



HAL
open science

Synthèse de métallophosphates poreux biosourcés pour des applications environnementales et biomédicales

Jessica Viviana Hinostroza Ramos

► To cite this version:

Jessica Viviana Hinostroza Ramos. Synthèse de métallophosphates poreux biosourcés pour des applications environnementales et biomédicales. Autre. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2017. Français. NNT : 2017MULH9658 . tel-01729524

HAL Id: tel-01729524

<https://theses.hal.science/tel-01729524>

Submitted on 12 Mar 2018

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 de Haute-Alsace

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Haute-Alsace

Discipline : Chimie des Matériaux

Ecole Doctorale Physique et Chimie-Physique (ED 182)

Jessica Viviana Hinostroza Ramos

Titre:

**Synthèse de métallophosphates poreux biosourcés
pour des applications environnementales et biomédicales**

Soutenue le 01 Mars 2017

Commission d'examen:

| | | |
|------------------------------|------------------------|---|
| Pr. Christèle Combes | Rapporteur | Institut National Polytechnique, Toulouse |
| Pr. Marylène Viana | Rapporteur | Université de Limoges, Limoges |
| Dr. Nicolas Bats | Examineur | IFP Energies nouvelles, Solaize |
| Pr. Angélique Simon-Masseron | Directrice de thèse | Université de Haute-Alsace, Mulhouse |
| Dr. Karine Anselme | Co-directrice de thèse | Université de Haute-Alsace, Mulhouse |
| Dr. Lydie Ploux | Co-directrice de thèse | Université de Haute-Alsace, Mulhouse |

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma gratitude à mes directrices de thèse, Pr. Angélique Simon-Masseron, Dr. Karine Anselme et Dr. Lydie Ploux pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon doctorat sur ce sujet qui m'a permis de rechercher sur plusieurs domaines, la synthèse de matériaux, la biologie et microbiologie. Merci pour leur disponibilité, leurs conseils et leur soutien au long de cette thèse, je garderai tous les moments partagés pendant nos multiples réunions et discussions.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Merci aux Pr. Christèle Combes, Pr. Marylène Viana et Dr. Nicolas Bats pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit et merci pour vos remarques et vos conseils enrichissants.

Je voudrais remercier les nombreuses personnes qui ont été impliquées dans la réalisation de ce travail. Au personnel technique de l'IS2M : Laure Michelin, Ludovic Josien, Habiba Nouali, Cyril Vaultot, Severine Rigolet pour m'avoir formé aux différentes techniques de caractérisation des matériaux. Je tiens à remercier Dr. Lavinia Balan pour les analyses par spectroscopie de fluorescence, Dr. Loïc Vidal pour les analyses de MET-EDX. Mes remerciements spéciaux à Dr. Arnaud Ponche pour les analyses d'électrophorèse et à l'ingénieur Tatiana Petithory pour m'avoir formé sur l'évaluation biologique des matériaux, merci beaucoup pour leur disponibilité, leur aide précieuse et indispensable au long de mes études.

Mes remerciements vont à tous les membres de l'équipe Matériaux à Porosité Contrôlée (MPC) au sein de laquelle j'ai effectué la partie synthèse de matériaux de ma thèse. Tout d'abord à Dr. Bénédicte Lebeau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, son écoute et sa disponibilité. Aux doctorants Laura Ronchi, Maëva Borel, Layla El Hanache, Laetitia Bullot, Audrey Garnier, Guillaume Rioland, Ihab Kabalan, Ali Said et Dante Ortiz pour les bons moments partagés. À Laurence Jacob, étudiante de L3 Chimie avec qui j'ai pu travailler lors de son stage très court au MPC.

Je remercie également tous les membres de l'équipe Biomatériaux et Biointerfaces, et Surfaces et Interfaces Complexes au sein de lesquelles j'ai travaillé sur la partie biologie/microbiologie de ma thèse. J'exprime une gratitude aux doctorants et post-doctorants du 'bureau Bio' Adeline Marguier, Charline Soraru, Caroline Steinmetz, Isabelle Brigaud,

Yige Yan, Laurent Pieuchot et Mathieu Veillet pour leur aide continue et leur encouragement.

Merci à Dr. Jean-Louis Paillaud avec qui j'ai pu échanger des idées sur l'interprétation de certains de mes analyses de diffraction de rayons X. Merci pour votre écoute. Mes remerciements vont aussi au personnel administratif de l'IS2M, à Nathalie Castelein et Sylvie Forget pour leur disponibilité et leur sympathie.

Je remercie en particulier certaines des amis que j'ai pu connaître lors de ces années de thèse, Laura C., Carol L., Alicia M., Sandra V., Leila S., Georges N. pour les très agréables moments partagés ensemble lors de mon séjour en Alsace.

Je souhaite finir en remerciant mes sources principales de bonheur et de force, ma famille et Thibault. Merci pour leur soutien continu et leurs encouragements. Je vous dédie ce manuscrit de thèse comme représentation de mon infinie gratitude.

SOMMAIRE

| | |
|---------------------------|----------|
| INTRODUCTION | 1 |
|---------------------------|----------|

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS

| | |
|--|-----------|
| I.1. Les matériaux poreux | 4 |
| I.2. Les métallophosphates | 6 |
| I.2.1. Définition | 6 |
| I.2.2. Les métallophosphates poreux | 6 |
| I.2.2-1. Aluminophosphates et dérivés | 6 |
| I.2.2-2. Zincophosphates | 8 |
| I.2.2-3. Autres métallophosphates | 11 |
| I.2.3. Méthodes de synthèse | 12 |
| I.2.4. Propriétés et applications | 19 |
| I.2.4-1. En catalyse acido-basique | 19 |
| I.2.4-2. En adsorption | 19 |
| I.2.4-3. En optique | 20 |
| I.2.4-4. En catalyse d'oxydoréduction | 20 |
| I.2.4-5. Dans les domaines biomédical et environnemental | 21 |
| I.2.5. Applications biomédicales et environnementales | 21 |
| I.3. Synthèse de métallophosphates poreux biosourcés | 26 |
| I.3.1. Pourquoi les métallophosphates biosourcés ? | 26 |
| I.3.2. Intérêts de l'utilisation des biomolécules phosphorées | 27 |
| I.3.2-1. Source de phosphore | 28 |
| a. Phosphoprotéines | 28 |
| b. Nucléotides | 31 |
| c. Autres biomolécules: acides nucléiques et phospholipides | 33 |
| I.3.2-2. Agent directeur de structure | 35 |
| I.3.2-3. Autres intérêts de l'utilisation des biomolécules phosphorées | 36 |
| I.3.3. Avancements en synthèse de métallophosphates biosourcés à partir de molécules phosphorées | 37 |
| I.4. Colonisation bactérienne des matériaux poreux et des métallophosphates | 40 |
| I.4.1. Les biofilms | 40 |
| I.4.2. Adhésion bactérienne et formation du biofilm | 42 |
| I.4.3. Colonisation bactérienne des matériaux poreux | 45 |
| I.4.4. Colonisation bactérienne des métallophosphates | 47 |
| I.5. Nanoparticules d'argent dans les matériaux | 49 |
| I.5.1. Intérêt | 49 |
| I.5.2. Propriétés antibactériennes de l'argent supporté sur un solide | 49 |

| | |
|---|-----------|
| I.5.3. Méthodes de préparation des nanoparticules d'argent | 50 |
| I.5.4. Avancements en synthèse de métallophosphates poreux avec nanoparticules d'argent | 52 |
| I.6. Conclusion | 54 |

CHAPITRE II : PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX ET DESCRIPTION DES TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION

| | |
|---|-----------|
| II.1. Sources de réactifs utilisés | 66 |
| II.1.1. Réactifs organiques: biomolécules | 66 |
| II.1.2. Réactifs inorganiques | 66 |
| II.2. Mode opératoire | 67 |
| II.2.1. Synthèse hydrothermale des matériaux | 67 |
| II.2.2. Traitement thermique des solides: calcination | 68 |
| II.3. Techniques expérimentales de caractérisation | 69 |
| II.3.1. Diffraction de rayons X | 69 |
| II.3.2. Analyses élémentaires | 71 |
| II.3.3. Analyses thermiques | 71 |
| II.3.4. Microscopies | 72 |
| II.3.5. Résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide | 73 |
| II.3.6. Manométrie d'adsorption/désorption du diazote (N ₂) | 75 |
| II.3.7. Porosimétrie au mercure | 76 |
| II.3.8. Spectroscopie de fluorescence | 77 |
| II.3.9. Microscopie à fluorescence « classique » | 78 |
| II.3.10. Microscopie confocale à balayage laser | 79 |
| II.3.11. Electrophorèse sur gel | 81 |
| II.3.12. Lecteur de microplaques UV-visible | 83 |

CHAPITRE III : SYNTHÈSE DE MÉTALLOPHOSPHATES POREUX BIOSOURCÉS À PARTIR DE CASÉINE

| | |
|---|-----------|
| III.1. Introduction | 85 |
| III.2. La caséine à l'échelle industrielle | 85 |
| III.2.1. Procédés de récupération du lait de vache | 85 |
| III.2.2. Disponibilités en Europe | 87 |
| III.2.3. Principales utilisations | 88 |
| III.3. La caséine : composition chimique et solubilité | 90 |
| III.3.1. Analyses élémentaires | 90 |
| III.3.2. Solubilité | 91 |
| III.3.2-1. Point bibliographique | 91 |
| III.3.2-2. Résultats expérimentaux | 97 |
| III.3.2-3. Conclusion | 98 |

| | |
|--|------------|
| III.4. Synthèse de zincophosphates | 99 |
| III.4.1. Influence de paramètres de synthèse | 99 |
| III.4.1-1. Influence du pH | 99 |
| a. Modification du pH par ajout d'acide | 100 |
| b. Modification du pH par variation de la quantité de soude | 101 |
| c. Conclusion | 102 |
| III.4.1-2. Influence de la température de synthèse | 103 |
| III.4.1-3. <i>Publication</i> | 104 |
| III.4.1-4. Caractérisations complémentaires des solides | 127 |
| a. Influence de la vitesse de chauffe lors de la calcination sur la cristallisation des phases zincophosphates | 127 |
| b. Diffraction de rayons X à haute température | 128 |
| c. Caractérisation de la porosité par porosimétrie au mercure | 129 |
| III.4.1-5. Étapes du mécanisme de synthèse des zincophosphates | 130 |
| III.4.1-6. Bilan matière du P et du Zn pour la synthèse des zincophosphates macroporeux | 131 |
| III.5. Synthèse d'aluminophosphates | 133 |
| III.5.1. Influence des paramètres de synthèse | 134 |
| III.5.1-1. Influence du pH par variation de la quantité de soude | 134 |
| III.5.1-2. Influence de la variation de la quantité d'aluminium | 137 |
| III.5.1-3. Influence de la température de synthèse | 140 |
| III.5.2. Caractérisation par microscopie électronique à balayage | 140 |
| III.5.3. Caractérisation par analyses thermiques | 142 |
| III.5.4. Mesures d'adsorption du diazote (N ₂) | 143 |
| III.6. Conclusion | 144 |

CHAPITRE IV : SYNTHÈSE DE MÉTALLOPHOSPHATES POREUX BIOSOURCÉS À PARTIR DE NUCLÉOTIDES

| | |
|---|------------|
| IV.1. Introduction | 148 |
| IV.2. Déphosphorylation de l'ATP | 150 |
| IV.3. Propriétés physico-chimiques de l'AMP et de l'ATP | 153 |
| IV.4. Solubilité de l'AMP et de l'ATP dans une solution aqueuse de soude | 155 |
| IV.5. Démarche expérimentale | 157 |
| IV.6. Résultats expérimentaux | 157 |
| IV.6.1. Synthèse de zincophosphates | 158 |
| IV.6.1-1. Utilisation de l'AMP | 158 |
| IV.6.1-2. Utilisation de l'ATP | 162 |
| IV.6.1-3. Caractérisation par MEB | 164 |
| IV.6.2. Synthèse d'aluminophosphates | 165 |
| IV.6.2-1. Utilisation de l'AMP | 165 |

| | |
|---|------------|
| IV.6.2-2. Utilisation de l'ATP | 170 |
| IV.6.2-3. Caractérisation par MEB | 170 |
| IV.7. Conclusion | 172 |

CHAPITRE V : ÉVALUATION DES PROPRIÉTÉS ANTIBACTÉRIENNES DE NOUVEAUX ZINCOPHOSPHATES POREUX BIOSOURCÉS ENRICHIS D'ARGENT PRÉPARÉS À PARTIR DE CASÉINE

| | |
|--|------------|
| V.1. Introduction | 175 |
| V.2. Synthèse hydrothermale d'un nouveau zincophosphate biosourcé ZnPO/CN/Ag par formation <i>in situ</i> de nanoparticules d'Ag | 176 |
| V.3. Évaluation des propriétés antibactériennes des zincophosphates biosourcés enrichis d'argent préparés à partir de caséine sur <i>E. coli</i> K12 SCC1 | 179 |
| V.3.1. Autofluorescence de la souche <i>E. coli</i> K12 SCC1 | 179 |
| V.3.2. Zincophosphates (poudres) préparés pour les tests en microbiologie | 181 |
| V.3.2-1. ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag « produits bruts de synthèse » | 181 |
| V.3.2-2. Zincophosphates calcinés (ZnPOs-750 et ZnPOs/Ag-750) | 181 |
| V.3.3. Propriétés d'hydratation et d'autofluorescence des zincophosphates contenant de la caséine..... | 182 |
| V.3.3-1. Hydratation | 182 |
| V.3.3-2. Autofluorescence | 182 |
| V.4. Publication | 185 |
| V.5. Conclusion | 213 |

CHAPITRE VI : ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ *IN VITRO* DES ZINCOPHOSPHATES BIOSOURCÉS PRÉPARÉS À PARTIR DE CASÉINE

| | |
|--|------------|
| VI.1. Introduction | 215 |
| VI.2. Démarche expérimentale | 216 |
| VI.2.1. Cellule utilisée | 216 |
| VI.2.2. Matériaux analysés | 216 |
| VI.2.3. Test de cytotoxicité <i>in vitro</i> par contact indirect (extraits) | 216 |
| VI.2.3-1. Procédure expérimentale | 217 |
| VI.2.3-2. Traitement statistique des données | 218 |
| VI.2.3-3. Influence du pH | 218 |
| VI.2.3-4. Influence de la dilution | 219 |
| VI.2.4. Analyse des ions Ag ⁺ et Zn ²⁺ libérés | 219 |
| VI.2.5. Analyse de la nature de la caséine libérée | 219 |
| VI.3. Résultats et discussion | 219 |

| | |
|--|----------------|
| VI.3.1. Influence de la nature de la caséine (réactif) | 222 |
| VI.3.2. Influence de la dénaturation de la caséine | 224 |
| VI.4. Conclusion | 227 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 229 |
| ANNEXES | 232 |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, de grands efforts ont été faits pour trouver des solutions à la dégradation des ressources naturelles et réduire leur consommation. C'est ainsi que, dans le domaine de la synthèse de matériaux, l'un des challenges est de réduire l'utilisation des réactifs dérivant du pétrole et de les remplacer par des matières issues du vivant, telles que les biomolécules (protéines, nucléotides, sucres,...). La préparation de ces matériaux qualifiés de « biosourcés », fait par ailleurs l'objet de développement de voies de synthèse « propres », c'est-à-dire respectueuses de l'environnement, qui offrent alors des alternatives aux voies classiques et permettent de réduire les impacts environnementaux de l'activité humaine.

Le phosphore est en particulier un élément d'importance vitale dans le métabolisme chez les organismes vivants, les roches phosphatées étant sa principale ressource minérale. La consommation de ces réserves non renouvelables de phosphore est aussi destinée à la production de réactifs inorganiques phosphorés tels que l'acide phosphorique (H_3PO_4), d'intérêt pour la synthèse hydrothermale de matériaux de type métallophosphate en tant que source de phosphore. Parmi ces solides, les métallophosphates (micro)poreux revêtent un intérêt particulier car ils sont souvent utilisés dans les domaines tels que la catalyse, l'adsorption et la séparation grâce à leurs caractéristiques notables (large gamme de taille de pores et de charpente minérale, diversité de composition chimique,...). La formation de la porosité dans ces matériaux préparés par voie hydrothermale, inclut typiquement l'utilisation d'une molécule organique (amine), qui joue le rôle d'agent directeur de structure autour duquel se forment les parois délimitant les pores.

Dans ce contexte, la synthèse de métallophosphates à partir de molécules biosourcées phosphorées représente une alternative pour remédier à la dégradation des ressources minérales de cet élément chimique. Toutefois, dans la littérature, peu d'études rapportent l'utilisation de biomolécules phosphorées pour la préparation de métallophosphates poreux ou non, à l'exception de celles qui concernent les phosphates de calcium (ex. hydroxyapatite) reconnus pour leur application dans le domaine biomédical où ils sont utilisés en tant que biomatériaux. D'autres métallophosphates biosourcés tels que les alumino- et zincophosphates par exemple, ne semblent pas avoir été synthétisés à ce jour. Pourtant, les propriétés qu'ils possèdent comme leurs versions non-biosourcées permettent d'envisager des applications comme catalyseurs (structures microporeuses). Plus précisément, les zincophosphates (non poreux) présentent aussi d'autres applications comme ciments pour les restaurations dentaires et d'inhibiteurs de la corrosion dans des systèmes humides. C'est

pourquoi les zincophosphates biosourcés méritent d'être étudiés, aussi bien en ce qui concerne leur synthèse, que leurs caractéristiques et propriétés. Cela permettra, à plus long terme, d'envisager leur application dans des domaines moins étudiés comme ceux de l'environnement et du biomédical.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles voies de synthèse de métallophosphates poreux à partir de réactifs biosourcés et de nouvelles sources de phosphore, c'est-à-dire à l'utilisation de biomolécules phosphorées de différents types possédant diverses teneurs en phosphore, des tailles/géométries variées afin notamment de favoriser le rôle d'agent directeur de structure de ces biomolécules. Nous nous sommes aussi intéressés à l'utilisation de telles biomolécules dans la synthèse de nanoparticules d'argent sur la base des propriétés réductrices et stabilisantes qu'elles présentent.

Plus précisément, les objectifs de ce travail sont de : i) synthétiser de nouveaux solides zinco- et aluminophosphates poreux par voie hydrothermale à partir de biomolécules phosphorées, comme la caséine du lait de vache et des nucléotides (AMP : adénosine monophosphate et ATP : adénosine triphosphate) pour remplacer les sources inorganiques classiquement utilisées, et ii) caractériser les propriétés physico-chimiques des matériaux synthétisés, et d'évaluer le comportement vis-à-vis des bactéries et de cellules eucaryotes des zincophosphates éventuellement enrichis en nanoparticules d'argent.

Ce travail de thèse pluridisciplinaire se situe à l'interface entre la chimie des matériaux et la biologie au travers de l'élaboration de nouveaux métallophosphates poreux biosourcés et l'exploration de leur comportement en contact avec des milieux biologiques.

Le manuscrit est divisé en six chapitres qui sont résumés ci-dessous :

- Le **chapitre I** présente d'abord un rappel bibliographique sur les métallophosphates poreux et les connaissances actuelles en synthèse biosourcée de ces matériaux. Un résumé sur leurs applications majeures, en attirant l'attention sur les domaines de l'environnement et du biomédical est aussi présenté. Enfin, ce chapitre fait le point sur les avancées dans le domaine de la synthèse de métallophosphates enrichis en nanoparticules d'argent et leurs propriétés antibactériennes.

- Dans le **chapitre II**, les protocoles de synthèse hydrothermale ainsi que les techniques expérimentales de caractérisation physico-chimique et d'évaluation microbiologique et biologique utilisées au cours de ce travail sont exposés.

- Le **chapitre III** concerne la préparation de nouveaux zinco- et aluminophosphates poreux biosourcés par voie hydrothermale à partir de caséine, une phosphoprotéine du lait.

Les résultats obtenus sont présentés ainsi que l'article sur la synthèse de zincophosphates macroporeux biosourcés qui a fait objet d'une publication dans le journal scientifique *Crystal Growth and Design* (édition ACS).

- Le **chapitre IV** traite de l'utilisation d'autres biomolécules contenant du phosphore, pour la synthèse hydrothermale de zinco- et d'aluminophosphates. Il s'agit des nucléotides adénosine mono- et tri-phosphate (AMP et ATP), molécules impliquées dans le fonctionnement de tout organisme vivant. Les principaux résultats de ces synthèses sont décrits.

- Le **chapitre V** consiste en la synthèse hydrothermale de nouveaux zincophosphates poreux enrichis en nanoparticules d'argent à partir de caséine. Ce travail est à la base une continuation des travaux présentés dans le chapitre III. La synthèse des matériaux par formation *in situ* des nanoparticules d'argent à partir de la caséine, ainsi qu'une étude de l'évaluation des propriétés antibactériennes des zincophosphates poreux avec et sans nanoparticules d'argent sont détaillées sous la forme d'un article qui sera bientôt soumis pour publication.

- Enfin, le **chapitre VI** est une étude préliminaire portant sur l'évaluation biologique des zincophosphates biosourcés qui contiennent ou non des nanoparticules d'argent. Des essais de cytotoxicité *in vitro* sur des cellules sont en particulier rapportés.

Le manuscrit se clôture par une conclusion générale récapitulant les principaux résultats de ce travail ainsi que les différentes perspectives envisagées.

CHAPITRE I

Généralités

I.1. Les matériaux poreux

Depuis longtemps, l'homme a exploité les propriétés adsorbantes du charbon ou de pierres poreuses volcaniques à des fins médicales (aspiration du venin d'une plaie) ou bien de poteries pour permettre leur refroidissement par évaporation de l'eau qui les traverse par exemple. Parmi ces matériaux adsorbants se trouvent les matériaux poreux qui possèdent des cavités ou des canaux, appelés pores, dont les parois sont responsables d'une augmentation de l'aire spécifique, et qui donnent aux solides des caractéristiques et des propriétés uniques.

Les matériaux poreux sont classés par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC en anglais) selon leur diamètre de pore [1-3]. Les matériaux microporeux possèdent un diamètre de pores inférieur à 2 nm alors que celui des matériaux mésoporeux est compris entre 2 et 50 nm. Les matériaux macroporeux présentent quant à eux des diamètres de pores supérieurs à cette dernière gamme comme représenté sur la Figure I-1. Il est important de préciser que dans le domaine des biomatériaux les diamètres de pores des matériaux microporeux à macroporeux se situent plutôt dans la gamme du micromètre au millimètre.

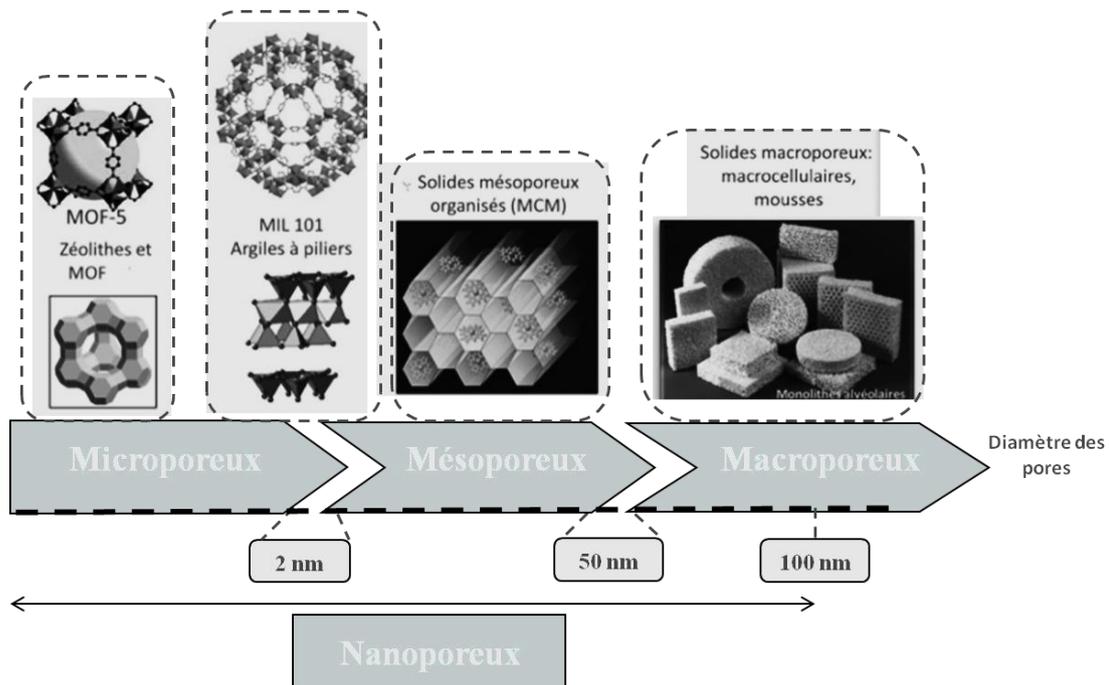


Figure I-1. Classement des solides poreux en fonction de leur diamètre de pores.

Ces différents types de pore peuvent être visualisés par microscopie électronique comme il est représenté sur la Figure I-2 pour des solides qui ont une structure poreuse ordonnée.

D'autre part, les matériaux nanoporeux regroupent l'ensemble des matériaux poreux ayant un diamètre de pores inférieur à 100 nm [3].

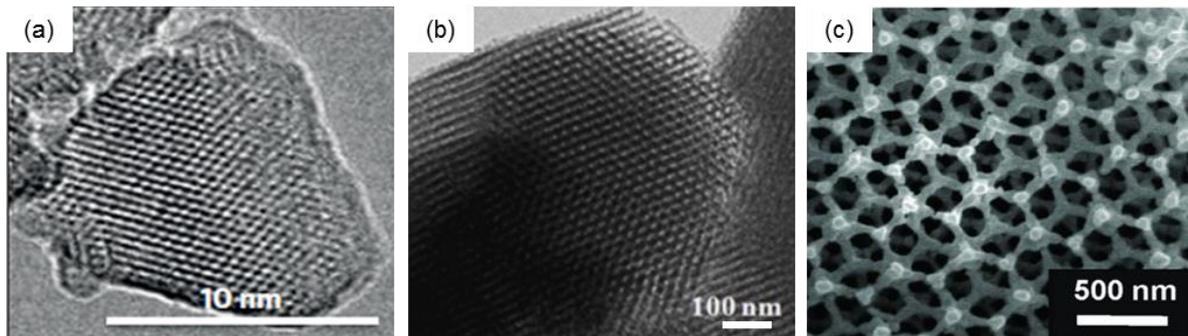


Figure I-2. Images de microscopie électronique à transmission de différents matériaux poreux selon leur taille de pores : (a) matériau microporeux : zéolithe FAU [4], (b) matériau mésoporeux: silice SBA-15 [5] et (c) matériau macroporeux : *mac*-TaON (oxynitride de tantale) [6].

Les matériaux poreux peuvent être aussi classés d'après leur nature ou composition chimique : les matériaux organiques, inorganiques, et hybrides organiques-inorganiques.

