. Zhang, et C. S. Sfeir, « Possible role of DMP1 in dentin mineralization », *J. Struct. Biol.*, vol. 174, n° 1, p. 100–106, avr. 2011.
- [9] S. S. Jee, R. K. Kasinath, E. DiMasi, Y.-Y. Kim, et L. Gower, « Oriented hydroxyapatite in turkey tendon mineralized via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process », *CrystEngComm*, vol. 13, n° 6, p. 2077, 2011.
- [10] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, et L. B. Gower, « Bone structure and formation: A new perspective », *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, vol. 58, n° 3–5, p. 77–116, nov. 2007.
- [11] A. S. Deshpande et E. Beniash, « Bioinspired Synthesis of Mineralized Collagen Fibrils », *Cryst. Growth Des.*, vol. 8, n° 8, p. 3084–3090, août 2008.
- [12] W. J. Landis et F. H. Silver, « Mineral Deposition in the Extracellular Matrices of Vertebrate Tissues: Identification of Possible Apatite Nucleation Sites on Type I Collagen », *Cells Tissues Organs*, vol. 189, n° 1–4, p. 20–24, 2009.
- [13] W. F. Neuman et M. W. Neuman, *The Chemical Dynamics of Bone.*, University of Chicago Press, Chicago. 1958.
- [14] W. F. Neuman, T. Y. Toribara, et B. J. Mulryan, « The Surface Chemistry of Bone. VII. The Hydration Shell », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 75, n° 17, p. 4239–4242, 1953.
- [15] E. E. Wilson, A. Awonusi, M. D. Morris, D. H. Kohn, M. M. Tecklenburg, et L. W. Beck, « Highly ordered interstitial water observed in bone by nuclear magnetic resonance », *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 20, n° 4, p. 625–634, avr. 2005.
- [16] P. A. Timmins et J. C. Wall, « Bone water », *Calcif. Tissue Res.*, vol. 23, n° 1, p. 1–5, déc. 1977.
- [17] K. H. Mueller, A. Trias, et R. D. Ray, « Bone density and composition. Age-related and pathological changes in water and mineral content », *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 48, n° 1, p. 140–148, janv. 1966.

- [18] J. S. Nyman, Q. Ni, D. P. Nicolella, et X. Wang, « Measurements of mobile and bound water by nuclear magnetic resonance correlate with mechanical properties of bone », *Bone*, vol. 42, n° 1, p. 193-199, janv. 2008.
- [19] E. D. Sedlin et C. Hirsch, « Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone », *Acta Orthop. Scand.*, vol. 37, n° 1, p. 29-48, 1966.
- [20] E. Garner, R. Lakes, T. Lee, C. Swan, et R. Brand, « Viscoelastic dissipation in compact bone: implications for stress-induced fluid flow in bone », *J. Biomech. Eng.*, vol. 122, n° 2, p. 166-172, avr. 2000.
- [21] W. T. Dempster et R. T. Liddicoat, « Compact bone as a non-isotropic material », *Am. J. Anat.*, vol. 91, n° 3, p. 331-362, nov. 1952.
- [22] F. G. Evans et M. Lebow, « Regional differences in some of the physical properties of the human femur », *J. Appl. Physiol.*, vol. 3, n° 9, p. 563-572, mars 1951.
- [23] J. W. Smith et R. Walmsley, « Factors affecting the elasticity of bone », *J. Anat.*, vol. 93, p. 503-523, oct. 1959.
- [24] H. Yamada et F. G. Evans, *Strength of biological materials*. Williams & Wilkins, 1970.
- [25] J. S. Nyman, A. Roy, X. Shen, R. L. Acuna, J. H. Tyler, et X. Wang, « The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone », *J. Biomech.*, vol. 39, n° 5, p. 931-938, janv. 2006.
- [26] J. Samuel, D. Sinha, J. C.-G. Zhao, et X. Wang, « Water residing in small ultrastructural spaces plays a critical role in the mechanical behavior of bone », *Bone*, vol. 59, p. 199-206, févr. 2014.
- [27] H. M. Frost, *The laws of bone structure*. C.C. Thomas, 1964.
- [28] S. A. V. Swanson et M. A. R. Freeman, « Is bone hydraulically strengthened? », *Med. Biol. Eng.*, vol. 4, n° 5, p. 433-438, sept. 1966.
- [29] McPherson, A. et Juhasz, L., « Biomechanics and related bioengineering topics », p. 181-186, New York: Pergamon-1964.
- [30] S. C. Cowin, « Bone poroelasticity », *J. Biomech.*, vol. 32, n° 3, p. 217-238, 1999.
- [31] C. Eichert, C. Drouet, H. Sfihi, C. Rey, et C. Combes, *Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization*. Biomaterials research advances, Nova Science Publishers, 2007.
- [32] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, et A. Barroug, « Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, n° 2, p. 198-205, mars 2007.
- [33] P.-Y. Chen, D. Toroian, P. A. Price, et J. McKittrick, « Minerals Form a Continuum Phase in Mature Cancellous Bone », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 88, n° 5, p. 351-361, mai 2011.
- [34] E. P. Katz et S. T. Li, « The intermolecular space of reconstituted collagen fibrils », *J. Mol. Biol.*, vol. 73, n° 3, p. 351-369, janv. 1973.
- [35] E. P. Katz et S.-T. Li, « Structure and function of bone collagen fibrils », *J. Mol. Biol.*, vol. 80, n° 1, p. 1-15, oct. 1973.
- [36] S. J. Eppell, W. Tong, J. L. Katz, L. Kuhn, et M. J. Glimcher, « Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy », *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, vol. 19, n° 6, p. 1027-1034, nov. 2001.
- [37] L. Onsager, « THE EFFECTS OF SHAPE ON THE INTERACTION OF COLLOIDAL PARTICLES », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 51, n° 4, p. 627-659, mai 1949.
- [38] X. Su, K. Sun, F. . Cui, et W. . Landis, « Organization of apatite crystals in human woven bone », *Bone*, vol. 32, n° 2, p. 150-162, févr. 2003.