- Parmi les matériaux organiques poreux se trouvent les polymères tels que les PIMs (Polymers of Intrinsic Microporosity) et les COFs (Covalent Organic Frameworks), par exemple [7, 8].
- Les matériaux poreux inorganiques sont plus nombreux. Dans cette catégorie se trouvent les matériaux de type oxyde à base de titane et de zirconium, les métallophosphates, les matériaux de type zéolithique ((alumino)silicates appelés zéolithes, certains métallophosphates,...) [9, 10]. Ces derniers sont référencés par types structuraux correspondant à un code de trois lettres capitales attribué par la commission structure de l'Association Internationale des Zéolithes (IZA) [11].
- D'un autre côté se distinguent les matériaux poreux hybrides organiques-inorganiques tels que les MOFs (Metal-Organic Frameworks) et les matériaux hybrides à base de silice et de biomolécules par exemple [12, 13].

Durant ce travail de thèse, nous sommes intéressés aux métallophosphates poreux (micro-, méso- et/ou macroporeux) en raison des applications variées que ces matériaux possèdent. Parmi eux, les métallophosphates micro- et mésoporeux (AlPO_4 , SAPO ,...) sont largement

étudiés contrairement aux métallophosphates macroporeux. Dans la suite de ce chapitre sont vues plus en détail les propriétés et les avancées majeures de cette famille de matériaux.

I.2. Les métallophosphates

I.2.1. Définition

Les métallophosphates constituent une famille importante de matériaux inorganiques utilisés dans une large gamme d'applications. En effet, ces matériaux présentent l'avantage d'avoir une diversité de composition chimique ($M = \text{Al, Zn, Ni, \dots}$) grâce à la réactivité chimique élevée des cations métalliques (M^{n+} , dont notamment les métaux de transition) avec les groupes phosphate PO_4^{3-} . Le pouvoir polarisant du cation P^{5+} confère à l'ion phosphate une forte individualité, capable de former plusieurs associations avec les métaux résultant en matériaux avec des structures et propriétés uniques [14].

I.2.2. Les métallophosphates poreux

Ils présentent une grande diversité de composition chimique.

I.2.2-1. Aluminophosphates et dérivés

La plus grande partie des aluminophosphates poreux sont microporeux, cristallisés et de type zéolithique. D'une manière générale, les solides microporeux se caractérisent par leurs pores et leur charpente tridimensionnelle résultant de l'enchaînement d'unités tétraédriques TO_4 à sommets oxygénés communs ($T = \text{P, Si, Al, \dots}$). Les structures de type aluminophosphate peuvent s'écarter de cette définition idéale par la présence d'unités avec des coordinences autres que tétraédriques (présence de polyèdres TX_4, TX_5 ou TX_6 , $X = \text{O, F}$), ou d'unités adjacentes non pontées (présence de groupements T-OH terminaux par exemple).

La première synthèse d'aluminophosphates microporeux dénommés $\text{AlPO}_4\text{-}n$ (n est un nombre entier qui est spécifique de la structure) a été reportée pour la première fois en 1982 par l'UCC (Union Carbide Corporation). Ces matériaux présentent une charpente minérale cristallisée constituée par des tétraèdres AlO_4 et PO_4 associés de façon à former une porosité de dimensions moléculaires communiquant avec le milieu extérieur comme celle des zéolithes. Certains composés aluminophosphates présentent des topologies de charpente identiques à celles des zéolithes comme par exemple l' $\text{AlPO}_4\text{-}20$, l' $\text{AlPO}_4\text{-}17$ et l' $\text{AlPO}_4\text{-}34$,

de types structuraux SOD, ERI et CHA, respectivement [15-17]. D'autres présentent des structures originales, tels que l' AlPO_4 -11 et l' AlPO_4 -18, de types structuraux AEL et AEI, respectivement. [18, 19]. À titre d'exemples, la Figure I-3(a) représente les structures CHA et AEI.

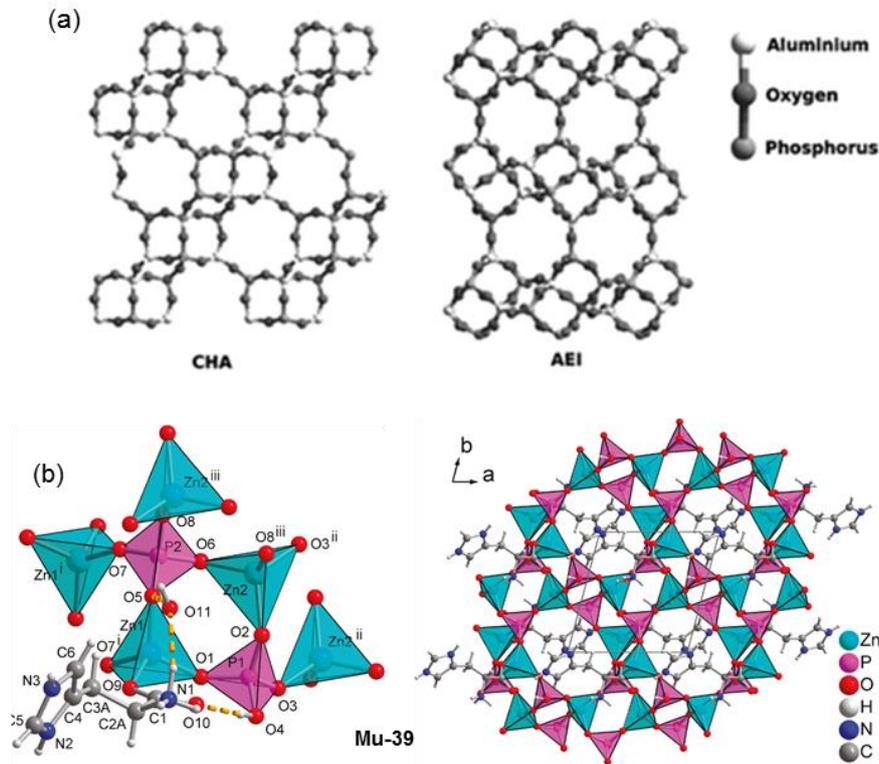


Figure I-3. Exemples de structures cristallines de métallophosphates : (a) aluminophosphates de types structuraux CHA et AEI [20], et (b) zincophosphate Mu-39 [21].

Les aluminophosphates peuvent avoir une charpente minérale neutre ou plus souvent chargée négativement. Dans le premier cas, le matériau consiste en une charpente minérale ininterrompue (absence de groupements P-OH terminaux par exemple) qui résulte de la stricte alternance des atomes Al et P. Dans le second cas, la charge négative provient d'un rapport molaire Al/P \neq 1 et/ou de la présence de ponts Al-OH-Al, de groupements terminaux du type P-OH, P=O. Les cations et/ou les molécules organiques occluses dans les pores compensent alors la charge de la charpente minérale. La substitution partielle du métal (Al de valence III) ou du phosphore (de valence V) par des éléments de valence II, III ou IV est possible au cours de la synthèse et permet de conférer également à la charpente une charge négative. L'incorporation d'hétéroatomes dans ces structures aluminophosphates tels que Si, Co, Fe, Mg, Mn, Ti,... [22, 23] ont permis de modifier leurs propriétés physiques et chimiques, et ont

conduit à l'élaboration de matériaux dénommés SAPO, MeAPO, MeAPSO, etc. À titre d'exemple, la Figure I-4 représente les différentes appellations données par le groupe Union Carbide Corporation pour désigner les matériaux dérivés d'aluminophosphates (AlPO_4) par substitutions isomorphiques.

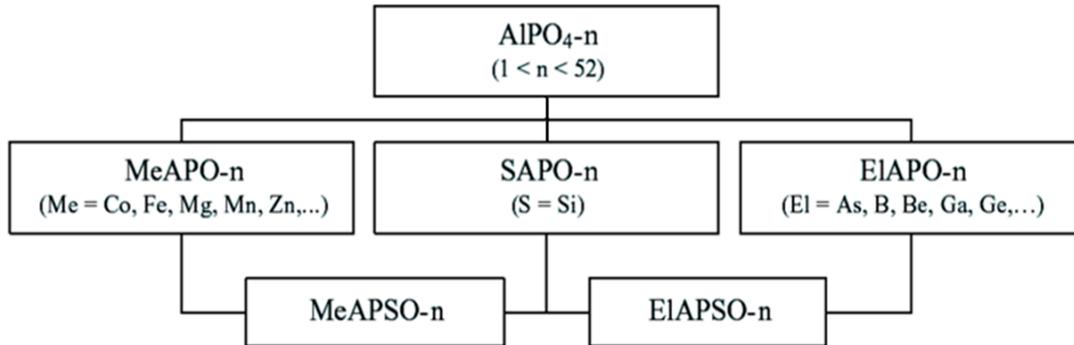


Figure I-4. Famille des AlPO_{4-n} et dérivés revendiqués par la Société Union Carbide Corporation. (Figure adaptée de la publication [22] de E. M. Flanigen)

Enfin les matériaux aluminophosphates peuvent également présenter des mésopores (par exemple [24]) ou une porosité hiérarchisée (micropores + mésopores : par exemple [25]); micropores + mésopores et/ou macropores : par exemple [26]). De même que pour les AlPO_4 microporeux, il est possible de synthétiser des aluminophosphates mésoporeux comportant un/des autre(s) élément(s) dans la paroi inorganique. Citons par exemple des ferroaluminophosphates [27], des galloaluminophosphates [28].

I.2.2-2. Zincophosphates

Les zincophosphates sont une autre famille importante de matériaux de type métallophosphates. Les premières synthèses de zincophosphates microstructurés/microporeux ont été revendiquées dans les années 90 par T. E. Gier et G. D. Stucky qui ont préparé des zincophosphates isostructuraux aux zéolithes de types SOD et FAU [29].

L'intérêt pour la famille des zincophosphates microporeux n'a cessé de croître depuis. De nombreuses structures ont été publiées dans la littérature. Elles sont parfois analogues à celles des structures aluminosilicates « zéolithes » comme par exemple celles préalablement citées. Dans d'autres cas, les structures microporeuses sont spécifiques : certaines vérifient les règles permettant de définir un matériau de type zéolithique et un code structural leur a été alors attribué. C'est le cas du zincophosphate chiral de type CZP [30, 31]. D'autres

zincophosphates microporeux portent des noms donnés par les chercheurs. Citons à titre d'exemples les phases microporeuses ZnPO-W et ZnPO-TMA préparées par Bu *et al.* (1996) où W et TMA indique la nature des molécules occluses dans les pores à l'issue de la synthèse (W pour water, TMA pour triméthylamine) [32], et des échantillons référencés Mu-X (Mu-19 [33], Mu-22 [34], Mu-39 [21] (Figure I-3(b)),...) qui ont été préparés par l'équipe Matériaux à Porosité Contrôlée (MPC) de l'IS2M à Mulhouse (Mu).

Par ailleurs, de nombreux zincophosphates présentent des structures non tridimensionnelles (3D) mais bidimensionnelle (2D) ou monodimensionnelle (1D) [35].

La plupart de ces matériaux présentent une stabilité thermique très faible par rapport aux aluminosilicates, même si Harrison *et al.* (1996) revendiquent la synthèse de composés mixtes du type (Zn/As)PO₄ stables jusqu'à 600 °C [36]. Garcia-Serrano *et al.* (2001) ont montré que la structure zincophosphate FAU était stable jusqu'à 400 °C, la cristallinité du zincophosphate CZP diminuait quant à elle à partir de ca. 250 °C [37].

Récemment de nouveaux types de zincophosphates poreux ont été revendiqués. Leur structure peut être décrite comme résultant de l'assemblage de « cubes-zincophosphates » (Figure I-5) par des ligands organiques *via* des interactions non covalentes (liaisons hydrogène) [38]. Ces « cubes-zincophosphates » appelés « *building D4R zinc phosphate cubanes* » ressemblent à des unités secondaires de construction (SBU) connues pour les zéolithes (les unités D4R (*double-four-ring*)).

Les nouveaux zincophosphates ainsi obtenus présentent des structures OD, 1D, 2D ou 3D. Certains sont solubles dans des solvants organiques tels que le méthanol, acétonitrile et diméthylsulfoxyde (DMSO) [38]. La porosité de ces matériaux évaluée à travers la surface de Langmuir estimée sur des poudres déshydratées à 100 °C est variée. Elle atteint par exemple 255 m². g⁻¹ pour le composé **4** représenté Figure I-5 (b) et 1147 m². g⁻¹ pour le composé **8** à structure 3D représenté Figure I-6 [39]. Enfin, la stabilité thermique de ces matériaux est faible, les structures sont stables jusqu'à 250–350 °C sous N₂ [39].

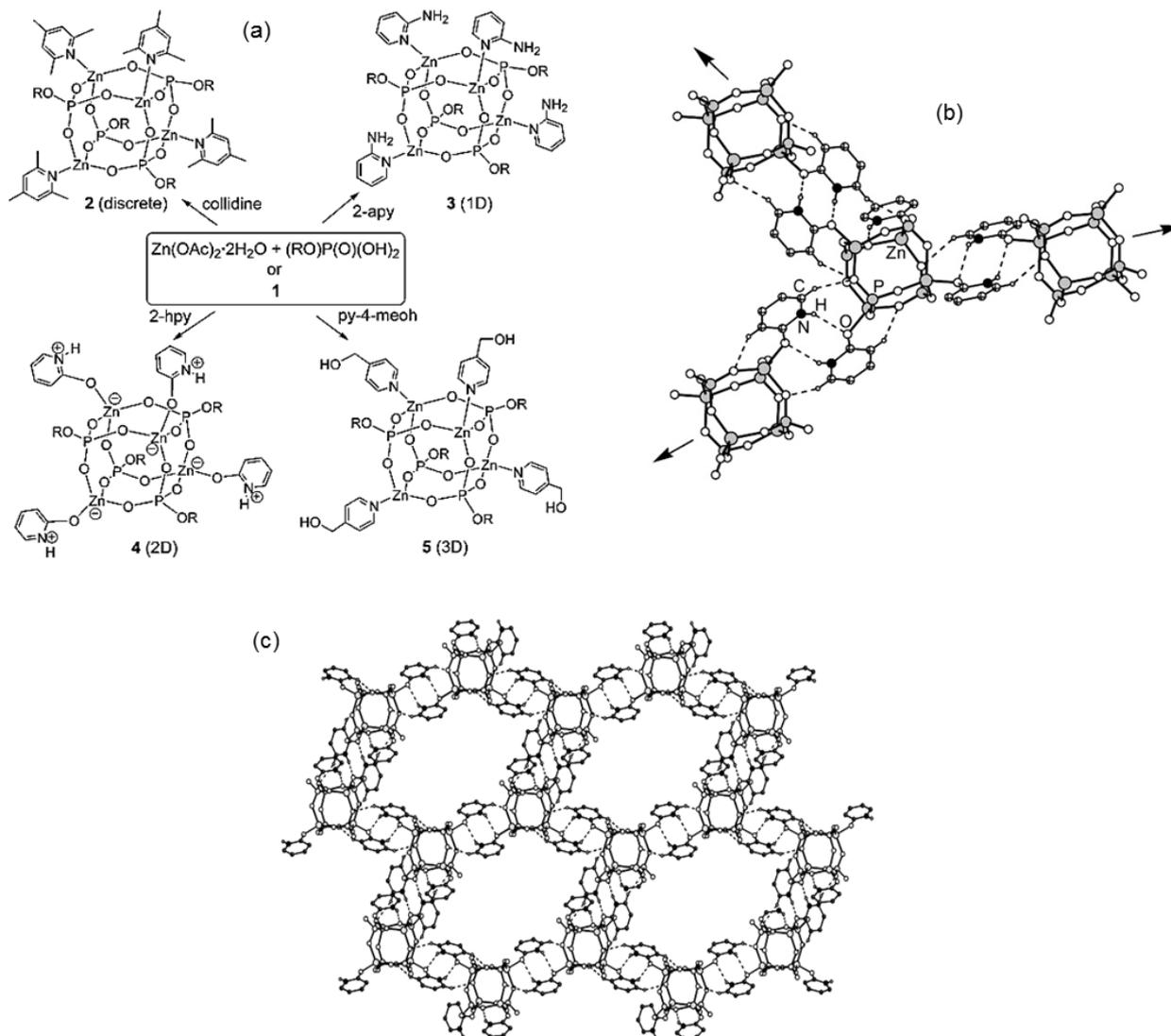


Figure I-5. a) Exemples de « cubes-zincophosphates » obtenus à partir de différents ligands (pyridines substituées). Les notations **2** à **5** symbolisent les zincophosphates obtenus avec indiqué entre parenthèses la dimensionalité de leur structure. Pour le composé **4** : b) chaque « cube-zincophosphate » est relié à 3 autres à travers des liaisons hydrogène, représentées en pointillés, ce qui conduit à c) un assemblage 2D hexagonal. Les groupements 2,6-di(isopropyl)phényl et les atomes d'hydrogène non impliqués dans les liaisons hydrogène ne sont pas représentés par souci de clarté [38].

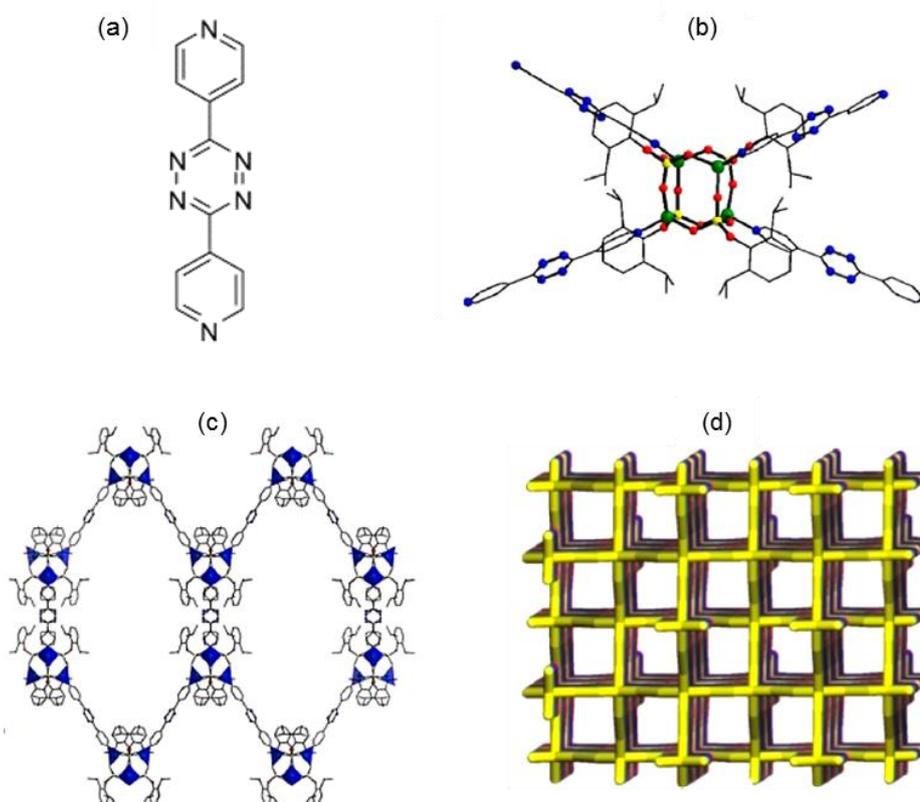


Figure I-6. Composé **8** à structure 3D synthétisé par Kalita *et al.* (2014) [39] a) ligand utilisé pour la synthèse. Vues en perspective b) de l'unité « simple », c) des canaux hexagonaux et d) du réseau interpénétré.

I.2.2-3. Autres métallophosphates

Voici quelques autres métallophosphates poreux (liste non exhaustive).

- **Phosphates de nickel** : Citons par exemple le composé appelé VSB-5 qui a une structure 3D faisant apparaître de larges canaux monodimensionnels dont l'ouverture est délimitée par 24 NiO₆ octaèdres (diamètre des pores : ca. 10,2 Å) [40]. Il est possible de réaliser des substitutions isomorphiques avec les métaux de transition Fe, Mn et V [41].
- **Phosphates de zirconium** : Ils peuvent se trouver sous forme de solides mésoporeux de type MCM-50 (structure lamellaire) [42] ou d'hétérostructures PPH (*Porous Phosphate Heterostructure*) [43]. Récemment Zhu *et al.* (2016) ont publié la synthèse de monolithes macroporeux à base de phosphate de zirconium (Figure I-7) [44].
- **Phosphates de fer** : Il en existe des microporeux [45] et mésoporeux [46].
- **Phosphates de gallium** : Ils peuvent être microstructurés/microporeux et certains possèdent des structures similaires aux aluminophosphates, comme les gallophosphates

GaPO₄-14 [47] (AlPO₄-14) et GaPO₄-12 [48] (AlPO₄-12). Les plus remarquables de ces matériaux sont ceux de type structural CLO (cloverite) [49] et celui nommé ICL-1 [50] qui sont les solides microporeux à porosité 3D présentant, à notre connaissance, la plus grande ouverture de pores (ouvertures contenant 20 tétraèdres TO₄ (T = Ga, P), diamètre de ca. 13,2 Å).

- **Phosphates de titane** : Citons par exemple un matériau mésoporeux [51].
- **Phosphates de calcium** : Le plus étudié est l'hydroxyapatite (Ca₂(PO₄)₃(OH)) qui peut être rendue (macro)poreuse par différentes méthodes (Figure I-8) [52-54].

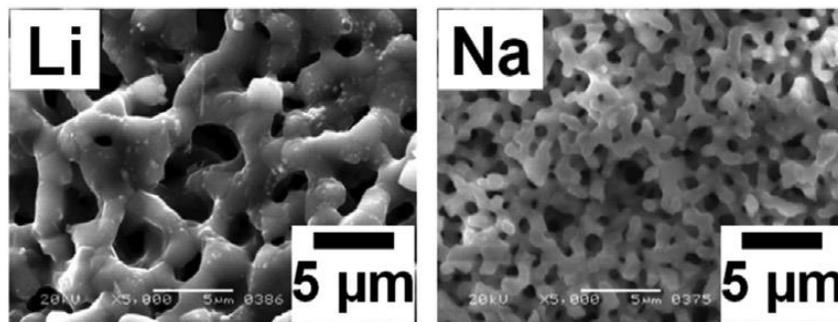


Figure I-7. Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de monolithes macroporeux de LiZrP et NaZrP (ZrP : zirconium phosphates) obtenus après calcination à 1000 °C [44].

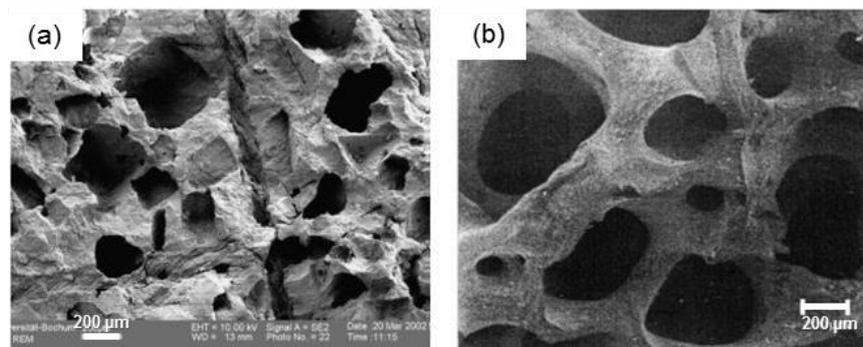


Figure I-8. Images de MEB de phosphates de calcium (HA) macroporeux : (a) porosité formée sans processus de frittage [53], et (b) synthétisée à partir d'os spongieux après élimination des composants organiques (nom commercial Endobon[®]) [54].

I.2.3. Méthodes de synthèse

La plupart des synthèses de métallophosphates poreux utilisent des voies appelées « *template methods* » qui incluent des agents directeurs de structure/agents

structurants/template pour générer/former la porosité. De façon générale, les synthèses sont réalisées à relativement basses températures (< 200–300 °C). Elles sont effectuées à pression atmosphérique ou pression plus élevée générée alors par la température. C'est le cas pour les synthèses hydro-, solvo- et ionothermales.

Une grande variété de métallophosphates poreux, sont classiquement synthétisés par voie hydrothermale en autoclave à des températures inférieures à 200 °C sous pression autogène. En particulier, cette méthode de synthèse permet d'obtenir des solides cristallins hautement organisés [55]. La cristallisation s'effectue à partir d'un milieu réactionnel souvent appelé « gel » constitué d'une phase solide et d'une phase liquide. Ce système comprend principalement un solvant (eau ou solvant organique), les sources des éléments T (P, Al, Zn,...) nécessaires pour l'édification de la charpente minérale, un template d'origine minérale ou organique et enfin un agent minéralisateur/mobilisateur (anions OH⁻, F⁻,...). La Figure I-9 illustre le déroulement d'une synthèse hydrothermale.

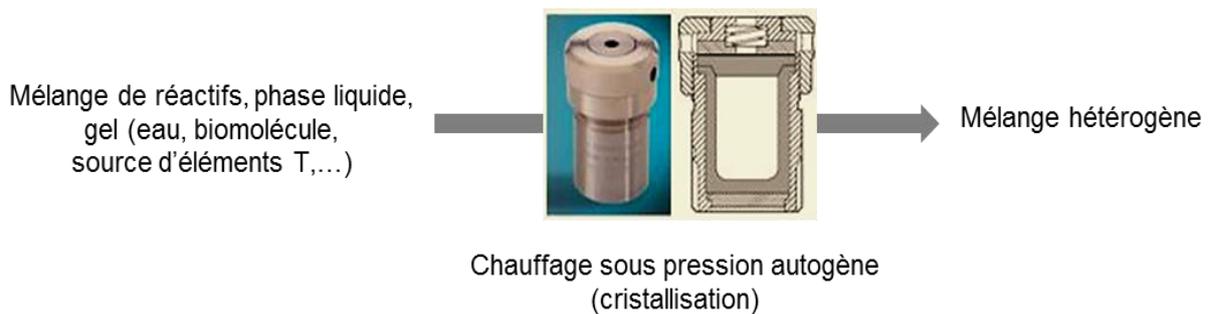


Figure I-9. Déroulement d'une synthèse hydrothermale.

La nature du produit obtenu dépend de plusieurs paramètres, tels que la température qui fixe la pression, le pH, la nature des réactifs et leur proportion relative, les durées de murissement et de cristallisation, etc. Il est souvent possible de contrôler la taille et la forme des particules, ainsi que la cristallinité du produit final.

Les sources d'éléments T : P, (Al, Zn,...) sont souvent introduites sous forme d'oxydes, d'hydroxydes, de chlorure, de nitrate qui sont solubilisées si besoin par les agents minéralisateurs ajoutés. Jusqu'en 1978, le seul minéralisateur employé (alors pour la synthèse des zéolithes) était l'anion OH⁻ qui participe également à des réactions de condensation conduisant à l'édification de la charpente minérale. Les pH de synthèse sont alors relativement élevés (entre 11 et 14). À partir de 1978, les anions fluorure ont été utilisés pour synthétiser la zéolithe purement silicique appelée Silicalite-1 (type structural MFI) [56]; le pH du milieu

réactionnel est dans ce cas compris entre 5 et 9. La synthèse des métallophosphates s'effectue typiquement à des pH moins élevés que pour la synthèse des zéolithes. Leur valeur est souvent comprise entre 3 et 9, et dépend de la nature et de la concentration des réactifs introduits dans le milieu réactionnel.