- [39] E. Beniash, « Biominerals-hierarchical nanocomposites: the example of bone », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 3, n° 1, p. 47-69, janv. 2011.
- [40] S. Weiner et P. A. Price, « Disaggregation of bone into crystals », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 39, n° 6, p. 365-375, 1986.
- [41] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, et M. J. Glimcher, « Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo », *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 22, n° 4, p. 310-317, 2004.
- [42] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, et A. Barroug, « Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, n° 2, p. 198-205, mars 2007.
- [43] I. Smičiklas, S. Milonjić, P. Pfindt, et S. Raičević, « The point of zero charge and sorption of cadmium (II) and strontium (II) ions on synthetic hydroxyapatite », *Sep. Purif. Technol.*, vol. 18, n° 3, p. 185-194, mai 2000.
- [44] Kibby CL et Hall WK, « Surface properties of calcium phosphates », *Marcel Dekker Inc*, 1972.
- [45] I. S. Harding, N. Rashid, et K. A. Hing, « Surface charge and the effect of excess calcium ions on the hydroxyapatite surface », *Biomaterials*, vol. 26, n° 34, p. 6818-6826, déc. 2005.
- [46] N. Gehrke, H. Cölfen, N. Pinna, M. Antonietti, et N. Nassif, « Superstructures of Calcium Carbonate Crystals by Oriented Attachment », *Cryst. Growth Des.*, vol. 5, n° 4, p. 1317-1319, juill. 2005.
- [47] R. L. Penn, « Imperfect Oriented Attachment: Dislocation Generation in Defect-Free Nanocrystals », *Science*, vol. 281, n° 5379, p. 969-971, août 1998.
- [48] D. Li, M. H. Nielsen, J. R. I. Lee, C. Frandsen, J. F. Banfield, et J. J. De Yoreo, « Direction-Specific Interactions Control Crystal Growth by Oriented Attachment », *Science*, vol. 336, n° 6084, p. 1014-1018, mai 2012.
- [49] Y. Wang, T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, et N. Nassif, « The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite », *Nat. Mater.*, vol. 11, n° 8, p. 724-733, juill. 2012.
- [50] B. Cantaert, E. Beniash, et F. C. Meldrum, « Nanoscale Confinement Controls the Crystallization of Calcium Phosphate: Relevance to Bone Formation », *Chem. - Eur. J.*, vol. 19, n° 44, p. 14918-14924, oct. 2013.
- [51] B. Cantaert, E. Beniash, et F. C. Meldrum, « The role of poly(aspartic acid) in the precipitation of calcium phosphate in confinement », *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, n° 48, p. 6586, 2013.
- [52] R. O. Ritchie, M. J. Buehler, et P. Hansma, « Plasticity and toughness in bone », *Phys. Today*, vol. 62, n° 6, p. 41-47, juin 2009.
- [53] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, et P. Zioupos, « Mechanical properties and the hierarchical structure of bone », *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, n° 2, p. 92-102, mars 1998.
- [54] N. Nassif, N. Pinna, N. Gehrke, M. Antonietti, C. Jager, et H. Colfen, « Amorphous layer around aragonite platelets in nacre », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, n° 36, p. 12653-12655, sept. 2005.
- [55] G. E. Fantner, T. Hassenkam, J. H. Kindt, J. C. Weaver, H. Birkedal, L. Pechenik, J. A. Cutroni, G. A. G. Cidade, G. D. Stucky, D. E. Morse, et P. K. Hansma, « Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture », *Nat. Mater.*, vol. 4, n° 8, p. 612-616, août 2005.