La source principale de phosphore employée est l'acide phosphorique H_3PO_4 . Notons les utilisations beaucoup moins fréquentes de Na_2HPO_4 [57], $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ [58] et du triéthylphosphite [59] par exemple.

L'agent directeur de structure/structurant joue le rôle de « *template* ». Dans le cas de la synthèse des métallophosphates microporeux, le template peut être de nature inorganique (cations alcalins (Na^+ , K^+ , ...) ou alcalino-terreux) ou souvent organique (amines (pipérazine, diaminopropane, ...)), ammoniums quaternaires (tétraméthylammonium, ...), etc [35]. Il contrôle, par un effet de matrice, l'édification de la charpente minérale. Il contribue, par les liaisons qui s'établissent, à la stabilisation de la structure. Il est à l'origine de l'espace poreux disponible après son élimination totale ou partielle.

De nouveaux matériaux poreux ou de nouvelles structures sont possibles d'obtenir grâce à l'utilisation d'agents structurants originaux, en fonction de leurs taille, forme, caractère hydrophile ou hydrophobe par exemple, ou en modifiant des conditions de synthèse déjà établies. La Figure I-10 illustre l'influence de la taille de l'agent structurant sur la porosité. Des cations ammoniums quaternaires contenant des chaînes alkyles comprenant par exemple 3 atomes de carbone conduiront à la synthèse de solides microporeux, alors que des solides mésoporeux peuvent être obtenus si une chaîne alkyle contient 10 à 20 atomes de carbone.

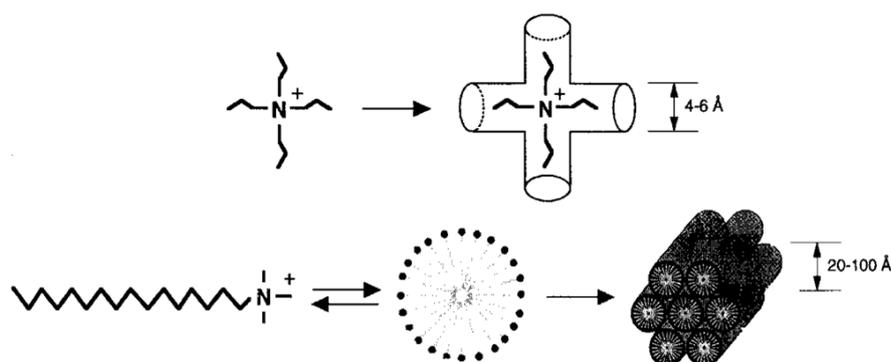


Figure I-10. Influence de la taille de l'agent structurant sur la taille des pores. Obtention d'un solide microporeux (en haut), d'un solide mésoporeux organisé (en bas).

La mésoporosité est générée grâce à l'utilisation de tensio-actifs qui, en fonction de leur concentration dans le solvant, et de la température, forment différents arrangements micellaires (micelles lamellaires, cylindriques, assemblage hexagonal de micelles cylindriques ...) (Figure I-11).

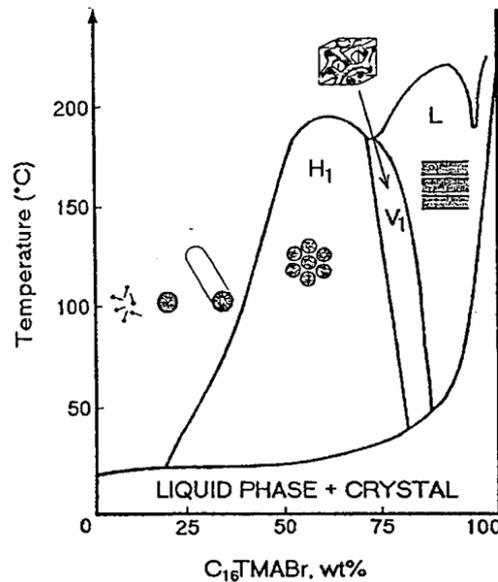


Figure I-11. Diagramme de phases schématisé de $C_{16}TMABr$ dans l'eau [60].

Des mésopores ont pu être générés grâce à l'utilisation :

- Des bromures d'hexadécyltriméthylammonium [61] et de cétyltriméthylammonium (CTMA) [62] pour la synthèse de phosphates de zirconium.
- De tensio-actifs de type $CH_3(CH_2)_nN(CH_3)_3Br$ avec $n = 7, 11, 15$ ou 17 pour la synthèse de phosphate de titane [63].
- De chlorure de cétyltriméthylammonium [64] et de $(CH_3)_nNH_2$ avec $n = 12, 14$ et 15 [65] pour la synthèse d'aluminophosphates.

Les principaux travaux sur la synthèse des métallophosphates mésoporeux sont regroupés dans la revue de Lin *et al.* (2013) [9].

La macroporosité observée dans les métallophosphates peut être induite également par un tensio-actif. L'utilisation d'un polyoxyde d'éthylène (Brij56) en quantité variable a permis de synthétiser des phosphates de titane avec des macropores de taille variable (Figure I-12(b-d)) [66]. Par ailleurs, Zhu *et al.* (2016) [44] décrivent la synthèse de monolithes méso/macroporeux de métallophosphates de zirconium par voie sol-gel. La mésoporosité est

due à la présence de glycérol alors que les macropores sont générés à partir du peroxyde d'éthylène et du polyacrylamide (Figure I-7(a-b)). En outre, les phosphates de calcium sont les matériaux les plus étudiés sous la forme de structure macroporeuse : c'est le cas de l'hydroxyapatite (HA) ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). La macroporosité peut être générée de plusieurs façons décrites dans l'article de Sopyan *et al.* (2007) [52] et résumées ci-dessous :

- Ajout dans le milieu réactionnel de composés qui, en se décomposant/se vaporisant/se sublimant sous l'effet de la température libèrent les pores. Ces composés peuvent être une paraffine, du naphthalène, de l'amidon, de la farine, du peroxyde d'hydrogène ou des polymères (poly(butyril vinylique),...) par exemple. Le diamètre des macropores varie entre 0,1 à 5000 μm .
- Ajout dans le milieu réactionnel de porogènes (mélange alcool polyvinylique + chlorure de sodium, ...). Après avoir été comprimée par compression isostatique à froid, la poudre est lavée à l'eau qui entraîne le polymère (soluble) libérant ainsi la macroporosité. Le diamètre des macropores varie entre 250–400 μm (Figure I-8(a)) [53].
- Utilisation d'un support/réactif naturel déjà macroporeux. Par exemple le carbonate de calcium présent dans le squelette du corail (macroporeux) peut réagir avec des ions phosphates pour former de l'hydroxyapatite [52]. Le diamètre des pores est compris entre 200-500 μm . La société Biomet UK Ltd commercialise par ailleurs une poudre d'hydroxyapatite macroporeuse Endobon[®] obtenu à partir d'os spongieux (Figure I-8(b)) [54].
- Utilisation d'agents moussant tels que le peroxyde d'hydrogène, des sels sous forme de carbonate, de la levure chimique. Ajoutés à des suspensions d'hydroxyapatite sous agitation, ces agents provoquent la formation de mousse faisant apparaître des pores de diamètre compris entre 30–600 μm .
- Utilisation d'un substrat polymérique macroporeux (éponge). Le principe consiste à imprégner une éponge polymérique avec une suspension d'hydroxyapatite afin de répliquer la structure macroporeuse.

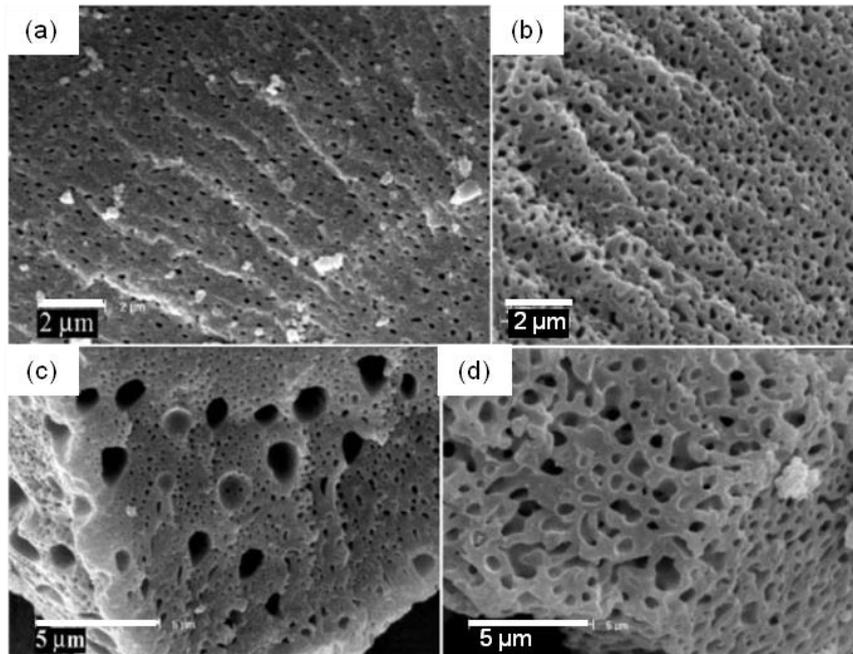


Figure I-12. Images de MEB de phosphates de titane synthétisés : (a) en absence de poly(oxyde d'éthylène) (agent structurant), (b) 5 %, (c) 10 %, et (d) 15 % d'agent structurant [66].

Enfin, le **solvant** est souvent l'eau. Dans le cas des synthèses hydrothermales, l'eau permet la dissolution du gel contenant les éléments de la charpente minérale. Mais elle peut jouer également le rôle d'agent structurant lors de la cristallisation. Un tel effet a été mis en évidence lors de la synthèse de l'aluminophosphate VPI-5 [67] où l'eau agit pour orienter la croissance du matériau et se retrouve occluse dans la structure. Par ailleurs, la cristallisation du produit final dépend de sa solubilité dans l'eau à la température de synthèse ($< 200\text{ °C}$).

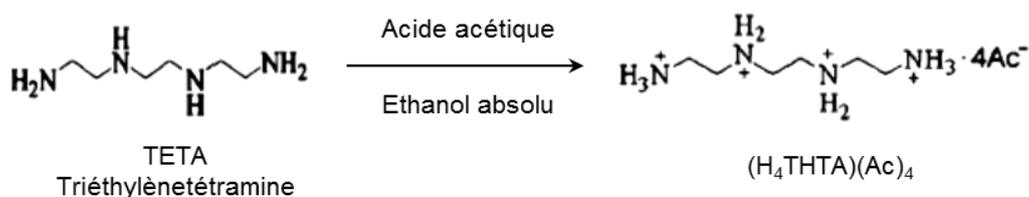
Dans certains cas des solvants non aqueux (organiques) sont utilisés (éthylène glycol, éthanol, méthanol, pyridine,...). En ce qui concerne les synthèses solvothermales, indépendamment des teneurs en solvant organique dans le milieu de synthèse, il a été montré que de l'eau doit être présente, même à l'état de traces, afin que les réactions d'hydrolyse et de condensation puissent s'effectuer. Sa présence permet également de moduler la polarité du milieu de synthèse par des mélanges mixtes d'eau et de solvants organiques tels que le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde ou l'éthylène glycol. Cela a conduit à la formation de nouvelles structures à partir d'espèces chimiques (agent structurants organiques,...) déjà connues.

Par ailleurs, il existe certains aluminophosphates comme l' $\text{AlPO}_4\text{-20}$ [15] par exemple qui cristallisent aussi bien en milieux aqueux que dans des conditions solvothermales, alors que

d'autres ne se forment qu'en milieu organique comme les aluminophosphates $\text{AlPO}_4\text{-GIS}$ [68] et $\text{AlPO}_4\text{-UT6}$ [69] par exemple.

Dans certains cas, le solvant organique peut se dégrader *in situ* dans le milieu de synthèse et générer le structurant organique. C'est le cas pour la synthèse des aluminophosphates Mu-7 (méthylformamide générant la méthylamine) [70] et Mu-4 (diéthylformamide générant la diéthylamine) [71] ainsi que du gallophosphate Mu-35 [72], par exemple.

Les solvants utilisés pour les synthèses ionothermales sont des liquides ioniques [73]. Ils ont souvent des structures chimiques similaires aux structures des composés utilisés comme agents directeurs de structure (ADS)/template dans les synthèses hydrothermales des zéolithes et autres solides poreux. Un avantage dans ce type de synthèse est qu'il n'y a plus de compétition entre le solvant et l'ADS dans les interactions qu'ils exercent avec les cristallites/cristaux. Les synthèses ionothermales d'aluminophosphates de type zéolitique sont celles qui ont remporté rapidement du succès en permettant de préparer des matériaux de structures connues [74-77] et inconnues [78]. Rapidement des métaux ont été introduits dans les charpentes (Si [79], Co, Mg,...). Plus récemment, Li *et al.* (2013) ont réussi à synthétiser notamment un zincophosphate nommé ZnPO-TETA1, de structure déjà connue présentant une charpente 3D faisant apparaître un système de canaux monodimensionnel dont les ouvertures sont délimitées par cycles à 8 T [80]. Le liquide ionique employé est alors $(\text{H}_4\text{THTA})(\text{Ac})_4$ préparé selon la réaction suivante.



Zhao *et al.* (2012) ont quant eux préparé un SAPO-5 présentant des mésopores à partir du mélange pentaérythritol + chlorure de choline [81].

La revue de Wang *et al.* (2012) permet de faire le point sur : « *The Research Progress in Ionothermal Synthesis of Molecular Sieves* » [82].

I.2.4. Propriétés et applications

Les métallophosphates poreux possèdent des propriétés physico-chimiques différentes grâce aux diverses compositions chimiques et types de structure qu'ils présentent, comme mentionné précédemment. Les principaux domaines d'applications sont explicités ci-après :

I.2.4-1. En catalyse acido-basique

Des aluminophosphates de type SAPO-n (silicoaluminophosphate) notamment sont utilisés en catalyse en raison de leurs propriétés acides. Parmi eux, les silicoaluminophosphates SAPO-34 (type structural CHA) et SAPO-11 (type structural AEL) sont par exemple inclus dans des procédés industriels de conversion du méthanol en essence [83] et d'isomérisation des n-paraffines sur un catalyseur bi-fonctionnel contenant du platine [84] respectivement. Par ailleurs, les composés Cu/SAPO-34 [85] ou Fe/SAPO-34 [86] réduisent sélectivement le monoxyde d'azote en présence d'hydrocarbures.

D'un autre côté, des travaux dans la littérature reportent l'utilisation des zincophosphates microporeux en catalyse acide car leur charpente peut être chargée négativement. C'est le cas des zincophosphates de types structuraux FAU et CZP. Ce dernier a été testé dans les réactions de condensation de Knoevenagel et d'addition de Michael, par exemple [87, 88]. Cependant, la faible stabilité thermique des zincophosphates microporeux et l'effondrement de leur structure à des températures au-delà de 500 °C n'a pas permis leur développement à l'échelle industrielle contrairement aux silicoaluminophosphates.

I.2.4-2. En adsorption

Les métallophosphates font partie des matériaux prometteurs pour la transformation de la chaleur d'adsorption (procédés HAT, *Adsorption Heat Transformation* en anglais) [89, 90]. Leur affinité pour l'eau est plus faible que pour les zéolithes (aluminosilicates) mais plus forte que pour les silicates mésoporeux. Ainsi la chaleur d'adsorption dégagée lors de l'adsorption de l'eau reste suffisante dans certains cas. C'est ainsi que des adsorbants de type AIPO sont déjà commercialisés par Sortech [91] et Mitsubishi Plastics [92]. L'hydrophilie modérée de ces aluminophosphates est due à la différence d'électronégativité entre l'aluminium et le phosphore.

Par ailleurs E-P. Ng *et al.* (2009) ont montré que certains aluminophosphates microporeux permettaient de piéger sélectivement l'eau présente dans des lubrifiants augmentant ainsi la durée de vie de ces huiles minérales [93].

I.2.4-3. En optique

Parmi les métallophosphates, le zincophosphate $Zn_3(PO_4)_2$ possède des propriétés optiques intéressantes lorsqu'il est dopé avec des éléments chimiques qui émettent une luminescence différente comme les métaux de transition (Mn^{2+} , Ag^+ , Cu^+ , ...) et les terres rares (Eu^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , ...) qui présentent des structures électroniques particulières. Par exemple, $Zn_3(PO_4)_2:Mn^{2+}$ est typiquement un matériau phosphorescent efficace utilisé dans les tubes cathodiques pour la télévision en couleurs [94]. En outre, des composants $Zn_3(PO_4)_2:Eu^{3+}$ ont aussi montré des propriétés luminescentes lorsqu'ils sont excités par des irradiations UV [95, 96]. Des propriétés photoluminescentes similaires ont été observées avec les phosphates YPO_4 et $LaPO_4$ [97, 98].

I.2.4-4. En catalyse d'oxydoréduction

Les phosphates de fer permettent l'oxydation du méthane en formaldéhyde [99]. De même, ces matériaux (de type $LiFePO_4$, $Li_3Fe_2(PO_4)_3$ par exemple) sont utilisés comme électrodes (cathodes) possédant une haute capacité dans les batteries au lithium [100]. Récemment une étude a reporté l'obtention d'un matériau phosphate de fer au lithium et au manganèse poreux ($LiMFP = LiMn_{0,6}Fe_{0,4}PO_4$) qui montrait une conductivité électrique élevée grâce en partie à la présence de méso- et macroporosités qui facilitent la diffusion des ions lithium. Pour ces raisons $LiMFP$ semble attractif comme substitut par exemple des cathodes de $LiCoO_2$ communément utilisées dans les batteries au lithium [101]. D'un autre côté, des phosphates de zirconium sont largement étudiés grâce à leurs propriétés électrocatalytiques. Par exemple Tian *et al.* (2010) ont montré que le phosphate de zirconium mésoporeux qu'ils ont préparé possédait une activité remarquable dans la réduction de l'oxygène par rapport aux électrodes commerciales à base de dioxyde de manganèse électrolytique (EMD) [102].

Enfin divers composés de type $MeAPO$ présentent des propriétés d'oxydo-réduction intéressantes. Comme le rappellent Arends *et al.* (1997) dans leur revue, le composé $CrAPO-5$ catalyse l'oxydation allylique des oléfines en énones correspondantes, et permet qu'une variété de substrats terpéniques soit oxydée en cétones insaturées [103]. Les $CoAPO-5$ et -11 permettent par ailleurs l'autoxydation du *p*-crésol en *p*-hydroxybenzaldéhyde [103].

I.2.4-5. Dans les domaines biomédical et environnemental

Les principales avancées dans ces domaines seront discutées dans le paragraphe suivant car elles concernent les applications émergentes envisagées pour les matériaux métallophosphates synthétisés dans le cadre de cette thèse.

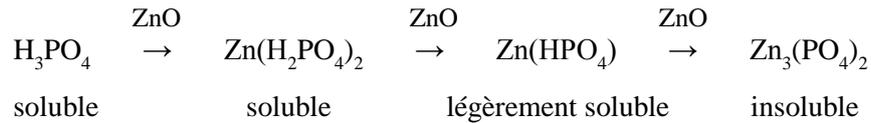
I.2.5. Applications biomédicales et environnementales

Dans le **domaine dentaire**, les phosphates de zinc sont utilisés comme ciments de scellement grâce à leur bonne adhésion avec le tissu osseux ou un autre ciment dentaire, leur haute résistance mécanique, leur faible solubilité dans les milieux eau/biologique et leur biocompatibilité¹ [104, 105]. Ces matériaux (Figure I-13) représentent une alternative aux alliages d'amalgame de mercure et de certaines résines qui contiennent des ingrédients capables de produire des effets indésirables chez l'homme tels que des réactions allergiques, inflammations, etc., lors de leur relargage dans la salive [106]. Quelques études ont par exemple reporté la présence de métaux (cobalt, cuivre, nickel,...) provenant des alliages dentaires dans les tissus buccaux, la salive et des milieux de culture cellulaire après incubation, alors que plusieurs de ces métaux se sont révélés être cytotoxiques² dans des études *in vitro* [107-109]. D'un autre côté, quelques études seulement concernent la cytotoxicité de certaines céramiques communément utilisées à ce jour pour des restaurations dentaires [110, 111].

Les ciments au phosphate de zinc sont obtenus par mélange d'une poudre et d'un liquide (Figure I-13). De couleur jaune, la poudre est formée presque essentiellement d'oxyde de zinc ZnO (88 %) avec 1,5 à 10,0 % d'oxyde de magnésium MgO (pour augmenter la résistance à la compression), de la silice SiO₂ (1 %), du sulfate de baryum BaSO₄, de l'oxyde de rubidium Rb₂O₃ ou de l'oxyde de bismuth Bi₂O₃ qui sont radio-opacifiants. Après mélange de ces composés, les dimensions des grains sont ramenées en-dessous de 20 à 40 µm maximum. Le liquide, incolore, est formé par 66 % de H₃PO₄ et 33 % d'eau. L'action de l'acide phosphorique sur la poudre se traduit par la formation successive de divers phosphates provoquant une diminution régulière de la solubilité du mélange. Ceci a été attribué à la formation de Zn₃(PO₄)₂, substance insoluble dans l'eau, selon les réactions suivantes [112] :

¹ La biocompatibilité est définie comme la capacité d'un matériau à effectuer une action spécifique sans interférer avec ou dégrader le milieu biologique dans lequel il est utilisé.

² La cytotoxicité est la propriété d'un agent chimique ou biologique d'être toxique pour les cellules.



Les phases présentes dans le ciment dentaire sont essentiellement amorphes. Le pH est acide à la fin du malaxage ce qui provoque une légère irritation de la pulpe dentaire avant la prise du ciment. Il tend rapidement vers la neutralité, ce qui permet d'expliquer la tolérance de ces ciments par les tissus dentaires. Après quelques semaines, le zincophosphate $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ s'est hydraté jusqu'à sa forme cristalline $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ appelée hopéite. La formation de ce composé est favorisée par la température et l'humidité de la bouche. Des études indiquent que le zincophosphate tétrahydraté a une tendance plus élevée à la dissolution que le zincophosphate dihydraté dans des milieux aqueux, ce qui diminue la stabilité chimique des ciments principalement aux valeurs de pH acides agressifs de 4,9 où une carie est active et où la dénudation du collet dentaire a lieu [113].



Figure I-13. Ciment phosphate commercial utilisé pour des restaurations dentaires. À droite : provisoire au ciment phosphate (solide blanc).

D'un point de vue bactériologique, certains travaux mentionnent la possible activité antibactérienne des ciments dentaires à base de zincophosphates sur la bactérie *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) présente dans la salive et responsable des irritations, sensibilités et caries dentaires [114]. Des études associent cette activité antibactérienne aux ions Zn^{2+}

probablement relargués, ce qui aurait un effet bactériostatique (inhibiteur) conduisant à l'arrêt de la prolifération des *S. mutans* [115]. Par exemple, Wunder *et al.* (1999) ont constaté que l'activité de l'enzyme glucosyltransférase des *S. mutans*, importante pour leur adhésion et colonisation de la surface dentaire, est inhibée par les ions Zn^{2+} [116]. Pour cette raison, le zinc est ajouté dans de nombreux produits bucco-dentaires, notamment les dentifrices. Similairement, les ions Zn^{2+} semblent avoir des propriétés antibactériennes sur d'autres bactéries orales comme la *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) [117]. Des nouveaux matériaux d'hydroxyapatites dopées avec des ions zinc ont aussi démontré être favorables pour le relargage du Zn^{2+} qui possède une activité antibactérienne sur différentes bactéries de la flore buccale, telles que *A. actinomycetemcomitans*, *F. Nucleatum* et *S. mutans* [118].

Dans les **domaines de l'orthopédie et de l'ingénierie tissulaire osseuse**, les biocéramiques à base de phosphates de calcium, notamment d'hydroxyapatite ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$) sont utilisées depuis longtemps comme implants et substituts osseux car elles présentent des caractéristiques qui se rapprochent de l'os et sont biocompatibles. Ainsi, des structures macroporeuses d'hydroxyapatite favorisent la prolifération cellulaire grâce à des interactions spécifiques entre les surfaces, les fluides biologiques et les cellules comme les échanges ioniques, l'adhésion et l'activité cellulaire [119, 120]. Ces matériaux sont appelés biomatériaux qui en accord avec la définition donnée par D. F. Williams (1999), *sont donc des matériaux destinés à interagir avec des systèmes biologiques pour évaluer, traiter, augmenter ou substituer n'importe quel tissu, organe ou fonction du corps* [121]. Une définition plus actuelle a été proposée par le même auteur en 2009, indiquant qu'un *biomatériau est une substance qui a été conçue pour prendre une forme qui, seule ou dans le cadre d'un système complexe, est utilisée pour diriger, par le contrôle des interactions avec des éléments de systèmes vivants, le déroulement de toute procédure thérapeutique ou diagnostique, dans la médecine humaine ou vétérinaire* [122].

À titre d'exemple, la Figure I-14 montre des clichés de microscopie électronique à balayage de travées osseuses qui forment un réseau poreux composé de cristaux d'hydroxyapatite et de fibres de collagène, et une image d'implants osseux poreux à base de phosphates de calcium.

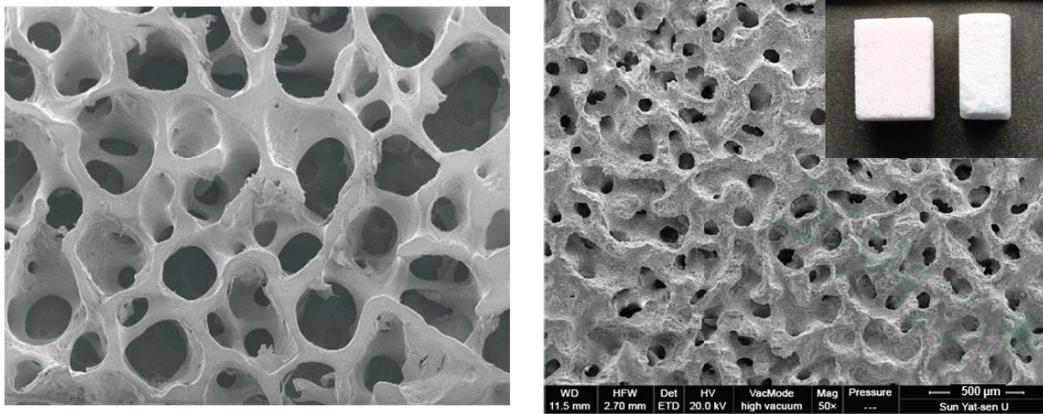


Figure I-14. Clichés MEB d'os spongieux ou trabéculaire (200 X, la référence ne rapporte pas d'information sur l'échelle du cliché) (à gauche) [123] et d'implants osseux composés d'hydroxyapatite (à droite) [124].

De nouveaux biomatériaux pour la reconstruction osseuse ont été obtenus à partir de la substitution des ions calcium des phosphates de calcium (l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), le phosphate tricalcique β ,...) par des ions zinc [125-127]. Les travaux décrivant ces nouveaux matériaux ont révélé des effets positifs sur la stimulation de la régénération osseuse, ce qui est attribué principalement aux ions Zn^{2+} libérés et leur rôle important sur l'amélioration de l'activité ostéoblastique et donc sur la formation du tissu osseux. De même, des études indiquent que la biocompatibilité à long terme de ces matériaux en tant qu'implants osseux peut être augmentée en fonction de la taille et de la forme des cristaux, et du rapport des composants (Ca^{2+} , Zn^{2+} , PO_4^{3-}) [128-130].

Par ailleurs, une autre application intéressante des biomatériaux à base de phosphates de calcium est leur utilisation comme supports pour la libération contrôlée de substances actives (antibiotiques, analgésiques, anti-cancer,...) [131-133]. Cette application est attrayante pour le traitement des différentes maladies de l'os, telles que l'ostéoporose, l'ostéomyélite ou les tumeurs osseuses par exemple.

Plus de renseignement sur les biomatériaux à base de phosphates de calcium sont fournis dans l'article de Combes *et al.* (2013) [134].

Dans le **domaine de l'environnement et plus particulièrement du traitement de l'eau**, l'utilisation des phosphates a été depuis longtemps liée à l'élimination par adsorption des polluants chimiques (colorants, métaux lourds, autres additifs provenant de l'industrie textile, minérale,...) qui représentent une menace constante pour l'environnement.

L'hydroxyapatite en particulier est un matériau idéal pour l'élimination de polluants à long terme en raison de sa capacité élevée d'adsorption des métaux lourds, de sa faible solubilité dans l'eau, de sa haute disponibilité et stabilité sous conditions d'oxydo-réduction [135]. Les adsorptions de a) métaux lourds (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , ...) [136], b) diverses molécules organiques toxiques comme des colorants (tartrazine, alizarine, ...) [137] et c) pesticides (nitrobenzène, tribenuron méthyl) [138] ont été reportées dans la littérature. Elles sont réalisées *via* des mécanismes d'échange d'ions, de dissolution/précipitation et de formation de complexes en surface de l'hydroxyapatite.

Des travaux sur les phosphates de calcium, notamment l'hydroxyapatite poreuse, suggèrent qu'il est possible d'utiliser ces matériaux en tant que filtres pour le traitement des eaux usées domestiques grâce à leur structure poreuse [139] et leur capacité d'adsorption des polluants comme mentionné précédemment. De même, la non-toxicité de l'hydroxyapatite favorise son application dans le cas de la purification de l'eau d'usage domestique ou médical.

La macroporosité des phosphates de calcium est en particulier de grand intérêt pour la décontamination microbienne de l'eau car lors d'une filtration, les bactéries de petite taille avec une moyenne de 0,5 à 5,0 μm de diamètre, peuvent rester bloquées dans la porosité du filtre. La Figure I-15 montre des images de MEB d'un filtre d'hydroxyapatite utilisé pour le traitement d'eau contaminée avec *Escherichia coli* (*E. coli*) [140]. D'après l'étude, la décontamination microbienne est réalisée grâce à deux processus : l'adsorption des bactéries sur l'hydroxyapatite et l'effet barrière des macropores.

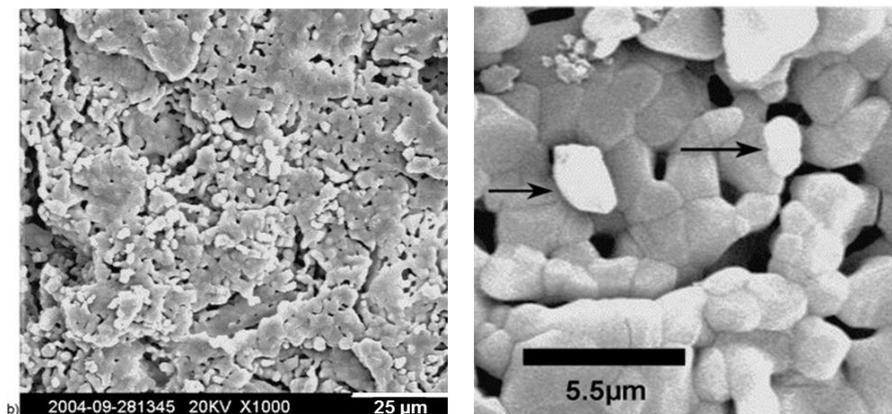


Figure I-15. Images de MEB d'un matériau à base d'hydroxyapatite utilisé comme filtre. L'image à droite est un agrandissement de la zone centrale de l'image de gauche. Des cellules d'*E. coli* signalées par des flèches sont gonflées à cause des conditions de vide dans le microscope [140].

I.3. Synthèse de métallophosphates poreux biosourcés

I.3.1. Pourquoi les métallophosphates biosourcés ?

Rappelons tout d'abord que le phosphore est un élément fertilisant majeur, indispensable pour nourrir la plante. Il participe à d'importantes liaisons biochimiques et influence ainsi l'ensemble du métabolisme végétal. C'est lui qui véhicule l'énergie produite par photosynthèse. Il est également essentiel pour les autres êtres vivants. Il est nécessaire à la calcification osseuse et dentaire.

Par ailleurs, les phosphates naturels minéraux (guano ou phosphates d'origine sédimentaire) ont été très utilisés, notamment dans les sols acides où le phosphore est un des nutriments limitant pour les plantes. Ils sont utilisés seuls ou plus souvent associés à de l'azote et du potassium (engrais NPK) [141, 142]. Si les phosphates sont normalement présents et utiles à faible dose dans l'eau et les sols, leur excès est (avec celui des nitrates) une des causes majeures de l'eutrophisation voire de dystrophisation de l'environnement. La majeure partie des ressources naturelles de phosphore se trouve dans les roches phosphatées des dépôts sédimentaires et ignés, dont les gisements les plus exploités se trouvent en Chine, au Maroc et Sahara occidental, aux Etats Unis et en Russie [143]. Les trois principaux pays producteurs de phosphate assuraient 70,7 % de la production mondiale en 2015.

L'apatite, un minerai à base de phosphates de calcium ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$) est le principal constituant des roches phosphatées. On estime qu'environ 82 % du total de ces roches phosphatées exploitées sont utilisées pour l'élaboration d'engrais, 5 % pour l'alimentation du bétail, un petit pourcentage pour l'alimentation des autres animaux, et le reste à des fins industrielles [144, 145].

Vu l'importance du phosphore et de sa demande constante, la durée des gisements de phosphore exploitables est un sujet constant de discussions et de débats. L'hypothèse a par exemple été émise que le niveau d'exploitation des roches phosphatées aurait un pic dans les années 2033 et 2034. Les réserves diminueront ensuite petit à petit et suivra une période de carence (la demande dépassera l'offre) [145]. De plus la liquidation totale, donc jusqu'à épuisement des stocks, au rythme actuel de la consommation mondiale est prévue dans quelques centaines d'années [143, 145]. De sérieuses conséquences seront alors observées notamment dans l'agriculture pour laquelle jusqu'à maintenant il n'est pas encore connu de substitut au phosphore. De plus une envolée des prix du phosphore ferait des engrais un produit de luxe et creuserait encore les inégalités socioéconomiques entre pays développés et

en voie de développement. Les stocks de roches phosphatées restants étant de moins bonne qualité, leur exploitation deviendrait non seulement plus coûteuse mais aussi plus polluante.

L'acide phosphorique (H_3PO_4) est le principal composé produit lors du traitement des roches phosphatées. C'est un produit corrosif très utilisé en laboratoire et dans l'industrie. Il est employé dans les boissons non alcoolisées comme régulateur de pH (E338), principalement dans les sodas et colas. Il intervient dans la fabrication des engrais, des détergents, des ciments dentaires par exemple. Il sert aussi à la phosphatation de pièces métalliques pour les protéger de l'oxydation à l'air libre, et sert d'électrolyte dans les piles à combustibles PAFC « *Phosphoric Acid Fuel Cells* ». Il constitue le principal acide inorganique produit en quantité et le second plus abondant en volume après l'acide sulfurique [146, 147].

Dans le domaine de la synthèse de matériaux, dont les métallophosphates, l' H_3PO_4 est le réactif classiquement utilisé comme source de phosphore [35]. L'épuisement des gisements de roches phosphatées aura donc un impact direct sur l'approvisionnement de l'Industrie en métallophosphates.

La préparation de métallophosphates biosourcés, c'est-à-dire de métallophosphates synthétisés à partir de réactifs ne dépendant plus (ou beaucoup moins) des gisements de roches phosphatées, apparaît donc nécessaire. L'utilisation de réactifs issus du vivant (animal et végétal) devient indispensable. De plus cette perspective de synthèse biosourcée permettra d'établir des voies de synthèse « propres » plus respectueuses de l'environnement, ce qui est considérée comme essentiel pour l'industrie du futur [148, 149]. Elle permettra également de remplacer des réactifs dérivant du pétrole par des composés renouvelables car, comme nous le verrons par la suite, les molécules biosourcées peuvent/pourraient avoir d'autres rôles.

Enfin, parmi les solides poreux, les métallophosphates revêtent un intérêt particulier car ils sont utilisés dans des domaines très variés comme détaillé précédemment et représentent des matériaux prometteurs dans certains domaines.

Actuellement, la synthèse de métallophosphates biosourcés n'est pas encore très développée. En effet, nous avons trouvé peu d'articles (résumés par la suite) dans la littérature.

I.3.2. Intérêts de l'utilisation des biomolécules phosphorées

Ces molécules présentent plusieurs avantages détaillés dans les paragraphes suivants.

I.3.2-1. Source de phosphore

Les biomolécules phosphorées représentent une source potentielle de phosphore pour la synthèse de métallophosphates poreux. Le phosphore est alors dit « organique ». Ces biomolécules phosphorées incluent les phosphoprotéines, les nucléotides, les phospholipides, les acides nucléiques, le NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphates, une coenzyme d'oxydo-réduction), etc. [150]. Certaines d'entre elles sont décrites ci-après :

a. Phosphoprotéines

Les phosphoprotéines sont tout d'abord des protéines, c'est-à-dire des macromolécules biologiques formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. Ces chaînes sont constituées de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Généralement, une protéine contient au moins une cinquantaine de résidus dans la molécule. Les protéines peuvent être phosphorylées, c'est-à-dire qu'un groupement phosphate (un phosphoryl PO_3^{2-} plus précisément) est transféré aux protéines. Il se fixe préférentiellement sur les résidus de sérine, thréonine, tyrosine, acide aspartique et histidine [151]. Les phosphoprotéines les plus classiques sont la caséine du lait et la phosvitine du jaune d'œuf [152, 153]. Dans le cadre de nos travaux nous avons étudié la caséine.

Caséine

La caséine est une phosphoprotéine abondante du lait constituée par quatre principaux types de caséines, α_{S1} -, α_{S2} -, β - et κ -caséine, lesquelles sont phosphorylées sur des résidus de sérine et contiennent 8, 9–11, 5 et 1 groupes phosphates respectivement [153]. La quantité de caséines d'un lait varie selon sa source et, en général, les laits des ruminants contiennent une proportion élevée de caséines de l'ordre de 80 %. Cette proportion n'est que de 30 % dans le lait humain [154]. La proportion des différentes caséines varie également en fonction de la provenance du lait (Tableau I-1). Par exemple la β -caséine est la principale caséine des laits humain et caprin, alors que les α_{S1} -, α_{S2} -caséine sont principalement présentes dans le lait des ruminants, et la κ -caséine en est le composant mineur. Cependant, malgré la variation des teneurs des caséines du lait de différentes espèces, les caséines forment toujours des micelles colloïdales, avec une structure assez similaire, permettant le transport du calcium.

Tableau I-1. Composition (%) des caséines dans le lait humain, de vache et de chèvre [153].

| | α_{s1} -caséine | α_{s2} -caséine | β -caséine | κ -caséine |
|--------|------------------------|------------------------|------------------|-------------------|
| Humain | trace | trace | 70 | 27 |
| Vache | 38 | 10 | 40 | 12 |
| Chèvre | 5–17 | 6–20 | 50 | 15 |

La caséine du lait de vache en particulier joue un rôle important dans la production du fromage et de la plupart des produits laitiers. C'est l'une des raisons pour laquelle elle est largement étudiée depuis longtemps. La définition de sa structure a été l'objet de constants débats parmi les chercheurs [155, 156]. À présent, la théorie la plus acceptée est celle d'avoir une structure micellaire et sub-micellaire telle que proposée par Schmidt (1982) [157] qui est illustrée dans la Figure I-16. Elle suggère qu'une micelle de caséine (50 à 500 nm de diamètre) est composée d'agrégats de sub-micelles (15 à 20 nm de diamètre) maintenues ensemble par des liens de phosphate de calcium colloïdal $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (CCP « *Colloidal calcium phosphate* ») attachés aux résidus de phosphosérine de la caséine (-SerP-). La composition des micelles au centre et en périphérie est différente. Les sub-micelles sont constituées d'un noyau hydrophobe formé par les parties apolaires des caséines. Les résidus chargés, riches en groupements phosphoriques, des α_{s1} -, α_{s2} -, β -caséine créeraient une enveloppe hydrophile dans laquelle les groupements carboxyliques et glucidiques de la κ -caséine occuperaient une place plus ou moins privilégiée (Figure I-16(a)). Les liaisons entre les sub-micelles résulteraient d'interactions électrostatiques entre les groupements phosphosérines négativement chargés des α_{s1} -, α_{s2} -, β -caséine et le phosphate de calcium colloïdal positivement chargé, formant de ponts phosphocalciques (Figure I-16(b)). La croissance micellaire serait conditionnée par les zones riches en κ -caséine, pauvres en phosphosérine, et s'arrêterait lorsque toute la surface de la micelle en serait constituée [157]. L'intégrité de la structure micellaire de la caséine est maintenue par les liaisons phosphate de calcium formées. En général, les auteurs indiquent que la micelle de caséine présente 94 % de protéines et 6 % de produits minéraux tels que le phosphate de calcium [156].

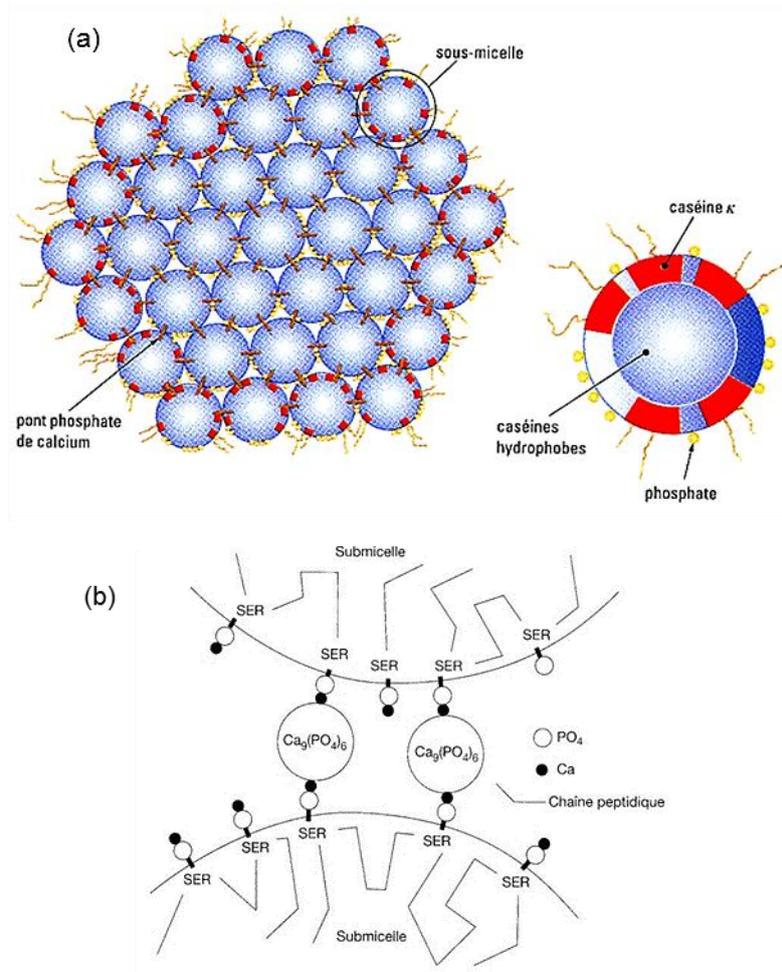


Figure I-16. (a) Modèle micellaire de la caséine avec sous-unités (sub-micelles). Représentation du modèle de Schmidt par [158], et (b) vue du pontage des sous-unités micellaires par le phosphate de calcium [154].

La Figure I-17 montre des clichés MEB de micelles de caséine du lait de vache reportés par Douglas *et al.* (2004) [159]. Ils révèlent une morphologie plus ou moins sphérique. D'autre part, les micelles semblent avoir un volume important, en partie due au haut degré d'hydratation que la caséine présente. À titre de référence, le Tableau I-2 résume les principales caractéristiques des micelles de caséine.

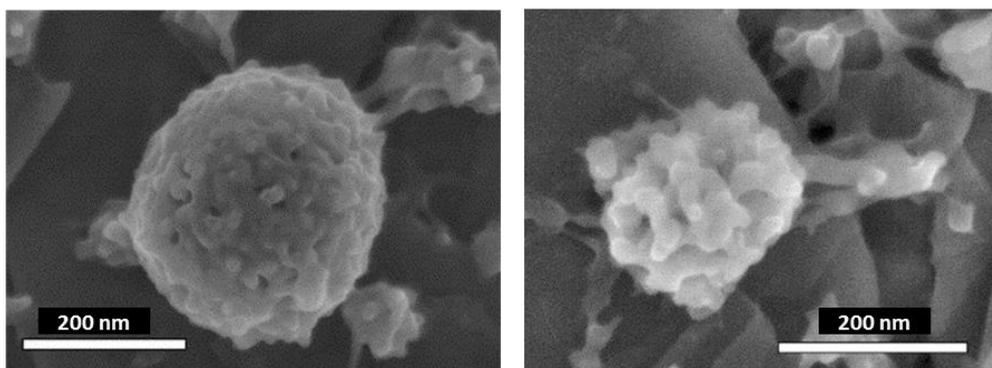


Figure I-17. Images de MEB à haute résolution de la structure micellaire de la caséine du lait de vache [159].

Tableau I-2. Caractéristiques physico-chimiques moyennes des caséines du lait de vache [160].

| Caractéristique | Valeur |
|----------------------------------|--|
| Diamètre | 120 nm (intervalle: 50–500 nm) |
| Surface | $8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ |
| Volume | $2,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$ |
| Densité (hydraté) | $1,0632 \text{ g. cm}^{-3}$ |
| pI (point isoélectrique) | 4,6–4,8 |
| Teneur en eau | 63 % |
| Hydratation | $3,7 \text{ g H}_2\text{O. g}^{-1} \text{ protéine}$ |
| Voluminosité | $44 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ |
| Masse molaire (hydraté) | $1,3 \times 10^9 \text{ Da}$ |
| Masse molaire (déshydraté) | $5 \times 10^8 \text{ Da}$ |
| Nombre de particules par mL lait | $10^{14} - 10^{16}$ |
| Surface des micelles par mL lait | $5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ |

b. Nucléotides

Les nucléotides sont des molécules organiques qui jouent une fonction importante dans la majorité des processus biochimiques du métabolisme cellulaire et sont les éléments de base des acides nucléiques tels que l'ADN (acide désoxyribonucléique) ou l'ARN (acide ribonucléique). Les nucléotides sont composés d'une base nucléique ou base azotée (l'adénine, la guanine,...), d'un monosaccharide de 5 atomes de carbone dont l'association forme un nucléoside, et d'un à trois groupes phosphate (Figure I-18) [161]. Il a été démontré

que la consommation de nucléotides comme supplément alimentaire chez les animaux aide à optimiser la fonction immunologique lorsque leur production endogène³ est insuffisante pour un fonctionnement normal. Une source qui contient une haute teneur de nucléotides est le lait maternel humain et animal. Par exemple 20 % de l'azote du lait maternel attribué à la partie non protéique correspond en grand partie aux nucléotides présents [162-164]. Dans nos études nous nous sommes intéressés à deux nucléotides, l'AMP et l'ATP qui sont décrits dans la suite.

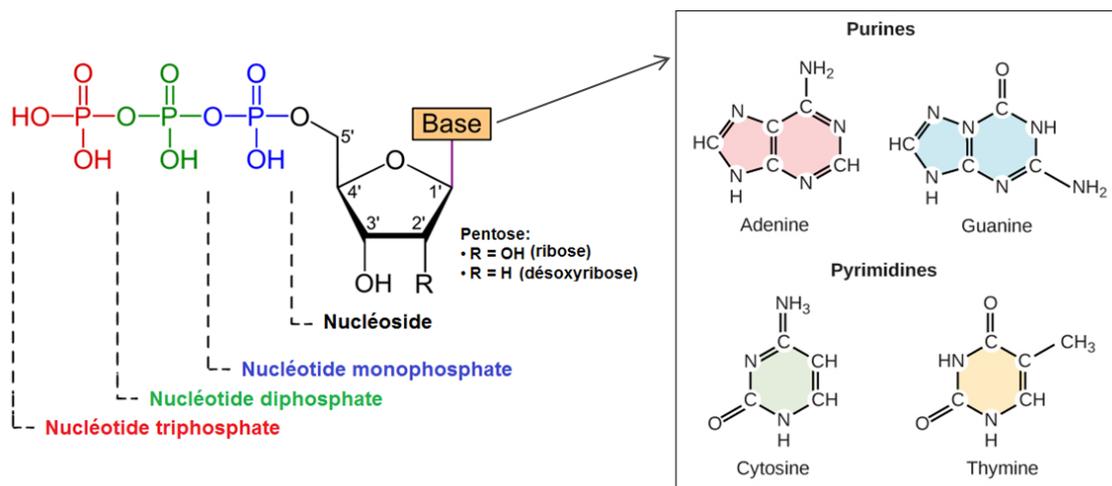


Figure I-18. Structure chimique des nucléotides (à gauche) et des exemples de bases azotes qui font partie de leurs structures (à droite) (figure adaptée de [161]).

AMP et ATP

Parmi les nucléotides, l'AMP (adénosine monophosphate) et l'ATP (adénosine triphosphate) sont des nucléotides constitués de résidus d'adénine, d'une base nucléique, et d'un ribose estérifié par un et trois groupes phosphate respectivement. Ces nucléotides à base d'adénosine sont impliqués dans le métabolisme énergétique des cellules.

Les liaisons entre les groupes phosphate dans l'ATP sont appelées liaisons à haute énergie car leur hydrolyse fournit une grande quantité d'énergie libre qui peut être utilisée pour des processus cellulaires tels que : a) le transport de molécules et d'ions à travers des membranes cellulaires, b) la contraction des fibres musculaires ou du cytosquelette qui permettent le mouvement des cellules, c) la synthèse de composés chimiques, d) la synthèse d'autres composés biologiques aussi à haute énergie, etc. [165].

³ Endogène : Qui se développe, qui s'effectue à l'intérieur d'un organisme ou d'un organe.

L'AMP peut être produite par l'hydrolyse de l'ATP en AMP et pyrophosphate comme montré dans la Figure I-19. Également, l'ADP (adénosine monophosphate) peut être formée lors de l'hydrolyse de l'ATP.

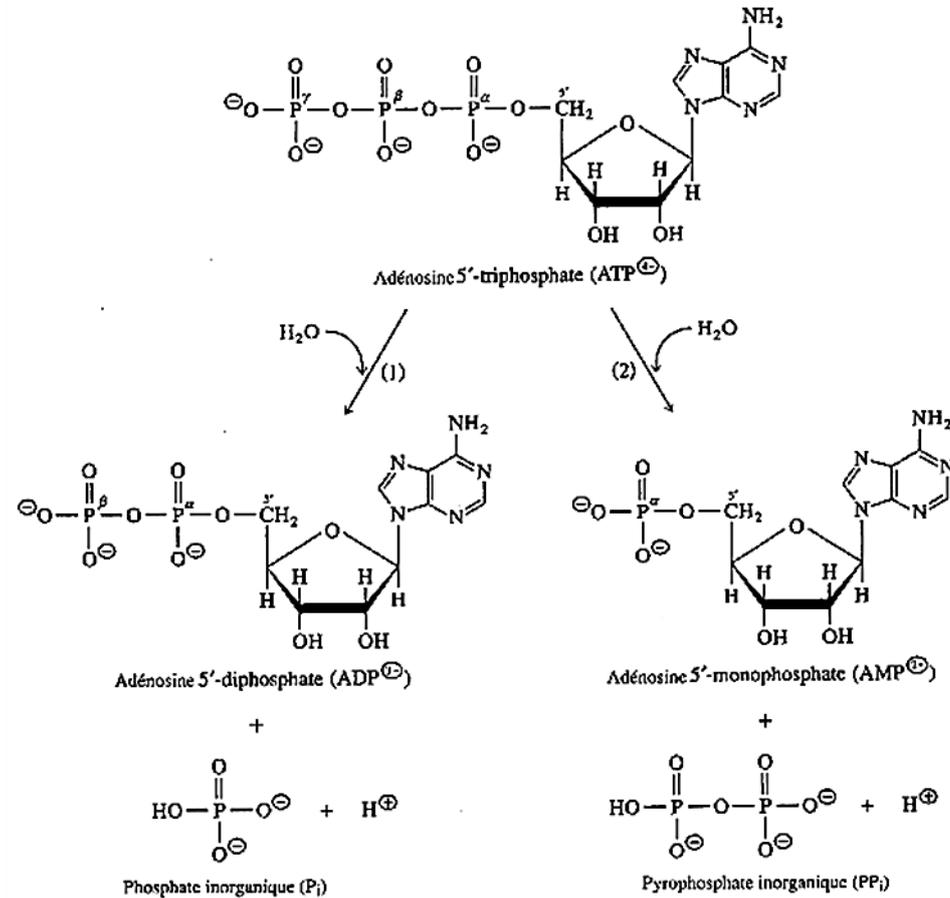


Figure I-19. Schéma de l'hydrolyse de l'ATP en (1) ADP et phosphate inorganique ou (2) AMP et pyrophosphate inorganique [166].