Conclusion Générale

La toile de fond des travaux de cette thèse était l'étude de la surface du minéral osseux. L'originalité de ces derniers par rapport à la majorité de ceux rencontrés dans la littérature, réside dans l'utilisation d'un échantillon de tissu osseux frais et intact se trouvant dans son état d'hydratation naturel. Cette rigueur expérimentale s'est avérée bénéfique, puisqu'elle a permis d'identifier un grand nombre de molécules d'eau « rigides » fortement adsorbées à la surface du minéral osseux *in vivo*. Plus précisément, nous avons montré qu'un domaine minéral de surface très peu épais ($\sim 0,8$ nm) était à l'origine du fort caractère hydrophile du minéral osseux. Pour ce faire, nous avons réalisé une expérience RMN originale qui a permis de démontrer pour la toute première fois, pour un échantillon d'os « intact », l'existence d'une continuité spatiale entre ce domaine de surface (appelé domaine non apatitique), et le domaine apatitique cristallisé constituant le cœur des particules minérales du tissu osseux. Nous avons également montré que la plupart de ces molécules d'eau « rigides » étaient éliminées suite à une simple déshydratation de l'échantillon à température ambiante, mais que cette déshydratation n'altérait pas drastiquement la structure de ce domaine de surface. Des études réalisées dans des conditions humides artificielles sur des apatites biomimétiques, c'est-à-dire des analogues de synthèse des apatites biologiques, ont prouvé que ce domaine de surface était intrinsèquement hydrophile sans avoir besoin d'introduire certaines molécules organiques hydrophiles. De plus, une comparaison effectuée avec divers échantillons de phosphate de calcium dépourvus d'un tel domaine de surface (*i.e.* apatite stœchiométrique, brushite et monétite), a démontré le rôle essentiel joué par ce domaine non-apatitique dans la capacité du minéral à fortement adsorber des molécules d'eau à sa surface.

Nous avons également mis en lumière pour la toute première fois que ce domaine de surface possédait une structure chimique et un caractère hydrophile analogues à ceux d'un phosphate de calcium amorphe (ACP). Nous avons montré que ce domaine est riche en ions hydrogénophosphates HPO_4^{2-} au contraire du domaine apatitique. Enfin, l'analyse d'apatites biomimétiques qui ont été spécifiquement enrichies en ^{43}Ca et ^{13}C a confirmé l'existence d'ions Ca^{2+} au sein du domaine de surface, et a surtout fortement suggéré la présence d'ions carbonates CO_3^{2-} , non seulement dans le domaine apatitique cristallisé mais également dans ce domaine de surface non-apatitique.

L'ensemble de ces résultats issus principalement d'analyses par Résonance Magnétique Nucléaire à l'état solide, nous a permis de dresser un « portrait-robot » du

minéral osseux, lequel se présente sous la forme d'un cœur cristallisé de type apatitique et d'un domaine de surface qui présente des caractéristiques très distinctes du point de vue de sa composition et de ses propriétés d'adsorption. Ce domaine amorphe de surface est très hydrophile et nous avons été amenés à nous poser la question d'un potentiel rôle structural qu'il pouvait jouer *in vivo*. La possibilité qu'offre la cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET) d'observer des particules minérales en présence d'eau s'est révélée cruciale. En effet, ces observations ont révélé qu'il était possible d'organiser à longue distance des plaquettes d'apatites biomimétiques en présence d'eau. Des analyses par diffraction des rayons-X, toujours en présence d'eau, ont de plus montré que cette organisation se faisait avec un co-alignement des axes cristallographiques *c* des cristaux impliqués. Ces cristaux sous forme de plaquettes forment ainsi des structures organisées en 3D, lesquelles sont similaires à celles observées pour les plaquettes d'apatite osseuse *in vivo*, et ce sans avoir recours à aucun additif organique qui pourrait favoriser les interactions minéral-minéral entre plaquettes. Les molécules d'eau favorisent donc l'organisation locale des plaquettes d'apatite osseuse *in vivo*. C'est la toute première fois qu'un tel rôle structurant est attribué aux molécules d'eau lors de la biominéralisation osseuse, rôle auparavant attribué seulement à la composante organique du tissu (collagène, PNCs, polysaccharides...). Malgré tout, de nombreux efforts restent encore à fournir pour comprendre ce mécanisme d'agrégation orientée des plaquettes d'apatite.

De nombreuses questions restent en suspens concernant ce domaine amorphe de surface. Si nous avons identifié la nature des ions qui le composent, nous ne connaissons pas encore leur proportion relative. Des méthodes d'analyses élémentaires sensibles à la surface des matériaux telle la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) pourraient être envisagées, mais il est très difficile pour ce type de technique d'être précis sur une si faible épaisseur (moins de 1 nm). Il serait sans doute possible de poursuivre l'approche chimique présentée au chapitre IV, où un traitement des plaquettes par la soude pourrait permettre de dissoudre sélectivement la couche de surface. Une analyse par microscopie électronique en transmission couplée à de l'analyse dispersive en énergie (TEM-EDX) pourrait alors permettre d'obtenir des renseignements sur les rapports molaire des ions présents dans le cœur apatitique, et par déduction ceux dans le domaine non-apatitique.