Par ailleurs l'AMP présente des propriétés d'inhibition du goût amer sur la langue, en interférant avec les récepteurs couplés à la protéine G responsables de la transmission du goût amer. Cette propriété intéressante de l'AMP est utilisée comme modificateur naturel de goût dans un large éventail d'aliments [167, 168].

c. Autres biomolécules : acides nucléiques et phospholipides

Les acides nucléiques sont les dépositaires moléculaires de l'information génétique. Ils sont des polymères constitués de séquences de nucléotides et peuvent être divisés dans deux principales classes en fonction du sucre qu'ils contiennent : l'ADN et l'ARN contenant le désoxyribose et le ribose respectivement. Les acides nucléiques sont de longues chaînes non

ramifiées de sucre et de phosphate. La Figure I-20 désigne la structure de l'ADN où apparaît la formation des liaisons phosphodiesters entre le C-5 d'une molécule de sucre et le C-3 du suivant. De plus, une purine (adénine, guanine) ou pyrimidine (cytosine, thymine) est fixée au C-1 du sucre par des liaisons glycosidiques. Sa structure appelée double hélice est maintenue par des liaisons hydrogène qui se forment entre les bases nucléiques [169, 170].

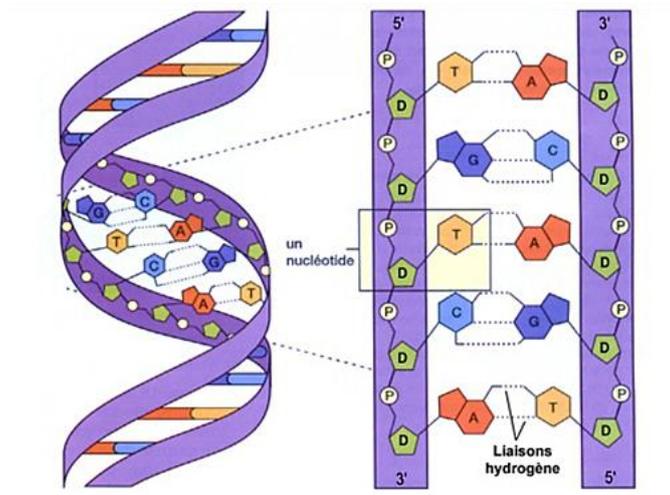


Figure I-20. Fragment d'ADN : structure moléculaire autour de 5 paires de bases (à gauche) et structure hélicoïdale (double hélice) (à droite) [171].

D'un autre côté, les phospholipides sont une classe de lipides et représentent les principaux composants des membranes cellulaires. Leur structure est constituée d'une partie hydrophobe composée par deux acides gras (queues), et une partie hydrophile comportant un groupement phosphate (Figure I-21) [172]. En particulier, la sphingomyéline (SM) est le seul phospholipide qui ne soit pas un phosphoglycéride. La graisse du lait en est une source importante. Elle est par ailleurs essentielle pour la peau grâce à son influence sur l'augmentation de niveaux de céramides dans le corps [173, 174].

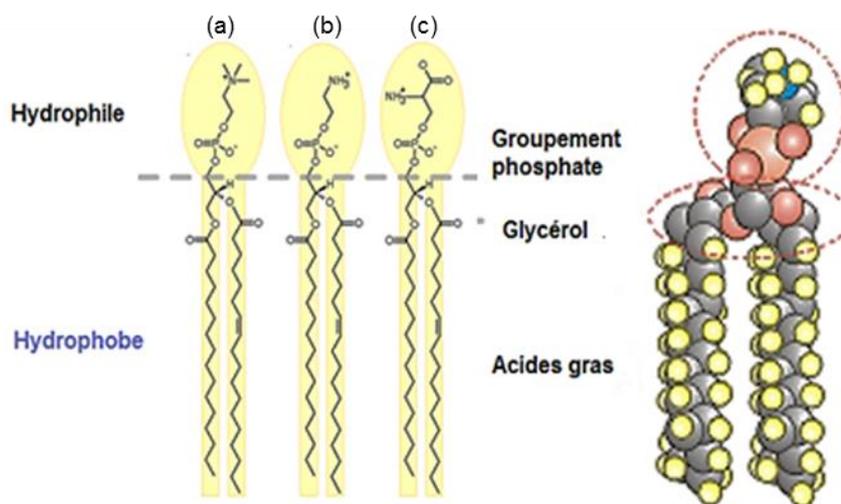


Figure I-21. Représentation des différents groupements chimiques de la structure des phospholipides (à droite). Exemples de phospholipides (à gauche): (a) phosphatidylcholine, (b) phosphatidyléthanolamine et (c) phosphatidylsérine [175].

I.3.2-2. Agent directeur de structure

Un autre avantage de l'utilisation des biomolécules phosphorées préalablement décrites est qu'elles peuvent/pourraient jouer le rôle d'agent directeur de structure/template.

La caséine, comme décrit précédemment, forme des micelles et sub-micelles dont l'encombrement stérique peut/pourrait délimiter un volume poreux. Quelques exemples récents décrits dans le paragraphe I.3.3 montrent que cette biomolécule sert de template pour la synthèse d'hydroxyapatite par exemple.

Les phospholipides, de par leurs propriétés physico-chimiques (parties hydrophiles et hydrophobe) peuvent s'associer également de façon à former des micelles, liposomes, bi-couches (Figure I-22) qui pourraient structurer une porosité dans des métallophosphates.

Enfin, les nucléotides sont des molécules beaucoup plus petites que les précédentes mais l'hydrolyse de la liaison osidique dans le milieu de synthèse conduirait à la libération d'amine hétérocyclique (purines, pyrimidines) qui pourrait jouer le rôle de template. En effet, les amines (hétérocycliques) sont reconnues comme ayant une grande capacité à structurer la microporosité dans les matériaux de type zéolithique.

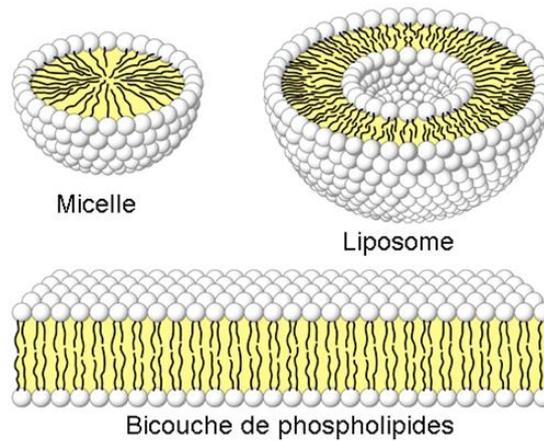


Figure I-22. Organisation des phospholipides en milieu aqueux [176].

I.3.2-3. Autres intérêts de l'utilisation des biomolécules phosphorées

Par comparaison aux sources inorganiques de phosphore, l'utilisation de biomolécules phosphorées présentent plusieurs autres avantages. Ceux-ci ont été mis en évidence par Zhao *et al.* (2014) qui ont travaillé sur les phosphates de calcium [177].

- La source de phosphore existe dans la biomolécule, et les ions phosphates ne sont donc pas présents dans la solution de départ évitant ainsi une nucléation rapide et une croissance désordonnée.
- L'hydrolyse des biomolécules phosphorées nécessite généralement certaines conditions telles qu'un chauffage de la solution aqueuse qui contient la biomolécule pour permettre la formation des ions phosphate. Les conditions d'hydrolyse peuvent être ajustées par le contrôle de la vitesse d'hydrolyse de la biomolécule, qui détermine la morphologie, la taille et la structure des phosphates de calcium.
- L'hydrolyse des biomolécules permet de libérer de manière progressive les ions phosphate, évitant ainsi une nucléation rapide et une croissance anarchique des phosphates de calcium. Autrement dit les biomolécules peuvent réguler la croissance cristalline.
- La plupart des biomolécules phosphorées sont biocompatibles et existent *in vivo*. Ainsi, elles sont essentiellement non-toxiques.

Tenant compte de tous ces points, les biomolécules phosphorées peuvent être considérées comme des sources de phosphore organique prometteuses pour la synthèse « verte » de phosphates de calcium mais également de métallophosphates poreux.

I.3.3. Avancements en synthèse de métallophosphates biosourcés à partir de molécules phosphorées

À ce jour, l'essentiel des travaux faisant référence à l'utilisation de biomolécules phosphorées comme source de phosphore concernent la synthèse de phosphates de calcium (Tableau I-3). Ces matériaux sont préparés en vue d'applications dans le domaine biomédical (libération de molécules actives, adsorption de protéines,...). Les biomolécules utilisées sont représentées sur la Figure I-23. Il est intéressant de noter que les liposomes DOPA et DPPA sont employés uniquement comme template.

Tableau I-3. Résumés des travaux faisant apparaître l'utilisation de biomolécules phosphorées pour la synthèse de phosphates de calcium.

| Biomolécules (rôle) | Matériau préparé | Autres informations | Méthode de synthèse | Réf. |
|--|---|---|---|-------------|
| ATP (source de P, stabilisateur des nanosphères) | Nanosphères poreuses de phosphate de calcium amorphes | D (moyen) des pores : ca. 11,2 nm | Hydrothermale, chauffage par micro-ondes (120 °C, 10 min) | [178] |
| ATP (source de P) | Nanofils d'hydroxyapatite | D : 27–32 nm L : plusieurs micromètres | Hydrothermale, chauffage par micro-ondes (150–180 °C, 30 ou 60 min) | [179] |
| ATP (source de P) Caséine (template) | Microsphères poreuses de nano bâtonnets d'hydroxyapatite | (pas d'évaluation de la porosité) | Hydrothermale (120 °C, plusieurs jours) | [180] |
| Caséine (template) | Supraparticules magnétiques (MSPs) creuses de Fe ₃ O ₄ | D (cavité intérieure) : 40–150 nm D (moyen) des pores : ca. 4 nm | Solvothermale, chauffage par micro-ondes (160 °C, 10 min) | [181] |
| 5'-phosphate de pyridoxal (source de P) | Microsphères creuses d'hydroxyapatite, nanostructures hiérarchisées | D des sphères : 14–20 µm D (moyen) des pores : ca. 17,2 nm | Hydrothermale, chauffage par micro-ondes (140–200 °C, 5 min) | [182] |
| 5'-phosphate de pyridoxal (source de P) | Nanobâtonnets d'hydroxyapatite | D (moyen) : ca. 50 nm L : plusieurs centaines de nanomètres | Hydrothermale (180 °C, 24 h) | [183] |

| Biomolécules (rôle) | Matériau préparé | Autres informations | Méthode de synthèse | Réf. |
|---|--|---|--|-------------|
| Fructose 1,6- biphosphate (<i>source de P</i>) | Microsphères de phosphate de calcium poreux | (pas d'évaluation de la porosité) | Hydrothermale, chauffage par micro-ondes (120 °C, 10 min) | [184] |
| Phosphocréatine (<i>source de P</i>) | Microsphères poreuses creuses d'hydroxyapatite, nanostructures hiérarchisées | D (moyen) des pores : ca. 20,6 nm | Hydrothermale, chauffage par micro-ondes (120 °C, 10 min) | [185] |
| Phosphocréatine (<i>source de P</i>) | Nanobâtonnets/ nanofeuilles d'hydroxyapatite | (pas de valeurs sur la dimension des bâtonnets/feuilles) | Solvothermale (160 °C, <i>différents temps</i>) | [186] |
| Cytidine 5'- triphosphate (<i>source de P</i>) | Microsphères d'hydroxyapatite et nanoparticules de phosphate de calcium amorphes | (pas de valeurs sur la dimension des particules/sphères) | Hydrothermale, chauffage par micro-ondes (150 °C, 1 min) | [187] |
| Riboflavine 5'- phosphate (<i>source de P</i>) | Nanobâtonnets/ nanofils d'hydroxyapatite | nanobâtonnets de D : 26–55 nm et L : 58–239 nm nanofils de L : plusieurs micromètres | Hydrothermale (180°C, 24 h) | [188] |
| Liposomes DOPA^a et DPPA^b (<i>template</i>) | Nanobilles de phosphate de calcium | D (moyen) des billes : ca. 198 nm (avec DOPA), 1889 nm (avec DPPA) | Ajouts à température ambiante | [189] |

D : diamètre, L : longueur.

^a : 1,2 dioleoyl-*sn*-glycero-3 phosphate sodium salt (DOPA).

^b : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate sodium salt (DPPA).

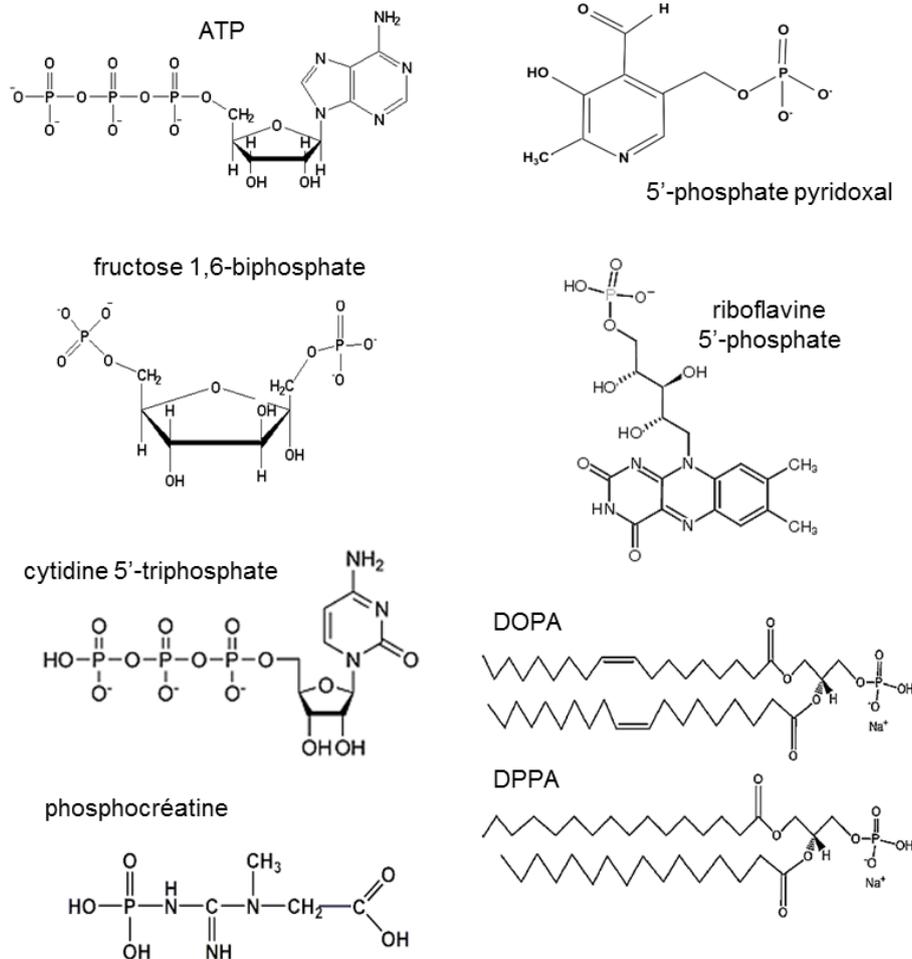


Figure I-23. Biomolécules phosphorées utilisées dans la synthèse de phosphates de calcium.

À notre connaissance, aucune étude ne fait état de l'utilisation de la caséine comme source de phosphore. Notons toutefois que Nelson *et al.* (1989) [190], en simulant l'étape de stérilisation du lait (écrémé) (chauffage à 120 °C pendant 5 min et à pH 6,5–7,5) ont mis en évidence la présence de tricalcium de phosphate (forme β) mal cristallisé.

Par ailleurs, très récemment, Mittal *et al.* (2016) [191] ont préparé des clusters de phosphate ferrique stabilisés par la caséine dans lesquels le fer interagit simultanément avec la phosphosérine de la caséine et le phosphate inorganique (orthophosphate) rajouté dans le milieu de synthèse.

Il semblerait donc que jusqu'à présent la caséine ait seulement été utilisée comme agent directeur de structure ou template pour la synthèse de métallophosphates grâce à sa structure micellaire comme détaillé précédemment. Elle n'est pas encore utilisée comme source de phosphore bien qu'elle soit une molécule abondante dans le lait. Elle est la protéine la plus présente dans le lait de vache (80 % des protéines).

I.4. Colonisation bactérienne des matériaux poreux et des métallophosphates

I.4.1. Les biofilms

Les bactéries sont des microorganismes vivants unicellulaires présents partout dans l'environnement, dans l'air, dans le sol et dans l'eau, mais aussi dans les aliments et sur les êtres vivants. Elles peuvent se trouver à l'état planctonique (i.e., les bactéries sont libres) ou « adhérentes » sur une surface. Leur regroupement et leur accumulation sur la surface de toutes sortes de matériaux conduisent à la formation de populations bactériennes plus ou moins organisées connues sous le nom de biofilms et dans lequel les cellules agissent moins en tant qu'entités individuelles que comme partie d'un système vivant collectif. Des canaux permettent de distribuer l'eau et les nutriments au sein du biofilm [192, 193].

Van Leeuwenhoek (1684) a été le premier à révéler l'existence de 'animalcules' (bactéries) dans la plaque de ses propres dents selon un rapport de la Société Royale de Londres: « Le nombre de ces animalcules dans la plaque des dents d'un homme sont tellement nombreux que je crois qu'ils dépassent le nombre d'hommes dans un royaume... ». Toutefois, ce n'est que dans les années 1970 qu'ont été décrites pour la première fois les bactéries sessiles, nom donné aux bactéries fixées à une surface et donnant naissance au biofilm [194]. Costerton *et al.* (1978) [195] ont de plus rapporté que la population bactérienne adhérente à des surfaces humides se trouve protégée par une matrice de nature polysaccharide produite par elle-même et qui contrôle l'adhérence du biofilm au substrat sur lequel il se développe.

Dans la nature, la plupart des biofilms sont composés de mélanges de microorganismes (bactéries, champignons, algues, etc.). La structure exacte d'un biofilm est probablement une caractéristique unique de l'environnement dans lequel il se développe (de la surface des matériaux, des nutriments disponibles, etc.) [193]. Ils sont répandus sur la plupart des surfaces humides et forment souvent des surfaces gluantes et glissantes dont certaines sont visibles à l'œil nu. À titre d'illustration, la Figure I-24 montre quelques exemples de biofilms trouvés dans la nature : i) dans des écosystèmes aquatiques (Figure I-24(a)) les biofilms de cyanobactéries forment des couches vert-turquoises lorsqu'elles sont trop abondantes [196], ii) la présence de biofilms d'algues est couramment observée à la surface des pierres dans les rivières et sur le bord de la mer [197], iii) les végétaux tels que les plants de tomate par exemple sont souvent infectés par des bactéries *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Figure I-24(b)) observées sous forme de taches noires [198], iv) dans les canalisations d'eau usées, les biofilms composés de bactéries réductrices du sulfate du genre *Desulfovibrio*

induisent la biocorrosion des canalisations de fer [199]. Ces bactéries, lors de leur métabolisme, produisent du sulfure d'hydrogène qui réagit avec le fer des canalisations pour former du FeS. Lors de la corrosion se forment des piqûres ouvertes emplies de FeS (produit noir) (Figure I-24(c)).

Dans les réseaux de distribution d'eau potable également, se trouvent des biofilms de bactéries, situés en particulier à la surface des réservoirs et des conduites d'adduction [200]. Ces biofilms peuvent être issus, dans certains cas, d'une contamination fécale ou de bactéries résistantes aux traitements chimiques de désinfection de l'eau les plus couramment utilisés (désinfectants à base de chlore). Protégées par le biofilm, les bactéries sont difficilement détruites par les traitements et demeurent à la surface du matériau, constituant une source potentielle de contamination de l'eau distribuée [201, 202].

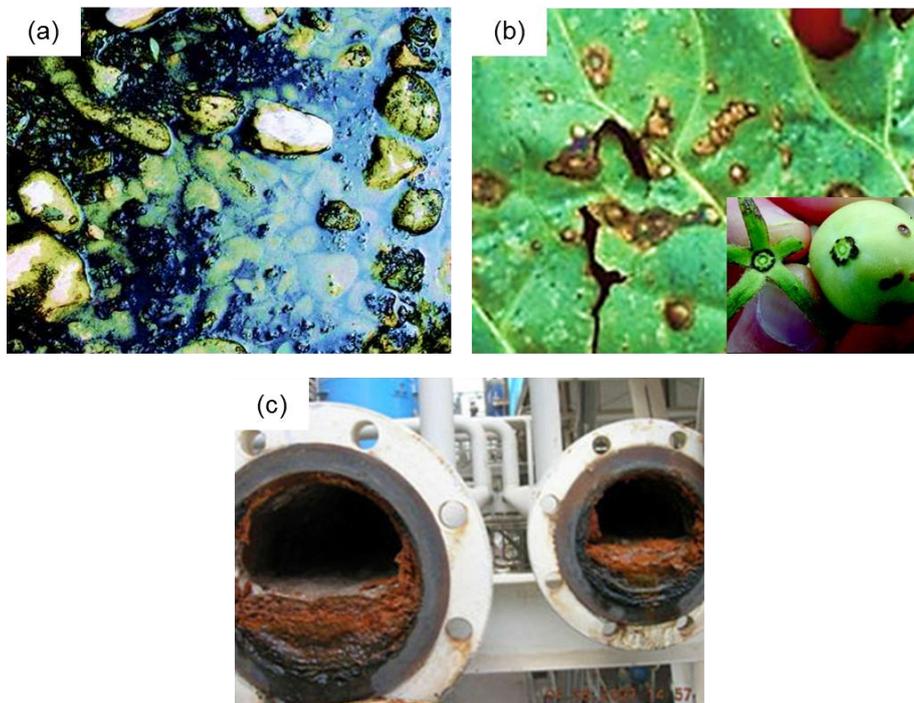


Figure I-24. Biofilm sur (a) les galets d'un lit de rivière [203], (b) la surface d'un plant de tomates (figure adaptée de [198]) et (c) biocorrosion de canalisations d'eau usées par des bactéries sur les surfaces internes des tuyaux (photo © <http://www.co2formare.eu/glosario/?lang=en>).

Les biofilms se produisent également de manière naturelle dans le corps humain, par exemple dans la cavité buccale (plaque dentaire) [204], dans le tractus gastro-intestinal (microflore intestinale) [205], sur la peau [206], où ils ne sont pas ou peu pathogènes. Ils

peuvent aussi atteindre des organes vitaux tels que les poumons ou se développer sur des dispositifs médicaux implantés où leur action peut se révéler létale. Ces biofilms peuvent finalement entraîner des maladies infectieuses graves, résistantes aux traitements antibiotiques. Ainsi, environ 65 à 80 % des infections survenant chez l'être humain sont en relation avec la formation d'un biofilm bactérien [207]. À ce sujet, Costerton *et al.* (1999) [194] ont publié une liste de différentes infections chez l'homme causées par les biofilms. Quelques exemples en sont la parodontite, une infection qui affecte le tissu entourant les dents [208], des infections sur implants chirurgicaux [209], des infections des voies urinaires [210]. La Figure I-25 montre trois sites communs d'infection causés par les bactéries : la bouche, un cathéter placé en voie intraveineuse et un dispositif médical implanté (une prothèse artificielle). Les bactéries peuvent alors atteindre toutes les parties du corps par l'intermédiaire du flux sanguin.

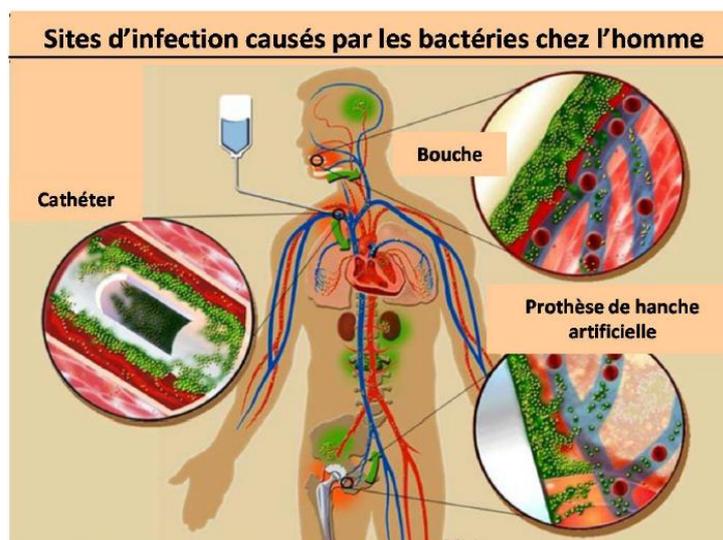


Figure I-25. Exemples de sites communs d'infection par un biofilm. Figure adaptée de [211] (*Montana State University Center for Biofilm Engineering*).

I.4.2. Adhésion bactérienne et formation du biofilm

La formation d'un biofilm se déroule en plusieurs événements séquentiels qui dépendent de divers facteurs tels que les caractéristiques biologiques des bactéries, la nature de la surface sur laquelle elles adhèrent et les conditions de l'environnement dans lequel le biofilm se développe [212, 193]. Le processus de formation d'un biofilm est généralement décrit en quatre étapes qui sont schématisées dans la Figure I-26(a) [212]. :

(1) **Le transport des bactéries** (Figure I-26(a), étape 1) vers la surface réceptrice (substrat) par des forces physiques comme les forces de gravité (sédimentation) et les forces browniennes (diffusion aléatoire). Dans des environnements aquatiques, les forces hydrodynamiques des fluides (turbulences) peuvent aussi participer au transport des bactéries jusqu'à la surface du substrat [213]. Il existe aussi un mouvement propre et autonome des bactéries qui possèdent des organelles protéiques appelés flagelles. Cependant son rôle exact dans la formation du biofilm n'est pas encore totalement élucidé [212].

(2) **L'adhésion bactérienne** (Figure I-26(a), étape 2) à la surface du substrat peut être décrite en deux étapes : (a) la première étape, habituellement nommée « adhésion réversible », est quasi-instantanée. Au cours de cette étape, les bactéries adhèrent à la surface par des forces physiques (interactions électrostatiques, de van der Waals ou interactions hydrophobes/hydrophiles) [214]. Cette adhésion peut être en partie décrite au travers de la théorie DVLO (Dejarguin-Landau-Verwey-Overbeek), qui est basée sur les processus physico-chimiques aux interfaces [215, 216]. Elle considère que les cellules bactériennes sont des colloïdes et prend en compte uniquement des paramètres physiques tels que les interactions électrostatiques et la tension superficielle pour expliquer l'adhésion, (b) la seconde étape, nommée « adhésion irréversible », concerne l'ancrage définitif des bactéries à la surface grâce à la formation de liaisons covalentes entre les molécules présentes à la surface du substrat et des récepteurs spécifiques ou non présents à la surface de la membrane bactérienne, tels que les flagelles ou les pilis (protéines de structure filamenteuse). Ces liaisons permettent une résistance au détachement des bactéries [212, 213, 217]. Il a été montré en particulier que des appendices « curli » synthétisés en particulier par *E. coli* favorisent sa fixation à la surface du substrat et donc la formation du biofilm [218].

(3) **La prolifération des bactéries et la formation du biofilm** (Figure I-26(a), étape 3) se produit suite à l'adhésion des bactéries pionnières, qui se multiplient, se regroupent en colonies « twitching » et se déplacent par « swarming » sur la surface du substrat afin d'augmenter la zone couverte de bactéries [219, 220]. Le déplacement des colonies peut être aussi favorisé par la présence d'appendices situés à la surface de la paroi bactérienne tels que les flagelles et les pilis [212]. Les bactéries synthétisent alors des substances polymères extracellulaires (EPS) à base surtout de polysaccharides (acide colanique, alginate, etc.) mais également de protéines, d'acides nucléiques et de lipides, pour former une matrice polymérique qui les protège et les maintient ancrées à la surface [221, 222]. Les Figures I-25(b-c) montrent des exemples de biofilms bactériens d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) acquis par microscopie électronique à balayage (MEB)

dans lesquels il est possible d'observer les bactéries entourées par des EPS (polysaccharides acide colanique et poly-(1,6)-N-acetyl-D-glucosamine, produits par *E. coli* [223] et *S. aureus* [224] respectivement).

(4) La dernière étape consiste en un **détachement** (Figure I-26(a), étape 4) de parties du « biofilm mature ». Ce biofilm possède une structure complexe, généralement tridimensionnelle, avec des pores et des canaux permettant l'apport des nutriments ou de l'oxygène aux bactéries [212]. Ils permettent aussi de faire circuler des molécules de signalisation connues comme faisant partie du *Quorum Sensing*, c'est-à-dire capables de médier une communication entre bactéries [225, 192]. Ces molécules interviennent notamment dans le détachement de parties du biofilm, qui se produit lorsqu'est atteinte une densité critique [226]. La présence d'un flux hydrodynamique peut également augmenter le taux de détachement [227]. Les bactéries devenues libres (c'est-à-dire planctoniques) sont alors capables de coloniser de nouvelles surfaces.

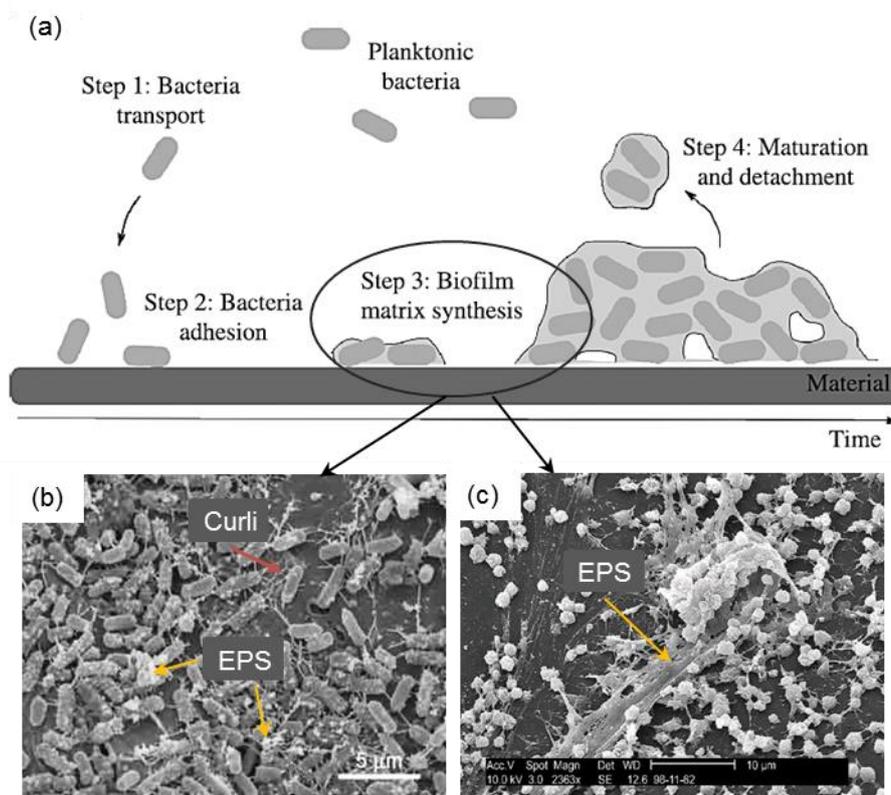


Figure I-26. (a) Schéma du développement du biofilm [212] et images de MEB de biofilm (b) d'*E. coli* [228] et (c) de *S. Aureus* [229]. Les bactéries sont associées entre elles et au substrat par des polymères (EPS) synthétisés par elles-mêmes. Sont également visibles des curli synthétisés par *E. coli*.

I.4.3. Colonisation bactérienne des matériaux poreux

La géométrie de la surface des matériaux, sa forme tridimensionnelle, sa porosité et ses irrégularités de surface ont été montrées comme possédant un important rôle dans la rétention bactérienne à la surface. Les bactéries colonisent donc préférentiellement les matériaux poreux et tendent à se regrouper au niveau des aspérités, des cavités, des fissures, des coins et d'autres possibles irrégularités superficielles des matériaux [230]. Ceci est principalement la conséquence de l'augmentation du transport de masse par convection près de la surface, de la protection apportée aux bactéries, de l'augmentation de surface de contact et de l'énergie de liaison offerte ainsi à l'attachement des bactéries [226, 227]. La Figure I-27 montre quelques exemples de l'influence de la géométrie de la surface des matériaux sur la colonisation bactérienne. Les surfaces poreuses de silice favorisent la formation du biofilm (Figure I-27 (1a-b)) par rapport à une surface lisse [212] et les bactéries ont également tendance à se regrouper dans les pores de la surface (Figure I-27(2a-b)) [231].

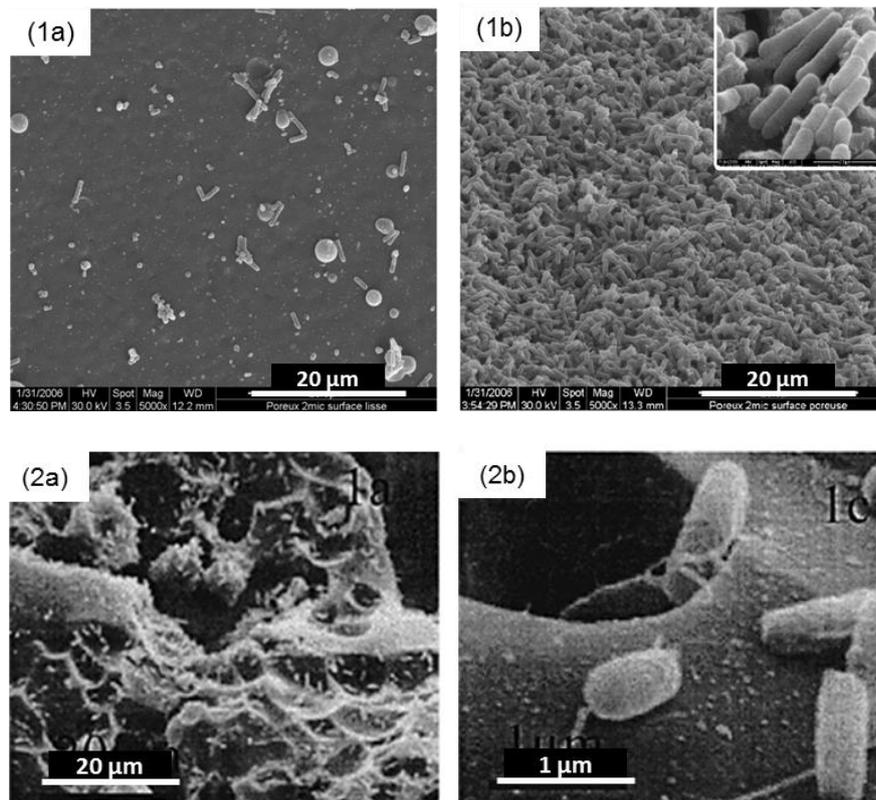


Figure I-27. Images de MEB de la colonisation bactérienne de différentes surfaces poreuses ou non : (1) colonisation de surfaces lisse (a) et poreuse (b) de matériaux de silice (chimiquement identiques) par *E. coli* [212], (2) colonisation de la surface d'un verre poreux par *Marinobacter sp.* strain CAB à deux échelles différentes [231].

chlore et ses dérivés, l'ozone ou la lumière ultraviolette [239-241]. L'utilisation d'autres filtres que ceux formés à base de charbon actif a été rendue nécessaire par la mise en évidence de leur inefficacité contre les bactéries, virus et protozoaires. Au contraire, des études ont rapporté que la croissance bactérienne est améliorée en présence de graphite ou de charbon actif, entraînant une potentielle contamination additionnelle [242, 243]. Dans ce contexte, les zéolites synthétiques ou naturelles, les céramiques ou les verres frittés poreux (Figure I-29) sont des solides alternatifs qui offrent une grande surface de filtration. Toutefois, la plupart des études scientifiques les concernant, rapportent l'utilisation de ces matériaux en tant que supports de nanoparticules d'argent qui assurent une action bactéricide par libération progressive des ions Ag^+ dans l'eau [244-248]. Dans le cas particulier des zéolithes naturelles telle que la clinoptilolite par exemple, plusieurs travaux relatent leur utilisation après modification avec des ions antibactériens Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} par échange ionique [249, 250]. Pour cette raison, la littérature est très rare en ce qui concerne spécifiquement l'effet de leurs pores sur la rétention bactérienne.



Figure I-29. Exemples de matériaux poreux utilisés dans le traitement de l'eau pour la rétention de bactéries et d'autres macro polluants : (a) zéolithe naturelle commercialisée (Zeoclear® de chez Actizoo); (b) système d'assainissement d'eau d'aquarium fabriqué à partir de verre fritté, de morceaux de céramique et de charbon actif poreux [251].

I.4.4. Colonisation bactérienne des métallophosphates

Peu d'études ont été publiées, en général, sur la colonisation bactérienne des métallophosphates. Les études concernent principalement les biomatériaux à base de phosphates de calcium et en particulier l'hydroxyapatite (HA). Elles s'intéressent aux risques

d'infection associés à la colonisation bactérienne de leurs surfaces lors qu'ils sont utilisés comme substitut osseux ou revêtement des implants orthopédiques [252, 253]. Une grande partie de ces études rapportent l'adhésion de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) sur des matériaux à base d'HA car ce sont trois bactéries retrouvées dans la plupart des infections observées en orthopédie [254, 255]. Yang *et al.* (2010) [256] mentionnent que malgré le fait que les implants d'HA présentent une bonne biocompatibilité, stabilité et offrent une certaine résistance à l'infection de l'oreille (otite moyenne), leur structure peut être plus facilement décomposée et absorbée lors d'une infection persistante que des implants de titane. De nouvelles stratégies d'élaboration d'hydroxyapatite sont donc apparues afin de réduire la vulnérabilité de ces implants à la colonisation bactérienne. Par exemple, Grenho *et al.* (2010) [254] ont montré que des nanostructures d'HA (nanoHA) présentent une bonne résistance à la rétention de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Figure I-30(a-b)) grâce à leur meilleure intégration dans le tissu osseux avant une possible colonisation bactérienne.

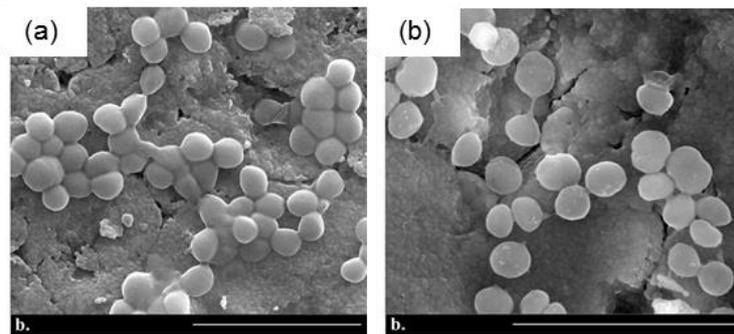


Figure I-30. Images de MEB de la colonisation bactérienne de nanoHA 1000 (préparé à 1000 °C) par (a) *S. aureus* et (b) *S. epidermidis* (La barre d'échelle correspond à 4 μ m) [254].

Par ailleurs, des implants dentaires à base de zincophosphates ont révélé être défavorables à la colonisation par *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) grâce au relargage d'ions Zn^{2+} qui auraient un effet antibactérien comme il a été abordé précédemment dans la section I.2.5 au sujet des applications biomédicales et environnementales des métallophosphates. Cette section a décrit également la capacité de l'HA macroporeuse dans la rétention d'*E. coli* lorsqu'elle est utilisée dans le traitement de l'eau grâce au blocage et l'adhésion de la bactérie dans les pores.

Enfin, de nombreux travaux rapportent l'influence de l'incorporation de nanoparticules d'argent dans des matériaux d'HA sur la diminution de la colonisation bactérienne de leurs

surfaces. Ces études seront présentées dans la section suivante de ce chapitre, qui introduit les propriétés antibactériennes des métallophosphates avec nanoparticules d'argent.

I.5. Nanoparticules d'argent dans les matériaux

I.5.1. Intérêt

L'argent est un élément métallique qui est largement utilisé à cause de ses excellentes propriétés (grande malléabilité, très bon conducteur de la chaleur, pouvoir réflecteur très élevé dans l'infrarouge,...). Il est ainsi utilisé pour des applications dans les domaines de l'optique, biomédical, environnemental,... [257-259]. L'ion argent Ag^+ est particulièrement connu pour avoir une activité antibactérienne très élevée et présente une très faible toxicité comparée à d'autres métaux. Ainsi les matériaux contenant de l'argent sont fréquemment utilisés dans des produits commerciaux destinés à l'équipement de la cuisine, les machines à laver, les habits, les articles de toilette, les sprays antiseptiques, les cathéters,...

I.5.2. Propriétés antibactériennes de l'argent supporté sur un solide

Différents travaux ont démontré l'effet antibactérien des ions Ag^+ sur des souches bactériennes gram-positives et gram-négatives [260, 261]. À partir de cela plusieurs explications existent sur l'effet biocide des ions Ag^+ qui conduit à la mort de la bactérie (Figure I-31). Les différentes actions biocides rapportées des ions Ag^+ sont : la dégradation de la paroi cellulaire bactérienne par interaction d'ions Ag^+ avec la membrane, l'inactivation de la synthèse protéique et de la réplication de l'ADN par formation de liaisons Ag-S avec les groupes thiols d'enzymes vitaux, ce qui conduit à la mort des bactéries [261, 262]. Toutefois, certaines questions comme le mécanisme du transport des ions Ag^+ dans la bactérie ou la résistance bactérienne aux ions Ag^+ ne sont pas encore éclaircis [263]. En particulier, les nanoparticules d'argent sont d'efficaces agents antibactériens quand ils sont piégés dans une matrice ou matériau support car le système formé se comporte comme un réservoir d'ions Ag^+ qui sont relargués dans un milieu aqueux lors de l'oxydation des nanoparticules d'argent (Figure I-31). C'est l'hypothèse la plus acceptée car à ce jour l'activité antibactérienne de l'argent en tant que nanoparticule est encore polémique. Toutefois, la petite taille des nanoparticules d'argent permet l'augmentation de leur surface de contact et donc la génération de plus d'ions Ag^+ capables d'agir plus efficacement sur les bactéries [264].

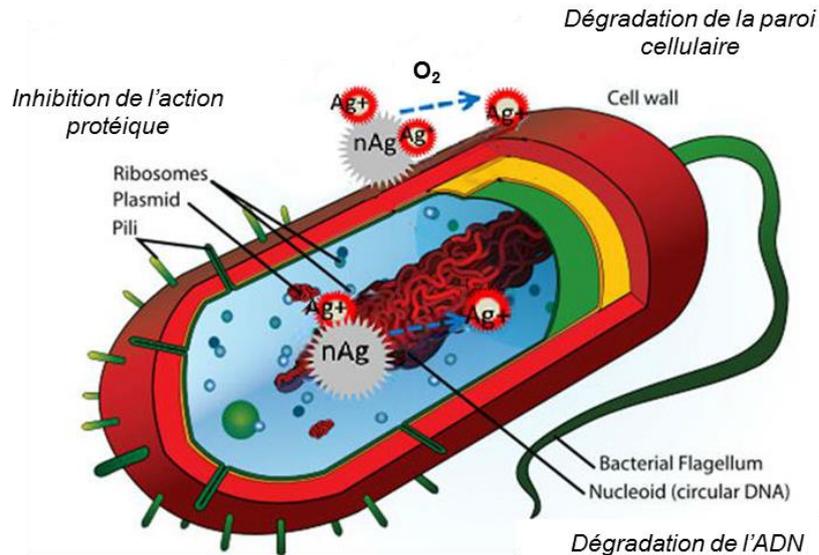


Figure I-31. Illustration de l'action biocide des ions argent (Ag^+) sur la bactérie. Les nanoparticules d'argent (nAg) libèrent des ions Ag^+ par oxydation. Figure adaptée de [265].

I.5.3. Méthodes de préparation des nanoparticules d'argent

La technique typiquement utilisée pour la synthèse de nanoparticules d'argent (Ag^0) est la réduction chimique des ions Ag^+ grâce à des agents réducteurs tels que le borohydrure de sodium, l'hydrazine et l'acrylate/citrate [266, 267]. Cette méthode est très employée car elle est simple et peu onéreuse, bien que ces réactifs chimiques soient toxiques et polluent l'environnement. De même, des inconvénients de biocompatibilité peuvent apparaître quand les nanoparticules préparées par cette méthode sont utilisées dans des systèmes biologiques. C'est ainsi que d'autres méthodes ont été aussi développées pour leur synthèse telles que l'utilisation de matières biologiques, l'irradiation micro-ondes, la photoréduction, etc. [267-269].

L'utilisation de ressources biologiques est une alternative propre et durable. Par exemple, des extraits de plantes, d'acides aminés, de protéines et de vitamines peuvent agir comme agents réducteurs et stabilisateurs des nanoparticules d'argent [270-272]. Toutefois, l'utilisation de protéines est moins étudiée car la formation des nanoparticules d'argent à partir de protéines présente une chimie complexe qui dépend de la séquence des aminoacides qui les constituent, de leur taille, de leur charge électronique, etc. [272]. Récemment, des travaux sur l'utilisation de l'albumine, du lysozyme et de la caséine ont été publiés. Par exemple Xie *et al.* (2009) ont utilisé la protéine albumine de sérum bovin (BSA en anglais) dans la synthèse de nanoclusters d'or (AuNC) fluorescents (émission à 640 nm pour une

excitation à 480 nm) pour la détection sélective des ions Hg^{2+} dans une solution aqueuse. Le mécanisme de détection était basé sur la formation de liaisons $\text{Hg}^{2+}\text{-Au}^+$ de haute affinité causant l'atténuation de la fluorescence des AuNCs. La présence des groupes thiol des 35 résidus de cystéine dans la protéine BSA permettent en particulier la stabilisation des AuNCs [273, 274]. Selon le même principe, la protéine lysozyme a été également utilisée pour la synthèse de nanoclusters d'or nommés LsGFC (Clusters fluorescents d'or stabilisés par lysozyme) présentant des propriétés hautement fluorescentes pour la détection de Hg^{2+} [275].

Des travaux effectués par Das *et al.* (2013) sur la biosynthèse de nanoparticules d'argent supportées sur de la silice nanoporeuse en présence de protéine ont montré que les ions Ag^+ qui interagissaient avec la silice *via* des interactions électrostatiques étaient réduits par la protéine dans ce cas extraite du microorganisme *R. oryzae* [276]. La réduction des ions Ag^+ provoque un changement progressif de la couleur de la silice qui passe alors du blanc au marron très foncé en 24 h. De façon plus précise, l'argent a un potentiel redox élevé [$E_{\text{H}}^{\circ}(\text{Ag}^+/\text{Ag}^0) = 0,8 \text{ V}$] qui lui permet « d'attraper » des électrons de la protéine (groupements carbonyle et amino), produisant la réduction de Ag^+ en Ag^0 . Les nanoparticules d'argent sont stabilisées sur la silice grâce à des liaisons électrostatiques impliquant les groupements -OH de la silice. Dans le matériau ainsi formé, les protéines protègent alors les nanoparticules d'argent d'une éventuelle oxydation due à l'environnement (Figure I-32). Les mécanismes exacts de bioréduction ne sont pas encore bien établis. Quester *et al.* (2016) proposent que les groupements amine des protéines soient responsables de la bioréduction des ions métalliques puisqu'ils peuvent donner facilement des électrons en libérant un proton [277].

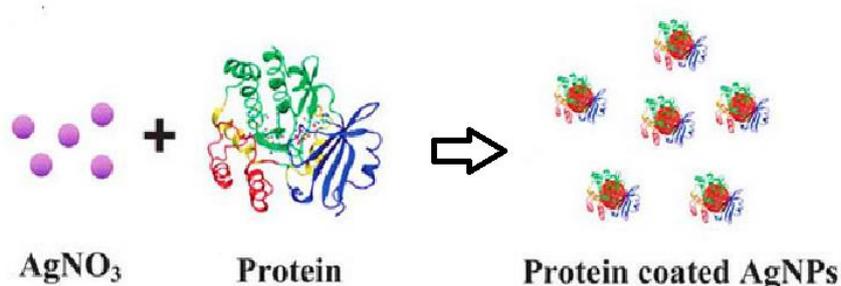


Figure I-32. Illustration des nanoparticules d'argent (AgNPs) protégées par la protéine lors de leur formation [276].

I.5.4. Avancements en synthèse de métallophosphates poreux avec nanoparticules d'argent

Beaucoup de travaux portent sur des zéolithes contenant des nanoparticules d'argent en raison de la facilité d'échange d'ions de ces matériaux. La réduction des ions Ag^+ se fait dans une seconde étape à l'aide d'un agent réducteur [278]. Ces solides sont utilisés pour l'élimination de microorganismes présents dans un milieu aqueux [278, 279], en tant qu'agent antibactérien inséré dans des fibres textiles et intervient dans la formulation du béton servant à fabriquer les canalisations d'évacuation des eaux usées par exemple.

En revanche, il existe peu d'études sur les métallophosphates poreux enrichis en nanoparticules d'argent. Ces travaux sont principalement associés à la synthèse de l'**hydroxyapatite** pour des applications biomédicales grâce à leur propriété biocompatible comme détaillé précédemment (voir section I.2.5). Des implants osseux à base d'hydroxyapatite avec nanoparticules d'argent sont utilisés dans la prévention des infections bactériennes pour assurer leur efficacité et durabilité à long-terme, comme c'est le cas des implants orthopédiques et dentaires par exemple [280, 281]. Par ailleurs, peu de travaux portent sur les applications environnementales des métallophosphates enrichis en nanoparticules d'argent. Une étude reportée par Yang *et al.* (2007) [58] signale le développement d'un filtre d'eau à base d'hydroxyapatite macroporeuse contenant des particules d'argent par échange d'ions. Le matériau a révélé une bonne efficacité de séparation des bactéries et des propriétés antibactériennes associées respectivement à l'adsorption/piégeage des bactéries dans les pores, et la propriété biocide des ions argent. La Figure I-33 montre les coupes transversales du filtre avant et après filtration. Il peut être vu que des bactéries *E. coli* sont attachées au matériau, tandis que quelques-unes d'entre elles sont bloquées par les petits pores (Figure I-33(b)).

Cette application est intéressante car elle permet la substitution des filtres classiques de céramique/argent, zéolithe/argent, fibres de verre/argent,... utilisés pour la désinfection des eaux usées [282-284]. L'utilisation de l'hydroxyapatite comme support des nanoparticules d'argent permet la synergie des propriétés non-toxiques et biocompatibles de l'hydroxyapatite et la propriété biocide des ions argent dans la désinfection de l'eau par rapport aux filtres classiques. Ces propriétés pourraient être d'importance surtout pour le traitement de l'eau d'usage domestique ou médical [58].

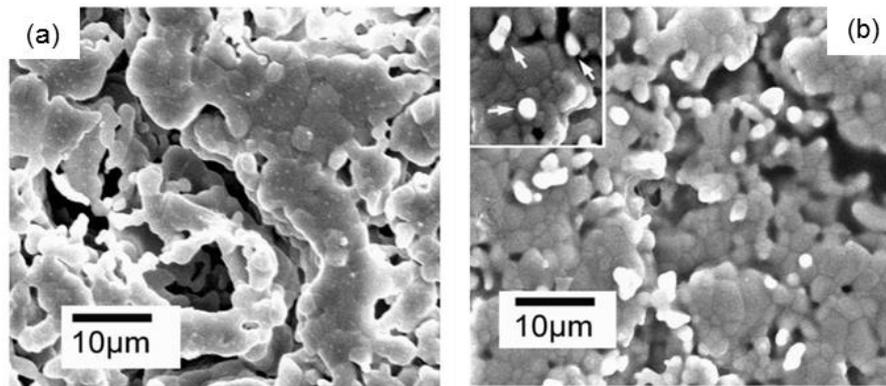


Figure I-33. Images de MEB qui montrent les coupes transversales de l'hydroxyapatite contenant des nanoparticules d'argent (a) avant la filtration et (b) après la filtration d'une solution aqueuse contenant *E. coli*. L'image insérée montre les bactéries bloquées par les pores. Le gonflement des cellules est dû au vide effectué dans la chambre du microscope [58].

Par ailleurs, Tan *et al.* (2008) ont étudié l'effet de la teneur en argent supporté par un **phosphate de zirconium** ($\text{NaZr}_2(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de structure NASICON (*Na Super Ionic CONductor*) [285]. L'argent introduit *via* des échanges d'ions en solution aqueuse (Ag^+ échangés avec Na^+ présents dans le phosphate) est resté sous forme de cation malgré les différents traitements subis par l'échantillon (séchage à 105 °C pendant 12 h, calcination à 900 °C). L'étude révèle que le matériau AgZrP ($\text{Ag}_{0,5}\text{Na}_{0,5}\text{Zr}_2(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans la proportion 100 mg. L⁻¹ possède une activité antibactérienne élevée et était capable de tuer toutes les bactéries *E. coli* et plus que 99,9 % des *S. aureus* après 8 h de contact. De plus AgZrP a encore montré une bonne activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* avec des MICs (*Minimum inhibitory concentration*) de 55 mg. L⁻¹ et 95 mg. L⁻¹ d' Ag^+ après incubation pendant 10 jours à 37 °C et sous agitation constante dans l'eau distillée. Le phosphate de zirconium dopé à l'argent est notamment utilisé dans les composites dentaires. La stabilité de la couleur du matériau est une de ses propriétés importantes.

La synthèse d'autres types de phosphates enrichis en nanoparticules d'argent n'est pas encore cité dans la littérature, ce qui ouvre un domaine intéressant de recherche principalement pour des applications biomédicales et antibactériennes en raison de la présence de l'argent, tel qu'observé pour l'hydroxyapatite. Dans cette optique, les zincophosphates peuvent être de très bons candidats car ils présentent des propriétés de biocompatibilité et non-toxicité comme mentionné dans la section I.2.5.

La découverte de nouveaux matériaux contenant des nanoparticules d'argent est un constant besoin dans le domaine biomédical. En effet, pour prévenir et traiter les infections liées aux implants (orthopédiques, dentaires,...) une stratégie consiste à délivrer des antibiotiques de façon contrôlée sur le site de l'implantation de manière à administrer localement les doses. La délivrance de l'antibiotique peut être réalisée en faisant appel à de nombreux matériaux biocompatibles tels que des polymères ou de l'hydroxyapatite. Les inconvénients des polymères sont que leur efficacité dépend fortement du profil de libération des antibiotiques du polymère aussi bien que des propriétés physiques du polymère en lui-même. En outre, les polymères non-biodégradables ne se résorbent pas à la différence de l'hydroxyapatite et nécessitent une opération ultérieure pour l'élimination [59].