De plus, si les phases de type ACP sont très réactives en milieu aqueux, la stabilité de ce domaine amorphe de surface en présence d'eau reste encore une énigme. Les études faites sur des analogues de synthèse dans des conditions humides artificielles excluent

toute stabilisation suite à l'adsorption de biomolécules en surface. Nous pensons que la stabilité du domaine non-apatitique du minéral osseux pourrait être liée au domaine apatitique sur lequel il « repose ». Une approche par modélisation moléculaire pourrait permettre d'expliquer cette stabilité. Pour cela, la construction d'un domaine non-apatitique sous forme de phosphate de calcium amorphe hydraté à l'aide des méthodes de la chimie quantique est nécessaire. Une telle approche a déjà été initiée au sein de notre laboratoire. Les données RMN spécifiques à ce domaine de surface (entre autres les déplacements chimiques ^1H , ^{31}P et ^{13}C des ions HPO_4^{2-} et CO_3^{2-}) que nous avons déterminés au cours de ce travail pourront servir de « marqueurs » expérimentaux, et une fois comparées aux données théoriques calculées, permettraient de valider un modèle structural de couche de phosphate de calcium amorphe. Cette approche a déjà été utilisée avec succès pour modéliser une surface de silice amorphe hydratée.

Nous avons démontré que la RMN était susceptible d'apporter un éclairage décisif sur certains processus de biominéralisation de l'os. Nous pensons que cette technique pourrait être pertinente pour étudier les premières étapes de formation du minéral osseux (nucléation et croissance). L'étude du minéral osseux effectué au cours de cette thèse concernait des échantillons prélevés sur des brebis âgées de 2 ans. Ainsi, l'étude du minéral en formation n'est pas envisageable à partir de ce modèle. Par contre, le poisson zèbre pourrait être un bon modèle pour suivre les premières étapes de biominéralisation, de par sa capacité à régénérer certains organes dont sa nageoire caudale après amputation. Ainsi, certaines équipes ont déjà montré qu'il était possible de suivre la minéralisation des arrêtes de la nageoire caudale par microscopie électronique. Une étude complémentaire par RMN pourrait s'avérer décisive dans l'étude de la nucléation et de la croissance du minéral osseux chez les vertébrés, dans le sens où elle pourrait confirmer ou infirmer le passage par un précurseur amorphe lors des premières étapes de nucléation.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes	242
I / Protocoles de synthèse	242
I-1) L'apatite stœchiométrique HA	242
I-2) L'apatite biomimétique CHA	242
I-3) L'apatite biomimétique CHA-SBF	244
I-4) L'apatite carbonatée CHA-aiguilles	245
I-5) L'apatite carbonaté CHA- ¹³ C	245
I-6) L'apatite carbonaté CHA- ⁴³ Ca	245
I-7) Le phosphate de calcium amorphe	246
I-8) La brushite	246
II / Extraction du minéral osseux	247
III / Retrait du bruit de fond des diffractogrammes WAXD 1D	248
IV / Appareils utilisés.....	249
Références bibliographiques	251

Matériels et méthodes

I / Protocoles de synthèse

I-1) L'apatite stœchiométrique HA

La synthèse de l'apatite stœchiométrique **HA** a été réalisée à partir du protocole proposé par Shinji Takemoto *et. al* [1]. Toute l'eau utilisée fut préalablement portée à ébullition et refroidie sous barbotage à l'azote. En pratique, 100 mL d'une solution aqueuse de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,3 M) pour laquelle le pH fut fixé à une valeur de 10 (à l'aide d'une solution aqueuse de NH_3 28-29 % en masse), est ajoutée à 100 mL d'une solution aqueuse de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M). Cet ajout s'effectue à température ambiante sous une légère agitation mécanique, à une vitesse constante de 3 mL / min à l'aide d'un titreur automatique (Titrand 808, Metrohm). Par ailleurs, cet ajout est réalisé sous une atmosphère d'azote afin d'éviter la solvatation de $\text{CO}_{2(\text{g})}$ atmosphérique au sein de la solution réactionnelle. Une fois l'ajout terminé, la solution réactionnelle est laissée sous agitation pendant une période de 24 heures. Ensuite, le précipité formé est récupéré par centrifugation à froid (20 min à 6000 tours/min), puis lavé à l'eau osmosée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit proche de celui de l'eau de lavage (habituellement, 4 lavages sont ainsi nécessaires). Enfin, le précipité est séché à l'étuve à 105°C pendant 48 heures.

I-2) L'apatite biomimétique CHA

La synthèse de l'apatite biomimétique **CHA** a été réalisée par une méthode de diffusion de vapeurs d'ammoniac. Cette méthode, au préalable exploitée pour la précipitation de la calcite (CaCO_3) [2], a été adaptée à la précipitation d'apatite par Nadine Nassif *et al.* [3].

En pratique, deux solutions aqueuses (de 20 mL chacune) contenant les précurseurs de l'apatite carbonatée (*i.e.* $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 110 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 33 mM, et NaHCO_3 33 mM) sont préparées. Leur pH est alors fixé à une valeur de 2,2 à l'aide d'une solution aqueuse de HCl (37 % en masse) ajoutée goutte à goutte. Ensuite, ces deux solutions aqueuses contenant les précurseurs de l'apatite carbonatée sont introduites dans deux flacons séparés, d'une hauteur de 5 cm. Ces flacons sont alors placés dans une enceinte hermétiquement fermée (*i.e.* un bœcher de 1 L recouvert de parafilm), en présence d'un

troisième flacon contenant 8 mL d'une solution aqueuse de NH_3 28-29 % en masse (cf. **Figure 109-a**). Avant la fermeture du bécher, ces 3 flacons sont recouverts d'une couche de parafilm, laquelle est percée de 6 trous à l'aide d'une aiguille afin de ralentir la diffusion gazeuse de l'ammoniac.

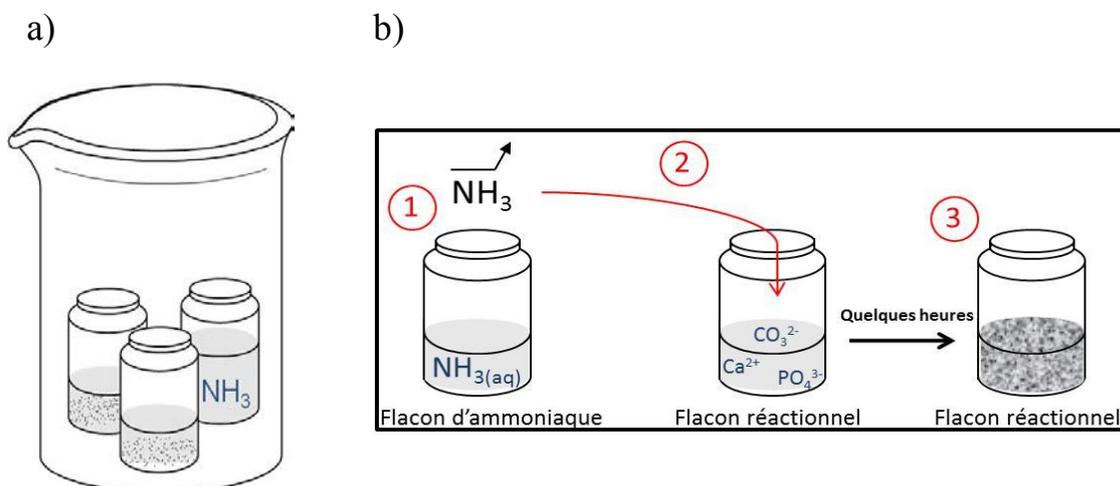


Figure 109. (a) Schéma de l'enceinte hermétique contenant les deux flacons réactionnels ainsi que le flacon d'ammoniaque. (b) Schéma représentant les trois étapes distinctes de la synthèse par diffusion de vapeurs d'ammoniaque.

Cette synthèse peut être décomposée en trois étapes distinctes (cf. **Figure 109-b**) :

- (1) les vapeurs de $\text{NH}_3(\text{g})$ provenant de la désolvatation de la solution aqueuse d'ammoniaque diffusent au sein de la chambre close, jusqu'à atteindre leur pression de vapeur saturante.
- (2) les vapeurs de $\text{NH}_3(\text{g})$ se solubilisent dans le milieu réactionnel y provoquant l'augmentation progressive du pH.
- (3) l'apatite précipite au bout de 2 heures environ.

Afin d'obtenir une diffusion gazeuse complète, le dispositif est ensuite laissé tel quel durant 6 jours. Au bout de ces 6 jours de diffusion (pH final ~ 10), le précipité est récupéré par centrifugation à froid (20 min à 6000 tours/min), puis lavé à l'eau osmosée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit proche de celui de l'eau de lavage (habituellement, 4 lavages sont nécessaires). Le solide obtenu est enfin séché dans une étuve à 37°C pour une durée de 7 jours.

I-3) L'apatite biomimétique CHA-SBF

L'apatite biomimétique **CHA-SBF** a été précipitée suite à la congélation, puis la décongélation d'une solution de SBF 1,5 (pour « Simulated Body Fluid »). Une solution de SBF est une solution synthétique qui mime la composition ionique du plasma sanguin (*cf.* **Tableau 9**). Ici, une solution de SBF 1,5 a été utilisée, c'est-à-dire une solution avec des concentrations en espèces ioniques 1,5 fois supérieures à celle du SBF standard.

Cette solution de SBF 1,5 a été préparée en suivant la procédure décrite par S.H. Rhee et al. [4], en dissolvant à 37°C les sels suivant (dans cet ordre) : NaCl (11.99 g) ; NaHCO₃ (0.529 g) ; KCl (0.335 g) ; K₂HPO₄.3H₂O (0.342 g) ; MgCl₂.6H₂O (0.457 g) ; CaCl₂ (0.416 g) ; et Na₂SO₄ (0.107 g) ; dans 1 L d'eau osmosée où le pH fut tamponné à 7,4 à l'aide de 1.2 g de tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (et quelques gouttes de HCl, 37 % en masse).