De façon générale la formulation des implants osseux en matériaux composites est aussi spécifique de l'antibiotique. Ainsi la capacité de certaines souches bactériennes à développer une résistance aux antibiotiques a suscité un intérêt croissant pour la délivrance contrôlée d'autres agents antibactériens avec notamment une activité antibactérienne plus large, comme les métaux argent et zinc [286].

I.6. Conclusion

Les métallophosphates sont des matériaux largement utilisés dans l'industrie pour des applications diverses. Ils sont également des matériaux prometteurs. Leur synthèse s'effectue essentiellement à partir de H_3PO_4 comme source de phosphore obtenu à partir de l'exploitation des gisements de roches phosphorées. Compte-tenu de la consommation mondiale de phosphore et de l'état actuel des gisements, il faut réfléchir à utiliser d'autres sources de phosphore.

L'utilisation de biomolécules phosphorées est une alternative encore très peu étudiée. Elle présente les avantages d'exploiter des molécules renouvelables, non-toxiques et biocompatibles.

Parmi les métallophosphates poreux, les zincophosphates sont intéressants car :

- Ils ont des applications industrielles.
- Ils cristallisent plus facilement que d'autres métallophosphates.
- Ils contiennent du zinc qui est un élément non (beaucoup moins) toxique que d'autres métaux.

Compte-tenu de la non-toxicité des biomolécules et des zincophosphates, ainsi que de la capacité qu'ont les protéines de réduire certains métaux (bioréduction), la synthèse de

métallophosphates poreux et particulièrement des zincophosphates à partir de biomolécules phosphorées représente un véritable défi. Nous avons couplé ce défi de synthèse « verte » à celui qui consiste à préparer de nouveaux matériaux antibactériens en préparant des zincophosphates poreux contenant des nanoparticules d'argent pour des applications dans les domaines de l'environnement et du biomédical où les zincophosphates sont encore peu étudiés comme vu lors de ce rappel bibliographique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) IUPAC, Recommendations Pure and Applied Chemistry, 57, 1985, p. 603–619.
- (2) IUPAC, Recommendations Pure and Applied Chemistry, 66, 1994, p. 1739–1758.
- (3) IUPAC, Recommendations Pure and Applied Chemistry, 87, 2015, p. 1051–1069.
- (4) H. Awala, J. P. Gilson, R. Retoux, P. Boullay, J. M. Goupil, V. Valtchev, S. Mintova. *Nat. Mater.* 14, 2015, 447–451.
- (5) S. Sareen, V. Mutreja, S. Singh, B. Pal, *J. Colloid Interface Sci.* 461, 2016, 203–210.
- (6) M. Tsang, N. E. Pridmore, L. J. Gillie, Y. H. Chou, R. Brydson, R. E. Douthwaite. *Adv. Mater.* 24, 2012, 3406–3409.
- (7) N. B. McKeown. *Chem. Soc. Rev.* 35, 2006, 675–683.
- (8) A. P. Côté, A. I. Benin, N. W. Ockwig, M. O'Keeffe, A. J. Matzger, O. M. Yaghi. *Science.* 310, 2005, 1166–1170.
- (9) R. Lin, Y. Ding, *Mater. Sci.* 6, 2013, 217–243.
- (10) E. Koohsaryan, M. Anbia. *Chin. J. Catal.* 37, 2016, 447–467.
- (11) IZA structure commission. Site web : www.iza-structure.org
- (12) G. Chaplais, A. Simon-Masseron, F. Porcher, C. Lecomte, D. Bazer-Bachi, N. Bats, J. Patarin *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 2009, 5241–5245.
- (13) J. V. Ramos, F. de Matos Morawski, T. M. Haas Costa, S. L. Pereira Dias, E. V. Benvenutti, E. Weber de Menezes, L. Ticona Arenas. *Microporous Mesoporous Mater.* 217, 2015, 109–118.
- (14) Quarton, Oumba, Freundlich. *Rev. Chim. Miner.* 1984, 311–320.
- (15) S. T. Wilson, B. M. Lok, C. A. Messina, T. R. Cannan, E. M. Flanigen. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 1982, 1146–1147.
- (16) J. J. Pluth, J. V. Smith, J. M. Bennett. *Cryst. Struct. Commun.* 42, 1986, 283–286.
- (17) A. Tuel, S. Caldarelli, A. Menden, L. B. McCusker, C. Baerlocher, A. Ristic, N. Rajic, G. Mali, V. Kaucic, *J. Phys. Chem.* 104, 2000, 5697.
- (18) J. M. Bennett, J.W. Richardson, Jr, J. J. Pluth and J.V. Smith, *Zeolites*, 7, 1987, 90–176.
- (19) J. W. Richardson, J. J. Pluth, J. V. Smith, *Acta Cryst.* 44, 1988, 367–373.
- (20) M. Martis, A. J. Smith, C. Tang, J. E. Parker, T. I. Hyde, M. J. Watson, X. Baucherel, S. Kohara, T. Wakihara, G. Sankar. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 2013, 11766–11774.
- (21) D. Mekhatria, S. Rigolet, C. Janiak, A. Simon-Masseron, M. Abdelkrim Hasnaoui, A. Bengueddach. *Cryst. Growth Des.* 11, 2011, 396–404.

- (22) B. M. Lok, C. A. Messina, R. L. Patton, R. J. Gajeh, T. R. Cannan and E. M. Flanigen, *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1984, 6092–6093.
- (23) W. L. Shea, R. B. Borade, A. Clearfield. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 89, 1993, 3143–3149.
- (24) K. O'Malley, A. Gil, T. Curtin, *Microporous Mesoporous Mater.* 91, 2014, 48–58.
- (25) Z. Xinhong, G. Xiangping, H. Zhixin, Z. Xiaoxiao. *Prog. Chem.* 28, 2016, 686–696.
- (26) V. Naydenoc, L. Tosheva, O. N. Antzugin, J. Sterte, *Microporous Mesoporous Mater.* 78, 2005, 181–188.
- (27) K. Shyamprasad, S. Z. M. Shamshuddin, M. Shyamsundar, N. Thimmaraju, *J. Porous Mater.* 23, 2016, 1095–1105.
- (28) B. T. Holland, P. K. Isbester, C. F. Blanford, E. J. Munson, A. Stein, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1997, 6796–6803.
- (29) T. E. Gier, G. D. Stucky, *Nature*, 349, 1991, 508–510.
- (30) W. T. A. Harrison, T. E. Gier, G. D. Stucky, R. W., Broach, R. Bedard. *Chem. Mater.* 8, 1996, 145.
- (31) N. Rajic, N. Z. Logar, V. Kaucic. *Zeolites.* 15, 1995, 672.
- (32) X. Bu, P. Feng. G. D. Stucky. *J. Solid State Chem.* 125, 1996, 243–248.
- (33) A. Simon, L. Josien, V. Gramlich, J. Patarin. *Microporous Mesoporous Mater.* 47, 2001, 135–146.
- (34) S. Fleith, L. Josien, A. Simon-Masseron, V. Gramlich, J. Patarin. *Solid State Sci.* 4, 2002, 135–141.
- (35) J. Patarin, J. L. Paillaud, H. Kessler. *Handb. Porous Solids 2*, 2002, 815-876.
- (36) W. T. A. Harrison, R. W. Broach, R. A. Bedard, T. E. Gier, X. Bu, G. D. Stucky, *Chem. Mater.* 8, 1996, 691–700.
- (37) L. A. Garcia-Serrano, F. Rey, J. Perez-Pariente, E. Sastre, *Thermochim. Acta.* 376, 2001, 155–162.
- (38) R. Murugavel, S. Kuppuswamy, R. Boomishankan, A. Steiner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 2006, 5536–5540.
- (39) A. C. Kalita, N. Gogoi, R. Jangir, S. Kuppuswamy, M. G. Walawalkar, R. Murugavel, *Inorg. Chem.* 53, 2014, 8959–8969.
- (40) N. Guillou, Q. Gao, P. M. Fortser, J-S Chang, M. Nogues, S-E Park, G. Férey, A. K. Cheetham, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2001, 2831–2834.
- (41) S. H. Jung, J-S Chang, Y. K. Hwang, J-M Grenèche, G. Férey, A. K. Cheetham, *J. Phys. Chem. B*, 109, 2005, 845.
- (42) M. V. Jiménez, M. Algarra, J. J. Jiménez, M. Lamotte, *Chemosphere* 57, 2004, 179–186.
- (43) J. Jimenez-Jimenez, M. Rubio-Alonso, D. E. Quesada, E. Rodriguez-Castellon, A. Jimenez-Lopez, *J. Mater.Chem.* 15, 2005, 3466–3472.
- (44) Y. Zhu, K. Kanamori, N. Moitra, K. Kadono, S. Ohi, N. Shimobayashi, K. Nakanishi. *Microporous Mesoporous Mater.* 225, 2016, 122–127.
- (45) K. Lii, Y. Huang, V. Zima, C. Huang, H. Lin, Y. Jiang, F. Liao, S. Wang, *Chem. Mater.* 10, 1998, 2599–2609.
- (46) J. El Haskouri, A. Moragues, A. Beltran, S. Murcia-Mascaros, F. Plazaola, E. Legarra, A. Mauri-Aucejo, M. Brotons-Gisbert, J. F. Sanchez-Royo, D. Beltran, P. Amoro, *Microporous Mesoporous Mater.* 187, 2014, 14–22.
- (47) J. B. Parise. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1985, 606–607.
- (48) J. B. Parise, *Inorg. Chem.* 24, 1985, 4312–4316.

- (49) A. Merrouche, J. Patarin, H. Kessler, M. Soulard, L. Delmotte, J-L. Guth, JF Joly. *Zeolites*. 12, 1992, 226–232.
- (50) R. I. Walton, F. Millange, T. Loiseau, D. O'Hare, G. Férey, *Angew. Chem., Int. Ed.* 39, 2000, 4552–4555.
- (51) D. J. Jones, G. Aptel, M. Brandhorst, M. Jacquin, J. Jiménez-Jiménez, A. Jiménez-López, P. Maireles-Torres, I. Piwonski, E. Rodríguez-Castellón, J. Zajaca, J. Rozière. *J. Mater. Chem.* 10, 2000, 1957–1963.
- (52) I. Sopyan, M. Mel, S. Ramesh, K.A. Khalid. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 8, 2007, 116–123.
- (53) D. Tadic, F. Beckmann, K. Schwarz, M. Epple, *Biomaterials* 25, 2004, 3335–3340.
- (54) S. Joschek, B. Nies, R. Krotz, A. Gopfrerich, *Biomaterials* 21, 2000, 1645–1658.
- (55) Whittingham, M. S. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 1, 1996, 227–232.
- (56) E. M. Flanigen, R. L. Patton, U. S. Patent 4,073,865, 1978.
- (57) J. Huang, G. Arthanareeswaran, K. Zhang, *Desalination*, 285, 2012, 100–107.
- (58) L. Yang, X. ning, Q. Xiao, K. Chen, M. Zhou, Inc. *J. Biomed. Mater. Res., Part B.* 81B, 2007, 50–56.
- (59) M. Diaz, F. Barba, M. Miranda, F. Guitian, R. Torrecillas, J.S. Moya, *J. Nanomater.* DOI : 10.1155/2009/498505.
- (60) X. Auvray, C. Petipas, R. Anthore, I. Rico, A. Lattes. *J. Phys. Chem.* 93, 1989, 7458–7464.
- (61) U. Ciesla., S. Schacht, G.D. Stucky, K.K. Unger, F. Schuth. *Angew. Chem. Int. Ed.* 35, 1996, 541–543.
- (62) J. Jimenez-Jimenez, P. Maireles-Torres, P. Olivera-Pastor, E. Rodriguez-Castellon, A. Jimenez-Lopez, D. J. Jones, J. Roziere. *Adv. Mater.* 10, 1998, 812–815
- (63) D.J. Jones, G. Aptel, M. Brandhorst, M. Jacquin, J. Jimenez-Jimenez, A. Jimenez-Lopez, P. Maireles-Torres, I. Piwonski, E. Rodriguez-Castellon, J. Zajac. *J. Mater. Chem.* 10, 2000, 1957–1963.
- (64) Z. Luan, D. Zhao, H. He, J. Klinowski, L. Kevan. *J. Phys. Chem. B.* 102, 1998, 1250–1259.
- (65) M. Tiemann, M. Schulz, C. Jäger, M. Fröba. *Chem. Mater.* 13, 2001, 2885–2891.
- (66) Z. Y. Yuan, B. L. Su. *J. Mater. Chem.* 16, 2006, 663–677.
- (67) Q. Huo, R. Xu, S. Li. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 875–876.
- (68) J. L. Paillaud, B. Marler, H. Kessler. *Chem. Commun.* 11, 1996, 1293–1294.
- (69) S. Oliver, A. Kuperman, G. A. Ozin. *J. Mater. Chem.* 7, 1997, 807–812.
- (70) L. Vidal, C. Marichal, V. Gramlich, J. Patarin, Z. Gabelica. *Chem. Mater.* 11, 1999, 2728–2736.
- (71) L. Vidal, V. Gramlich, J. Patarin, Z. Gabelica. *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.* 35, 1998, 545–563.
- (72) L. Lakiss, A. Simon-Masseron, F. Porcher, S. Rigolet, J. Patarin. *Eur. J. Inorg. Chem.* 25, 2007, 4043–4049.
- (73) E. R. Copper, C. D. Andrews, P. S. Wheatley, P. E. Webb, P. Wormald, R. Morris. *Nature*, 430, 2004, 1012–1016.
- (74) E. A. Drylie, D. S. Wragg, E. R. Parnham, P. S. Wheatley, A. M. Z. Slawin, J. E. Warren, R. E. Morris. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 2007, 7839–7843.
- (75) L. Liu, Y. Kong, H. Xu, J. P. Li, J. X. Dong, Z. Lin. *Microporous Mesoporous Mater.* 115, 2008, 624–628.
- (76) L. J. Han, Y. B. Wang, C. X. Li, S. J. Zhang, X. M. Lu, M. J. Cao. *AIChE J.* 54, 2008, 280–288.
- (77) Y. HU, Y. J. Liu, J. Y. Yu, Y. P. Xu, Z. J. Tian, L. W. Lin. *Wuji Huaxue Xuebao.* 22, 2006, 753–756.
- (78) E. R. Parnham, R. E. Morris. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2006, 2204–2205.

- (79) Y. P. Xu, Z. J. Tian, Z. S. Xu, B. C. Wang, P. Li, S. J. Wang, Y. Hu, Y. C. Ma, -K. L. Li, Y. J. Liu, J. Y. Yu, L. W. Lin. *Chin. J. Catal.* 26, 2005, 446–448.
- (80) S. Li, W. Wang, L. Liu, J. Dong. *CrystEngComm*, 15, 2013, 6424–6429.
- (81) X. Zhao, H. Wang, C. Kang, Z. Sun, G. Li, X. Wang. *Microporous Mesoporous Mater.* 151, 2012, 501–505.
- (82) Y. Wang, Y. Xu, Z. Tian, L. Lin. *Cuihua Xuebao.* 3, 2012, 39–50.
- (83) M. Chorghand, M. Haghghi, S. Saedy, S. Aghamohammadi. *Adv. Powder. Technol.* 25, 2014, 1728–1736.
- (84) S. J. Miller US. Patent, N° 4859311, 1989.
- (85) J. Liu, F. Yu, J. Liu, L. Cui, Z. Zhao, Y. Wei, Q. Sun, *J. Environ. Sci.* 48, 2016, 59–68.
- (86) S. Andonova, S. Tamm, C. Montreuil, C. Lambert, L. Olsson. *Applied Catalysis B: Environmental.* 180, 2016, 775–787.
- (87) L.A. Garcia-Serrano, J. Pérez-Pariente, F. Sanchez, E. Sastre. *Catalytic behavior of the microporous hexagonal zincophosphate CZP in base-catalyzed reactions. In Studies in Surface Science and Catalysis, Proceedings of the 12th International Zeolite Conference, Montpellier, France, July 8–13; Galarneau, A., Di Renzo F., Fajula, F., Vedin, J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2000; Vol. 130, p 2987–2992.*
- (88) Garcia, L.A.; Blasco, T.; Pérez, J.; Sastre, E. Microporous zincophosphates as solid based catalysts. In *Studies in Surface Science and Catalysis, Proceedings of the 13th International Zeolite Conference, Montpellier, France, July 8–13; Galarneau, A., Di Renzo F., Fajula, F., Vedin, J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2001; Vol. 135, 137 p.*
- (89) Y. I. Aristov. *Appl. Therm. Eng.* 50, 2013, 1610–1618.
- (90) S. K. Henninger, S-J Ernst, L. Gordeeva, P. Bendix, D. Fröhlich, A. D. Grekova, L. Bonaccorsi, Y. Aristov, J. Jaenchen. *Renewable Energy*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.08.041>. (consulté le 15/06/2016)
- (91) J. Bauer, R. Herrmann, W. Mittelbach, W. Schieger. *Int. J. Energy Res.* 33, 2009, 1233–1249.
- (92) S. Shiovka, K. Oshima, H. Hidaka, T. Takewaki, H. Kakinchi, A. Kodama, M. Kubota, H. Matsuda. *J. Chem. Eng. Jpn.* 40, 2007, 1330–1334.
- (93) E-P Ng, L. Delmotte, S. Mintova. *ChemSusChem.* 2, 2009, 255–260.
- (94) T. Xie, H. Guo, J. Zhang, C. Odetola, Y. He, H. Lin, G. Chen, Z. Zheng. *J. Rare Earths.* 33, 2015, 1056.
- (95) J. Gu, Bingyan. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 10, 2008, 405–409.
- (96) S. Mukherjee, D. P. Dutta, N. Manoj, A. K. Tyagi. *J. Lumin.* 134, 2013, 880–887.
- (97) W. Tang, M. Wang, X. Meng, W. Lin. *Opt. Mater.* 54, 2016, 120–125.
- (98) H. Meyssamy, K. Riwozki, A. Kornowski, S. Naused, M. Haase. *Adv. Mater.* 11, 1999, 840–844.
- (99) Y. Wang, X. X. Wang, Z. Su, Q. Guo, Q. -H. Tang, Q. H. Zhang, H. L. Wan. *Catal. Today.* 93–95, 2004, 155–161.
- (100) A. K. Padhi, K. S. Nanjundaswamy, C. Masquelier, S. Okada, J. B. Goodenough. *J. Electrochem. Soc.* 144, 1997, 1609–1613.
- (101) J. K. Kim, R. Vijaya, L. Zhu, Y. Kim. *J. Power Sources* 275, 2015, 106–110.
- (102) X. Y. Tian, W. He, J. J. Cui, X. D. Zhang, W. J. Zhou, S. P. Yan, X. N. Sun, X. X. Han, S. S. Han, Y. Z. Yue. *J. Colloid Interface Sci.* 343, 2010, 344–349.

- (103) I. W. Arends, R. A. Sheldon, R. A. Wallau, H. M. Kao. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 36, 1997, 1144–1163.
- (104) L. Herschke, J. Rottstegge, I. Lieberwirth, G. Wegner. *J Mater Sci Mater Med.* 17, 2006, 81–94.
- (105) L. Herschke, I. Lieberwirth, G. Wegner. *J Mater Sci Mater Med.* 17, 2006, 95–104.
- (106) S. K. Mallineni, S. Nuvvula, J. P. Matinlinna, C. K. Yiu, N. M. King. *J Investig Clin Dent.* 4, 2013, 9–19.
- (107) G. Sjögren, G. Sletten, J. E. Dahl. *J. Prosthet. Dent.* 84, 2000, 229–236.
- (108) T. Stenberg. *Scand. J. Dent. Res.* 90, 1982, 472–479.
- (109) R. G. Craig, C. T. Hanks. *J Oral Pathol.* 17, 1988, 341–347.
- (110) Jones DW. Ceramics and glass as restorative materials. In: Smith DC, Williams DF, editors. *Bicompatibility of dental materials*. Chap 5, Vol IV. Boca Raton: CRC Press; 1982. p. 79–122.
- (111) M. Uo, G. Sjorenb, A. Sundhc, F. Wataria, M. Bergmanb, U. Lerner. *Dent. Mater.* 19, 2003, 487–492.
- (112) B. Czarnecka, H. Limanowska-Shaw, J.W. Nicholson, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 14, 2003, 601–604.
- (113) W. Nicholson, M. A. Amiri, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 9, 1998, 549–554.
- (114) B. Latifi-Xhemajli, J. Véronneau, A. Begzati, A. Bytyci, A. Rexhepi. *Eur J Paediatr Dent.* 17, 2016, 70–74.
- (115) T. N. Phan, T. Buckner, J. Sheng, J. D. Baldeck, R. E. Marquis. *Oral Microbiol. Immunol.* 19, 2004, 31–8.
- (116) D. Wunder, W. H. Bowen. *Arch Oral Biol.* 44, 1999, 203–214.
- (117) P. D. Marsh. *J. Clin. Periodontol.* 18, 1991, 462–467.
- (118) X. Chen, Q. L. Tang, Y. J. Zhu, C. L. Zhu, X. P. Feng. *Mater. Lett.* 89, 2012, 233–235.
- (119) F. Barrère, C. A van Blitterswijk, K. de Groot. *Int. J. Nanomed.* 1, 2006, 317–332.
- (120) A. Niakana, S. Ramesha, P. Ganesana, C. Y. Tana, J. Purbolaksonoa, HariChandranb, S. Rameshc, W. D. Tengd. *Ceram. Int.* 41, 2015, 3024–3029.
- (121) D. F. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, 1999, p.349.
- (122) D. F. Williams, *Biomaterials.* 30, 2009, 5897–5909.
- (123) M. Narváez. Propuesta para el análisis de las propiedades mecánicas del hueso esponjoso vertebral. Tesis (Licenciatura en ingeniería). México DF. Universidad Nacional Autónoma de México. 2004.
- (124) B. Du, W. Liu, Y Deng, S. Li, X. Liu, Y. Gao, L. Zhou. *Int. J. Nanomed.* 10, 2015, 2555–2565.
- (125) M. Otsuka, S. Marunaka, Y. Matsuda, A. Ito, P. Layrolle, H. Naito, N. Ichinose. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 2000, 819–824.
- (126) M. Calasans-Maia, G. V. O. Fernandes, A. M. Rossi, E. P. Dias, G. D. S. Almeida, F. F. Mitri, J. M. Granjeiro. *Key Eng. Mater.* 361–363, 2008, 1273–1276.
- (127) Y Sogo, T Sakurai, K Onuma, A Ito. *J Biomed Mater Res.* 62, 2002, 457–63.
- (128) R. F. B. Resende, G. V. O. Fernandes, S. R. A. Santos, A. M. Rossi, I. Lima, J. M. Granjeiro, M. D. Calasans-Maia. *J Mater Sci Mater Med.* 24, 2013, 1455–63.
- (129) H. Kawamura, A. Ito, T. Muramatsu, S. Miyakawa, N. Ochiai, T. Tateishi. *J Biomed Mater Res A.* 65, 2003, 468–74.
- (130) A. Ito, K. Ojima, H. Naito, N. Ichinose, T. Tateish. *J Biomed Mater Res.* 50, 2000, 178–83.
- (131) S. Hesaraki, R. Nemati, N. Nosoudi. *Adv. Appl. Ceram.* 108, 2009, 231–240.
- (132) M. P. Ginebra, T. Traykova, J. A. Planell. *J. Controlled Release* 2006, 113, 102–110.

- (133) D. Olton, J. Li, M. E. Wilson, T. Rogers, J. Clos, L. Huang, P. N. Kumt, C. Sfeir. *Biomaterials* 28, 2007, 1267–1279.
- (134) C. Combes, C. Rey, Biomatériaux à base de phosphates de calcium. *Techniques de l'Ingénieur*, 33, N4 950, 2013.
- (135) Y. Feng, J. L. Gong, G-M. Zeng, Q. Y. Niu, H. Y. Zhang, C. G. Niu, J. H. Deng, M. Yan. *Chem. Eng. J.* 15, 162, 2010, 487–494.
- (136) M. Srinivasan, C. Ferraris, T. White, *Environ. Sci. Technol.* 40, 2006, 7054–7059.
- (137) T. Moriguchi, K. Yano, S. Nakagawa, F. Kaji. *J. Colloid Interface Sci.* 260, 2003, 19–25.
- (138) W. Wei, R. Sun, J. Cui, Z. Wei, *Desalination.* 263, 2010, 89–96.
- (139) P. Chankachang, S. Chantara, S. Punyanitya, C. Saelee. *Adv. Mater. Res.* 979, 2014, 66–69.
- (140) L. Yang, X. Ning, K. Chen, H. Zhou *Ceram. Int.* 33, 2007, 483–489.
- (141) Les engrais Organo-minéraux, Lettre N° 17, Union des Industries de la Fertilisation (UNIFA), 2008, France. Document version on-line. <http://www.unifa.fr/fichiers/lettres/lettre17.pdf> (consulté le 5/7/2016)
- (142) Jean-Claude Fardeau, Le phosphore et la vie dans des contextes d'ag roécosystèmes durables, Les Journées de l'Agronomie organisées par AGRO-Systèmes SAS Laboratoires, Septembre 2010, France. Site web : <http://www.agro-systemes.com/fichiers-pdf/1-jc-fardeau-conference-phosphore-sept-2010-resume.pdf> (consulté le 5/6/2016)
- (143) Phosphate Rock, U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, January 2016, p.124–125. Document version on line. <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2016/mcs2016.pdf> (consulté le 6/6/2016)
- (144) J. D. Edixhoven, J. Gupta, H. H. G. Savenije. *Earth Syst. Dynam.* 5, 2014, 491–507.
- (145) S. J. V. Kauwenbergh. International Center for Soil Fertility and Agricultural Development. 75, 2010, 58.
- (146) Phosphoric Acid, Chemical Economics Handbook, IHS Markit, September 2015, UK. Site web : <https://www.ihs.com/products/phosphoric-acid-chemical-economics-handbook.html> (consulté le 10/08/2016)
- (147) S. Belboom, C. Szöcs, A. Léonard. *J. Cleaner Prod.* 108, 2015, 978–986.
- (148) N. Peelman, P. Ragaert, A. Vandemoortele, E. Verguldt, B. De Meulenaer, F. Devlieghere. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 26, 2014, 319–329.
- (149) A. K. Mohanty, M. Misra, L. T. Drzal. *J. Polym. Environ.* 10, 2002, 19–26.
- (150) Z. Zhang, H. Liao, W. J. Lucas. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 2014, 192–220.
- (151) G. Burnett, E. P. Kennedy. *J. Biol. Chem.* 211, 1954, 969–80.
- (152) X. Zhang, F. Geng, X. Huang, M. Ma. *J. Inorg. Biochem.* 159, 2016, 76–81.
- (153) H. M. Farrell Jr, E. L. Malin, E. M. Brown, P. X. Qi. *Curr. Opin. Colloid. In.* 11, 2006, 135–147.
- (154) T. Croguennec, R. Jeantet, G. Brulé. *Fondements physicochimiques de la technologie laitière*, Editions TEC & Doc, Lavoisier, 2008, p. 84.
- (155) C. Phadungath, J. Songlanakaran, *Sci. Technol.* 27, 2005, 2010–2012.
- (156) D.S. Horne. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 2006, 148–153.
- (157) D. G. Schmidt. *Dev. Dairy Chem.* 1982, 61–86.