Cette solution de SBF 1,5 est dès lors congelée à -20°C pendant 12 heures. La solution est ensuite progressivement décongelée à température ambiante. Cette variation de la température conduit à la précipitation d'une phase solide. Le solide est récupéré par centrifugation à froid (20 min à 6000 tours/min), puis lavé à l'eau osmosée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit proche de celui de l'eau de lavage (habituellement, 4 lavages sont ainsi nécessaires). Le solide ainsi obtenu est enfin séché dans une étuve à 37°C pour une durée de 7 jours.

	Plasma sanguin	SBF	SBF 1.5
ion	C (mmol/L)	C (mmol/L)	C (mmol/L)
Na ⁺	142,0	142,0	213,0
K ⁺	5,0	5,0	7,5
Mg ²⁺	1,5	1,5	2,3
Ca ²⁺	2,5	2,5	3,8
Cl ⁻	103,0	147,8	221,7
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2	6,3
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0	1,5
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	0,8

Tableau 9. Concentrations des espèces ioniques majoritaires au sein du plasma sanguin, ainsi que celles au sein du SBF et du SBF 1,5.

I-4) L'apatite carbonatée CHA-aiguilles

La synthèse de l'apatite carbonatée **CHA-aiguilles** a été réalisée par la méthode de « diffusion de vapeurs d'ammoniac » [3]. Le protocole est identique à celui de **CHA**, à l'exception de la solution réactionnelle qui fut continuellement agitée lors des 6 jours de diffusion de vapeurs.

I-5) L'apatite carbonatée CHA-¹³C

La synthèse de l'apatite carbonatée **CHA-¹³C** a été réalisée par la méthode de « diffusion de vapeurs d'ammoniac » [3]. Le protocole est identique à celui de **CHA**, à l'exception du précurseur en ions carbonates utilisé (NaHCO_3), qui est enrichi à 100 % en ¹³C.

I-6) L'apatite carbonatée CHA-⁴³Ca

La synthèse de l'apatite carbonatée **CHA-⁴³Ca** a été réalisée par la méthode de « diffusion de vapeurs d'ammoniac » [3]. Cependant, CaCO_3 étant la seule source commerciale de ⁴³Ca disponible, quelques ajustements ont dû être réalisés. Ainsi, le précurseur en calcium CaCO_3 a été utilisé à la place de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ restant le précurseur en orthophosphates.

En pratique, 66 mg de CaCO_3 (enrichi à 65% en ⁴³Ca), ont été dissout dans 20 mL d'une solution d'eau osmosée. Dans le but d'extraire l'excédent d'ions CO_3^{2-} , le pH de cette solution est abaissé à 3 grâce à l'ajout de quelques gouttes d'une solution aqueuse de HCl (37 % en masse). Ensuite, un flux d'argon est inséré dans la solution pendant 90 minutes, évitant ainsi la précipitation de tout polymorphe de CaCO_3 . Par la suite, 54,5 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sont également dissous au sein de la solution, pour atteindre un ratio atomique Ca/P de 1,67. Le pH de la solution est alors ajusté à 2,2 à l'aide d'une solution aqueuse de HCl (37 % en masse) ajoutée goutte à goutte. La procédure qui suit est alors identique à celle décrite dans le cas de **CHA**.

I-7) Le phosphate de calcium amorphe

La synthèse du phosphate de calcium amorphe (**ACP**) a été réalisée par la méthode de J.C. Heughebaert [5]. En pratique, 46,3 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 27,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sont dissous, dans respectivement, 0,55 L d'une solution aqueuse de NH_3 (1,1 M), et 1,3 L d'une solution aqueuse de NH_3 (0,5 M). La solution de calcium est alors introduite rapidement dans la solution d'orthophosphates, formant un précipité qui est immédiatement filtré à l'aide d'un entonnoir Büchner. Ce précipité est ensuite lavé à l'aide d'une solution aqueuse de NH_3 (~0,08 M), gelé dans de l'azote liquide et puis lyophilisé pendant 72 heures. Enfin, il est conservé au froid à -20°C .

I-8) La brushite

La synthèse de la **brushite** a été réalisée par la méthode de « diffusion de vapeurs d'ammoniac » [3]. Le protocole est identique à celui de **CHA**, à l'exception qu'un seul flacon contenant la solution réactionnelle est inséré au sein de l'enceinte close (au lieu de deux).

II / Extraction du minéral osseux

L'extraction du minéral osseux a été réalisée selon la méthode élaborée par Steve Weiner et Paul Price (*cf.* la méthode 2 de l'article [6]). Dans le but de dénaturer la matrice organique (*i.e.* le collagène et les PNCs) ainsi que les cellules, un fragment d'**os frais** (~150 mg) est tout d'abord déchiqueté à l'aide d'un scalpel, broyé dans un mortier en agate, puis inséré dans 10mL d'une solution aqueuse froide de NaClO (pH ~9,6). Ensuite, cette solution de NaClO contenant l'os broyé est alors introduite pendant 1 heure dans un bain à ultrasons (refroidi à l'aide de glace), puis centrifugée à froid (20 min à 6000 tours/min). Les fragments d'os ainsi récupérés sont à nouveau broyés. Cette procédure est réalisée 3 fois de suite, et la solution de NaClO est remplacée à chaque fois. Toutes les étapes de sonication se sont ainsi étalées sur une période de 4 heures. Ensuite, la poudre ainsi récupérée est lavée 3 fois à l'aide de 10 mL d'eau osmosée, puis 2 fois à l'aide de 10 mL d'éthanol à 95%. Enfin, avant d'être séchée à 37°C pendant 3 jours, la poudre est dispersée dans 2 mL d'éthanol absolu, et le tout est inséré dans un bain à ultrasons pendant 15 min.

III / Retrait du bruit de fond des diffractogrammes WAXD 1D

Les diffractogrammes WAXD 1D obtenus présentent un important signal de fond provenant de la diffusion du capillaire ainsi que de l'eau dans le cas des échantillons mouillés. Ce signal de fond a donc été retiré à l'aide du logiciel Fullprof (cf. **Figure 110**).

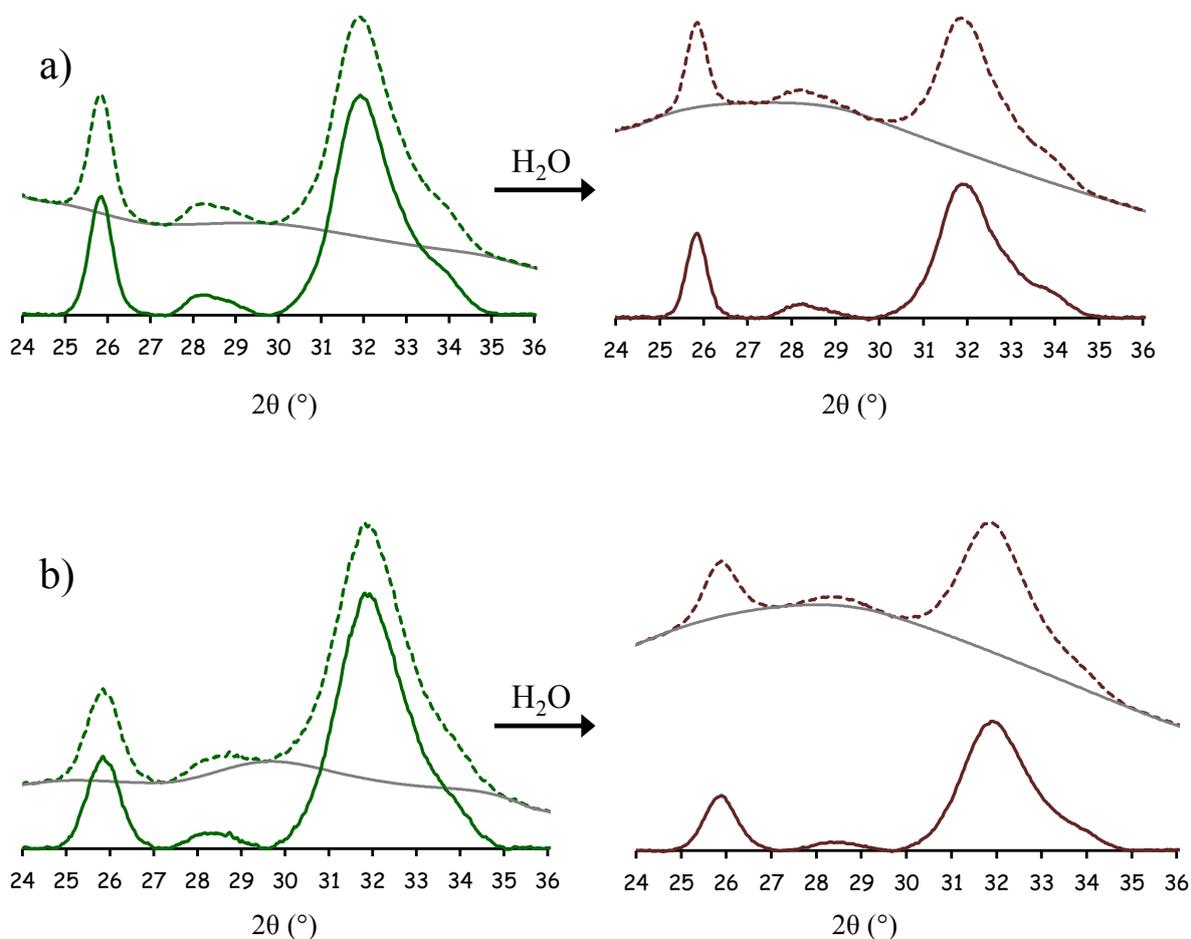


Figure 110. Diffractogrammes WAXD 1D avec (traits pleins) et sans (traits pointillés) retrait du bruit de fond, des apatites biomimétiques à l'état sec (à gauche) et une fois mouillées (à droite) : (a) CHA et (b) CHA-SBF.

IV / Appareils utilisés

Le **tableau 10** réunit le descriptif des appareils utilisés lors des expériences rapportées dans cette thèse, avec les acronymes suivants : RMN pour résonance magnétique nucléaire ; MEB pour microscopie électronique à balayage ; MET pour microscopie électronique en transmission ; MET-HR pour microscopie électronique en transmission à haute résolution ; cryo-MET pour microscopie électronique en transmission en mode cryogénique ; DRX pour diffraction des rayons X ; WAXD pour « Wide-angle X-ray Diffraction » ; ATG pour analyse thermogravimétrique ; et I.R. pour infrarouge.

Technique	Appareil
RMN	Les expériences concernant les noyaux ^1H , ^{31}P et ^{13}C , ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance 300 ($\nu_0(^1\text{H}) = 300.13 \text{ MHz}$; $\nu_0(^{31}\text{P}) = 121.5 \text{ MHz}$; et $\nu_0(^{13}\text{C}) = 75.5 \text{ MHz}$), avec une sonde Bruker de 4 mm de diamètre. L'expérience concernant le noyau ^{43}Ca a été réalisée sur un spectromètre Bruker Avance 700 ($\nu_0(^1\text{H}) = 700.0 \text{ MHz}$; et $\nu_0(^{43}\text{Ca}) = 47.1 \text{ MHz}$), avec une sonde Bruker de 3,2 mm de diamètre.
MEB	Les clichés ont été obtenus à l'aide d'un microscope Hitachi S-3400N, à une tension d'accélération de 9 kV.
MET	Les clichés ont été obtenus à l'aide d'un microscope FEI TECMAI G2 Spirit Twin équipé d'une caméra CCD, à une tension d'accélération de 120 kV.
MET-HR	Les clichés ont été obtenus à l'aide d'un microscope JEOL JEM-2010 équipé d'un canon à électrons LaB ₆ , à une tension d'accélération de 200 kV.
cryo-MET	Les clichés ont été obtenus à l'aide d'un microscope Jeol 2010F équipé d'une caméra Gatan ultrascan 4000, à une tension d'accélération de 200 kV.
DRX	Les acquisitions ont été effectuées sur un Diffractomètre X D8 Bruker en mode réflexion équipé d'un détecteur 1D Lynxeye, au rayonnement CuK α 1 avec une tension de 40 kV et un courant de 40mA. Les données ont été recueillies dans la gamme de 10° à 60° en 2 θ , avec un pas de 0,019 et un temps par pas de 2 secondes.
WAXD	Les acquisitions ont été effectuées à l'aide d'un dispositif expérimental de diffraction aux grand angles Rigaku S-Max 3000, équipé d'une source micro-foyer d'une taille de 20 μm , à anticathode de Cuivre, avec une tension de 45 kV et un courant de 0.9 mA. Le signal diffracté est récolté en mode transmission, et la distance échantillon-détecteur est de 58,6 mm avec un détecteur 2D (une image plate, 15 \times 15 cm ²). La taille du faisceau sur l'échantillon est de 0.4 mm de diamètre.
ATG	L'appareil utilisé est un thermo-microbalance NETZSCH STA 409PC. Les expériences ont été réalisées sous air, de la température ambiante jusqu'à 1000°C avec une élévation de la température de 5°C par minute.

I.R	L'appareil utilisé est un Perkin Elmer Spectrum One. Les mesures sont réalisées en réflexion totale atténuée (ATR), à l'aide d'un cristal de ZnSe. Les spectres ont été enregistrés entre 650 et 4000 cm^{-1} , où 4 scans ont été accumulés avec une résolution de 1 cm^{-1} .
-----	---

Tableau 10. *Le descriptif des appareils utilisés lors des expériences rapportées dans cette thèse.*

Références bibliographiques

- [1] S. Takemoto, Y. Kusudo, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, et S. Takashima, « Selective protein adsorption and blood compatibility of hydroxy-carbonate apatites », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 69A, n° 3, p. 544- 551, juin 2004.
- [2] L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, et S. Weiner, « A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 84, n° 9, p. 2732–2736, 1987.
- [3] N. Nassif, F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, et M. M. Giraud-Guille, « *In Vivo* Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite », *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 12, p. 3653- 3663, juin 2010.
- [4] S. H. Rhee et J. Tanaka, « Hydroxyapatite formation on cellulose cloth induced by citric acid », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 11, n° 7, p. 449- 452, juill. 2000.
- [5] J. C. Heughebaert, « Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques », INP, Toulouse, 1977.
- [6] S. Weiner et P. A. Price, « Disaggregation of bone into crystals », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 39, n° 6, p. 365–375, 1986.