- (158) J. Amiot, F. Fournier, Y. Lebeuf, P. Paquin, R. Simpson. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, 2002, 1–73.
- (159) D. G. Dalgleish, P. A. Spagnuolo, H. D. Goff, *Int. Dairy J.* 14, 2004, 1025–1031.
- (160) D. J. McMahon, R. J. Brown, *J Dairy Sci* 67, 1984, 499–512.
- (161) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nucleotide_voorstelling_NL.png
- (162) J. D. Carver. *J. Nutr.* 124, 1994, 144S–148S.
- (163) N. Sauer, R. Mosenthin, E. Bauer. *Nutr. res. rev.* 24, 2011, 46–59.
- (164) M. Tackoen. *Bruxelles-Med.* 33, 2012, 309–17.
- (165) S. Loukovaara, S. Sahanne, S. Jalkanen, G. G. Yegutkin. *Acta Ophthalmol.* 93, 2015, 67–73.
- (166) H. R. Horton, L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn, K. G. Scrimgeour. "Principes de Biochimie" Ed. DeBoeck Universités. Pearson Education, Inc., France, 1994.
- (167) D. Ming, Y. Ninomiya, R. F. Margolskee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1999, 9903–9908.
- (168) C. Abraham. The revolutionary molecules that turn bland food bodacious. The Globe and Mail (Toronto) 1 Février 2003. Site web: <http://www.theglobeandmail.com/technology/science/the-revolutionary-molecules-that-turn-bland-food-bodacious/article1010361/> (consulté le 21/06/2016)
- (169) H. Burtscher, S. Berner, R. Seibl, K. Muhlegger. *Ullmann's Biotechnol. Biochem. Eng.* 1, 2007, 157–194.
- (170) C. F. A. Bryce, D. Pacini, Editor Mrs D. Gull. The Biochemical Society. Printed by Holbrooks Printers Ltd, Portsmouth, U.K. the Structure and Function of Nucleic Acids, 1998.
- (171) Reproduction conforme de la cellule et répllication de l'ADN. Site web : <http://lewebpedagogique.com/brefjailuleblogduprofdesvt/2013/12/08/theme-1a1-chapitre-3-reproduction-conforme-de-la-cellule-replication-de-ladn/> (consulté le 22/06/2016)
- (172) W. Dowhan. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 1997, 199–232.
- (173) S. Higurashi, Y. Haruta-Ono, H. Urazono, T. Kobayashi, and Y. Kadooka. *J. Dairy Sci.* 98, 2015, 6706–6712.
- (174) T. Ferreira, L. Gayoso, J. L. Rodríguez-Otero. *J. Dairy Sci.* 98, 2014, 9–14.
- (175) Phospholipides <https://fr.wikipedia.org/wiki/Phospholipide>
- (176) <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255chem/mcb2.20.micelle.jpg>
- (177) X-Y. Zhao, Y. J. Zhu, B-Q. Lu, F. Chen, C. Qi, J. Zhao, J. Wu, *Mater. Res. Bull.* 55, 2014, 67–70.
- (178) C. Qi, Y. J. Zhu, X. Y. Zhao, B. Q. Lu, Q. L. Tang, J. Zhao, F. Chen. *Chem. Eur. J.* 19, 2013, 981–987.
- (179) C. Qi, Q. L. Tang, Y. J. Zhu, X. Y. Zhao, F. Chen. *Mater. Lett.* 85, 2012, 71–73.
- (180) G. J. Ding, Y. J. Zhu, G. F. Cheng, Y. J. Ruan, C. Qi, T. W. Sun, J. Wu, F. Chen. *Mater. Lett.* 160, 2015, 242–245.
- (181) S. Xu, B. Yin, J. Guo, C. Wang. *J. Mater. Chem. B.* 1, 2013, 4079–87.
- (182) X. Y. Zhao, Y. J. Zhu, C. Qi, F. Chen, B. Q. Lu, J. Zhao, J. Wu. *Chem. Asian J.* 8, 2013, 1313–1320.
- (183) X. Y. Zhao, Y. J. Zhu, B. Q. Lu, F. Chen, C. Qi, J. Zhao, J. Wu. *Mater. Res. Bull.* 55, 2014, 67–70.
- (184) C. Qi, Y. J. Zhu, F. Chen. *Chem. Asian J.* 8, 2013, 88–94.
- (185) C. Qi, Y. J. Zhu, B. Q. Lu, X. Y. Zhao, J. Zhao, F. Chen, J. Wu. *Chem. Eur. J.* 19, 2013, 5332–5341.
- (186) F. Chen, Y. J. Zhu, X. Y. Zhao, B. Q. Lu, J. Wu, *CrystEngComm*, 15, 2013, 4527–4531.

- (187) J. Zhao, Y. J. Zhu, G. F. Cheng, Y. J. Ruan, T. W. Sun, F. Chen, J. Wu, X. Y. Zhao, G. J. Ding. *Mater. Lett.* 124, 2014, 208–211.
- (188) X. Y. Zhao, Y. J. Zhu, F. Chen, B. Q. Lu, C. Qi, J. Zhao, J. Wu. *CrystEngComm.* 15, 2013, 7926–7935.
- (189) C. H. Yeo, S. H. S. Zein, A. L. Ahamad, D. S. McPhail. *Ceram. Int.* 38, 2012, 561–570.
- (190) L. S. Nelson, C. Holt, D. W. L. Hukins. *Phys. B.* 158, 1989, 103–104
- (191) V. A. Mittal, A. E. Ellis, A. Ye, P. J. B. Edwards, S. Das, H. Singh. *Food Chemistry* 190, 2016, 128–134.
- (192) B. A. Annous, P. M. Fratamico, J. L. Smith. *J. Food Sci.* 74, 2009, 24–37.
- (193) R. M. Donlan. *Emerging Infect. Dis.* 8, 2002, 881–890.
- (194) J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg. *Science.* 284, 1999, 1318–1322.
- (195) J. W. Costerton, G. G. Geesey, K. J. Cheng. *Sci. Am.* 238, 1978, 86–95.
- (196) P. Fay, C. Van Baalen. *The Cyanobacteria.* Elsevier, Amsterdam, 1987, 513–534.
- (197) B. S. C. Leadbeater, M. E. Callow. *Formation, Composition and Physiology of Algal, Biofilms-Science and Technology,* 1992, 223, 149–162.
- (198) J. LeBœuf, D. Cuppels. *Maladies bactériennes de la tomate : Tache bactérienne, moucheture bactérienne, chancre bactérien, Fiche technique.* Agriculture et Agroalimentaire Canada; 2009. Site web : <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/05-070.htm#2> (consulté 12/11/2016)
- (199) D. Enning, J. Garrelfs. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2014, 1226–1236.
- (200) F. Gauthier. *Biofilms et qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution, Mémoire de DESS, Qualité et Gestion de l'Eau, Amiens, Université de Picardie, 2002, 78 p.*
- (201) S. Saby. P. Leroy, J. C. Block. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1999, 5600–5603.
- (202) J. H. Ryu, L. R. Beuchat. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2005, 247–254.
- (203) F. Aldeek. *Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens, Mémoire de thèse, Nancy, Université Henri Poincaré, 2010, 225 p.*
- (204) P. D. Marsh, D. J. Bradshaw. *J. Ind. Microbiol.* 15, 1995, 169–175.
- (205) S. Macfarlane, J. F. Dillon. *J. Appl. Microbiol.* 102, 2007, 1187–1196.
- (206) A. L. Cogen, V. Nizet, R. L. Gallo. *Br. J. Dermatol.* 158, 2008, 442–55.
- (207) T. Coenye, H. J. Nelis. *J. Microbiol. Methods.* 83, 2010, 89–105.
- (208) P. E. Kolenbrander, Jr. R. J. Palmer, M. A. Ghannoum, G. A. O'Toole. *Microb. Biofilms.* 2004.
- (209) J. L. Del Pozo, R. Patel. *N. Engl. J. Med.* 361, 2009, 787–794.
- (210) P. Tenke, P. B. Köves, K. Nagy, S. J. Hultgren, W. Mendling, B. Wullt, M. Grabe, F. M. Wagenlehner, M. Cek, R. Pickard, H. Botto, K. G Naber, T. E. B. Johansen. *World J. of Urol.* 30, 2012, 51–57.
- (211) P. Stoodley, C. Fux, M. D. P. Dirckx, *Montana State University Center for Biofilm Engineering,* 2003. Site web : <https://www.biofilm.montana.edu/resources/images/healthmedical-biofilms/sites-primary-and-secondary-infection.html> (consulté 18/11/2016).
- (212) L. Ploux, A. Ponche, K. Anselme. *J. Adhes. Sci. Technol.* 24, 2010, 2165–2201.
- (213) Y. H. An, R. J. Friedman. *J. Biomed. Mater. Res., Part B.* 43, 1998, 338–348.
- (214) W. M. Jr. Dunne. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 2002, 155–166.
- (215) B. Derjaguin, L. Landau. *Acta Physicochim.* 14, 1941, 633–62.

- (216) E. J. W. Verwey, J. T. G. Overbeek, Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier Pub. Co. Inc. Amsterdam, 1948.
- (217) P. Stoodley, D. de beer, J. D. Boyle, H. M. Ippin-Scott. *Biofiling*. 14, 1999, 75–94.
- (218) C. Prigent-Combaret, E. Brombacher, O. Vidal, A. Ambert, P. Lejeune, P. Landini, C. Dorel. *J. Bacteriol*, 183, 2001, 7213–7223.
- (219) D. B. Kearns. *Nat. Rev. Microbiol*. 8, 2010, 634–644.
- (220) J. S. Mattick. *Annu. Rev. Microbiol*. 56, 2002, 289–314.
- (221) K. Sauer, A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, D. G. Davies. *J. Bacteriol*. 184, 2002, 1140–1154.
- (222) H. C. Flemming, T. Neu, D. Wozniak. *J. Bacteriol*. 189, 2007, 7945–7947.
- (223) G. Stevenson, K. Andrianopoulos, M. Hobbs, P. Reeves. *J. Bacteriol*. 178, 1996, 4885–4893.
- (224) F. Götz. *Mol. microbiol*. 43, 2002, 1367–1378.
- (225) M. B. Miller, B. L. Bassler. *Annu. Rev. Microbiol*. 55, 2001, 165–199.
- (226) W. G. Characklis. *Biotechnol. Bioeng*. 23, 1981, 1923–1960.
- (227) M. G. Trulear. Rate of Biofilm Development in a Turbulent Flow Field, M.S. thesis, Houston, Rice University, TX, 1979.
- (228) B. A. Annous, G. M. Sapers, A. M. Mattrazzo, D. C. R. Riordan. *J. Food. Prot*. 64, 2001, 159–163.
- (229) Staph Infection Pictures, Public health image library database (PHIL), US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). ID2264, 2012. Site web : https://phil.cdc.gov/PHIL/Images/10032002/00004/PHIL_2264_lores.jpg (consulté le 25/11/2016)
- (230) S. Baillif, D. Hartmann, J. Freney, L. Kodjikian. *Journal Français d'ophtalmologie*. 33, 2010, 210–221.
- (231) P. Bonin, J. F. Rontani, L. Bordenave, *FEMS. Microbiol. Lett*. 194, 2001, 111–119.
- (232) L. Montanaro, C. R. Arciola. Handbook of Bacterial Adhesion Principles, Methods, and Applications, Y. H. An, R. J. Friedman (Eds.). Humana Press, Springer Science, New York, 2000.
- (233) J. W. Costerton. *Biofilm. Clin. Orthop. Relat. Res*. 437, 2005, 7–11.
- (234) R. Ballay, I. Landor, F. Růžička, P. Melicherčík, J. Tomaidés, D. Jahoda. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech*. 83, 2016, 163–168.
- (235) A. Braem, L. Van- Mellaert, D. Hofmans, E. De Waelheyns, J. Anné, J. Schrooten, J. Vleugels, *Powder Metall*. 56, 2013, 267–271.
- (236) S. Lee, N. Maronian, S. P. Most, M. E. Whipple, T. M. McCulloch, R. B. Stanley, D. Gregory Farwell. *Arch. Otolaryngol., Head Neck Surg*. 131, 2005, 447.
- (237) S. G. J. Ng, S. A. Madill, C. F. Inkster, A. J. Maloof, B. Leatherbarrow. *Eye*, 15, 2001, 578–582.
- (238) M. Spector, W. R. Flemming, B. W. Sauer. *J. Biomed. Mater. Res*. 9, 1975, 537–542.
- (239) H. Son, M. Cho, J. Kim, B. Oh, H. Chung, J. Yoon. *Water Res*. 39, 2005, 7211–7727.
- (240) J. Koivunen, H. Heinonen-Tanski. *Water Res*. 39, 2005, 1519–1526.
- (241) W. Gujer, U. Von-Guten. *Water Res*. 37, 2003, 1667–1677.
- (242) M. Matsushashi, A. N. Pankrushina, E. Katsura, H. Watanabe, Y. Mano, M. Hyodo, T. Fujita, K. Kunugita, T. Kaneko, S. Otani. *J. Bacteriol*. 177, 1995, 688–693.
- (243) A. Lemley, L. Wagenetand, B. Kneen. Activated Carbon Treatment of Drinking Wate Cornell Cooperative Extension, College of Human Ecology, Water Traitement Notes, 3 December 1995. Site web :

- <http://waterquality.cce.cornell.edu/publications/CCEWQ-03-ActivatedCarbonWtrTrt.pdf> (consulté le 2/11/2016).
- (244) Y. Inoue, Y. Kanzaki. *J. Inorg. Biochem.* 67, 1997, 377.
- (245) T. F. Clasen, J. Brown, S. Collin, O. Suntura, S. Cairncros. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 2004, 651–657.
- (246) A. Vinka, O. Craverand, J. A. Smith. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2008, 927–933.
- (247) L. Akhigbe, S. Ouki, D. Saroj, *Chem. Eng. J.* 295, 2016, 92–98.
- (248) N. Gordon, Y. Zhongren, M. Sharifeh, E. Mintz, J. Economy. *Nanotechnology.* 20, 2009, 495705–495715.
- (249) A. Top, S. Ulku. *Appl. Clay Sci.* 27, 2004, 13–19.
- (250) Z. Milan, C. De las Pozas, M. Cruz, R. Borja, E. Sanchez, K. Ilangonavan, Y. Espinosa, B. Luna J. *Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng.* 36, 2001, 1073–1087.
- (251) P. Yang. Un mini-jardin dans un aquarium, Larousse, ISBN : 2035902746, 20 mai 2015, 127 p.
- (252) M. P. Ferraz, F. J. Monteiro, D. Giao, B. Leon, P. Gonzalez, S. Liste, J. Serra, J. Arias, M. Perez-Amor. *Bioceramics.* 16, 2004, 347–350.
- (253) M. Jarcho. *Dent. Clin. North Am.* 36, 1992, 19–26.
- (254) L. Grenho, M. C. Manso, F. J. Monteiro, M. P. Ferraz. *J. Biomed. Mater. Res., Part A.* 100, 2012, 1823–1830.
- (255) D. Neut, R. J. B. Dijkstra, J. I. Thompson, C. Kavanagh, H. C. van der Meil, H. J. Bussche. *Eur. Cells Mater.* 29, 2015, 42–56.
- (256) L. Yang, S. Jian–jun. *J. Laryngol. Otol.* 5, 2010, 24–29.
- (257) J. Dai, M. L. Bruening. *Nano Lett.* 2, 2002, 497.
- (258) Q. Wang, H. Yu, L. Zhong, J. Liu, J. Sun, J. Shen. *Chem. Mater.* 18, 2006, 1988–1994.
- (259) N. Marquestaut, Y. Petit, A. Royon, P. Mounaix, T. Cardinal, L. Canioni. *Adv. Funct. Mater.* 24, 2014, 5824–5832.
- (260) I. Sondi, B. Salopek-Sondi. *J. Colloid Interface Sci.* 275, 2004, 177–182.
- (261) G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero. *Molecules.* 20, 2015, 8856–8874.
- (262) J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B Kouri, J. Tapia Ramirez, M. J. Yacaman. *Nanotechnology* 16, 2005, 2346–2353.
- (263) M. A. Radziga, V. A. Nadochenkoc, O. A. Koksharovaa, J. Kiwib, V. A. Lipasovaa, I. A. Khmela. *Colloids Surf., B.* 102, 2013, 300–306.
- (264) J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, R. H. Hurt. *ACS Nano.* 4, 2010, 6903–6913.
- (265) Z. M. Xiu, Q. B. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, P. J. J. Alvarez. *Nano Lett.* 12, 2012, 4271–4275.
- (266) X. Dong, X. Ji, H. Wu, L. Zhao, J. Li, W. Yang, *J. Phys. Chem. C.* 113, 2009, 6573.
- (267) V. K. Sharma, R. A. Yngard, Y. Lin. *Adv. Colloid Interface Sci.* 145, 2009, 83–96.
- (268) H. Yin, T. Yamamoto, Y. Wada, S. Yanagida. *Mater. Chem. Phys.* 83, 2004, 66–70.
- (269) L. Coronato Courrol, F. Rodrigues de Oliveira Silva, L. Gomes. *Colloids Surf., A.* 305, 2007, 54–57.
- (270) L. Castro, M. L. Blázquez, F. González, J. Ángel Muñoz, A. Ballester. *IET Nanobiotechnol.* 9, 2015, 252–258.
- (271) M. N. Nadagouda, R. S. Varma. *Cryst. Growth Des.* 7, 2007, 2582–2587.

- (272) S. Ashrafa, A. Z. Abbasi, C. Pfeiffer, S. Zajif Hussain, Z. Mahmood Khalida, P. Rivera Gil, W. J. Parak, I. Hussain. *Colloids Surf., B* 102, 2013, 511–518.
- (273) J. P. Xie, Y. G. Zheng, J. Y. J. Ying. *Am. Chem. Soc.* 131, 2009, 888–889.
- (274) J. P. Xie, Y. G. Zheng, J. Y. J. Ying. *Chem. Commun.* 46, 2010, 961–963.
- (275) H. Wei, Z. Wang, L. Yanga, S. Tian, C. Hou, Y. Lu, *Analyst.* 135, 2010, 1406–1410.
- (276) S. K. Das, Md. M. R. Khan, T. Parandhaman, F. Laffir, A. K. Guha, G. Sekaran, A. B. Mandal. *Nanoscale.* 5, 2013, 5549–5560.
- (277) K. Quester, M. Avalos-Borja, E. Castro-Longoria, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 7, 2016, 118–125.
- (278) K. Shameli, M. B. Ahmad, M. Zargar, W. M. Yunus, N. A. Ibrahim. *Int J Nanomedicine.* 6, 2011, 331–41.
- (279) L. Akhigbe, S. Ouki, D. Saroj. *Chem. Eng. J.* 295, 2016, 92–98.
- (280) M. Diaz, F. Barba, M. Miranda, F. Gui tian, R. Torrecillas, J. S. Moya. *J. Nanomater.* 14, 2009.
- (281) S. Chen, I. Darby. *Aust. Dent. J.* 2003, 48, 212–220.
- (282) G. Nangmenyi, Z. Yue, S. Mehrabi, E. Mintz, J. Economy. *Nanotechnology.* 20, 2009, 495–705.
- (283) H. van der Laan, D. van Halem, P. W. M. H. Smeets, A. I. A. Soppe, J. Kroesbergen, G. Wubbels, J. Nederstigt, I. Gensburger, S. G. J. Heijman. *Water research.* 51, 2014, 47–54.
- (284) I. De la Rosa-Gomez, M. T. Olguin, D. Alcantara. *J. Environ. Manage.* 88, 2008, 853–863.
- (285) S. Tan, L. Zhang, Y. Liu, Q. Shi, Y. Ouyang, Y. Chen. *J. Ceram. Soc. Jpn.* 116, 2008, 767–770.
- (286) T. N. Kim, Q. L. Feng, J. O. Kim, J. Wu, H. Wang, G. C. Chen, F. Z. Cui. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 9, 1998, 129–134.

CHAPITRE II

Protocoles expérimentaux et description des techniques de caractérisation

II.1. Sources de réactifs utilisés

II.1.1. Réactifs organiques : biomolécules

Les biomolécules utilisées comme source de phosphore lors de notre étude sont listées dans le Tableau II-1.

Tableau II-1. Liste des biomolécules utilisées.

| Réactif | Pureté | Fournisseur | Prix (€) |
|---|-------------------|---------------|--------------|
| caséine (poudre) | qualité technique | Sigma-Aldrich | 38,2 (500 g) |
| adénosine 5'-monophosphate (AMP) monohydraté ($C_{10}H_{14}N_5O_7P.H_2O$) | > 97 % | Sigma-Aldrich | 37,8 (5 g) |
| adénosine 5'-monophosphate (AMP), sel de disodium ($C_{10}H_{12}N_5Na_2O_7P$) | > 99 % | Sigma-Aldrich | 34,5 (5 g) |
| adénosine 5'-triphosphate (ATP), sel de disodium hydraté ($C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3.xH_2O$) | 99 % | Alfa-Aesar | 27,2 (1g) |

II.1.2. Réactifs inorganiques

Les sources minérales utilisées au cours de nos travaux sont regroupées dans le Tableau II-2.

Tableau II-2. Liste des réactifs inorganiques utilisés.

| Réactif | Pureté | Fournisseur |
|--|--------|---------------|
| nitrate de zinc hexahydraté ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) | 99 % | Alfa-Aesar |
| nitrate d'aluminium nonahydraté ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) | 99 % | Carlos-Erba |
| hydroxyde de sodium (NaOH) (pastilles) | 98 % | Carlos-Erba |
| acide chlorhydrique (HCl) 1M | 100 % | Sigma-Aldrich |
| nitrate d'argent ($AgNO_3$) | 99 % | Sigma-Aldrich |

II.2. Mode opératoire

Les synthèses des métallophosphates (zinco- et aluminophosphates) biosourcés ont été réalisées par voie hydrothermale. Elles ont suivi une même démarche expérimentale (l'ordre d'ajout des réactifs, lavage, séchage,...) décrite dans la Figure II-1 ainsi que des conditions de calcination des solides similaires. Dans la mesure du possible et pour des fins comparatives nous avons essayé de maintenir une même logique d'étude pour la synthèse des matériaux indépendamment de la nature de la biomolécule utilisée.

II.2.1. Synthèse hydrothermale des matériaux

Les synthèses hydrothermales ont été effectuées dans des flacons en polypropylène (PP) et des autoclaves en acier inoxydable contenant une chemise en Téflon[®] pour des synthèses effectuées à des températures $\leq 100^{\circ}\text{C}$ et $> 100^{\circ}\text{C}$ respectivement. La Figure II-1 schématise le protocole de synthèse. La biomolécule a été mise en solution aqueuse en présence de NaOH car les anions hydroxyde, en plus d'être importants pour l'édification de la charpente minérale métallophosphate favorisent, en rendant le milieu basique, la dissolution et l'hydrolyse de la biomolécule permettant la libération des groupements phosphate de sa structure. Les éléments zinc et aluminium ont été ensuite introduits *via* le sel associé sous forme de nitrate. Après agitation mécanique pendant 20 min à température ambiante, le gel obtenu a été transvasé dans un flacon ou autoclave qui a été ensuite chauffé pendant six jours (6 j) à des températures comprises entre 60°C et 160°C . Passé ce délai et après refroidissement à température ambiante, le mélange hétérogène récupéré a été filtré sous vide et le solide lavé à l'eau. Enfin, le solide a été séché en étuve à 70°C durant une nuit. Ce solide est nommé produit « brut de synthèse ».

Des mélanges réactionnels ont été préparés en petits et « gros » volumes d'environ 12 mL et 250 mL respectivement. Des flacons en polypropylène (PP) de 150 mL et des autoclaves de 23 mL ont été utilisés dans le premier cas, alors que des flacons en PP de 500 mL et des autoclaves de 48 mL ont été employés pour les plus gros volumes (Figure II-2). Les synthèses faites avec des nucléotides ont été réalisées en petite quantité car les nucléotides sont des réactifs (plus) coûteux en comparaison avec la caséine (Tableau II-1). Les synthèses réalisées avec la caséine ont été préparées en « gros » volumes.

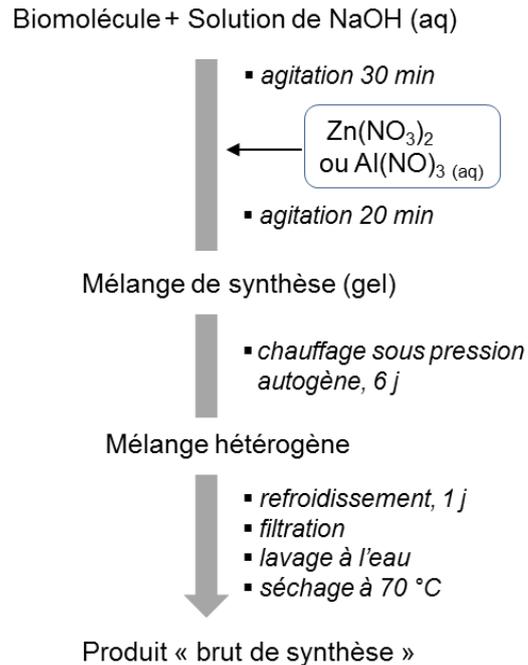


Figure II-1. Protocole de synthèse hydrothermale des métallophosphates biosourcés.



Figure II-2. Exemples de flacons en PP (à droite) et d'autoclave en acier inoxydable avec sa chemise en Téflon® (à gauche) utilisés.

II.2.2. Traitement thermique des solides : calcination

Le solide sec récupéré à l'issue de la synthèse hydrothermale, c'est-à-dire le produit brut de synthèse, a ensuite été calciné. Cette calcination, qui peut être réalisée sous différentes atmosphères, a initialement pour buts :

- De désorber les molécules physisorbées.
- De décomposer les molécules organiques.
- De libérer la porosité.

Les produits ont été calcinés dans un creuset placé dans un four à moufle (Nagat) équipé d'un régulateur de température (Gulton, West 2050). Les calcinations ont été réalisées sous air en partant de la température ambiante jusqu'à la température souhaitée avec une vitesse de montée en température variant entre 1 et 8 °C. min⁻¹, classiquement 5 °C. min⁻¹. La température finale a été maintenue durant 4 h. Le refroidissement des échantillons a suivi l'inertie du four.

II.3. Techniques expérimentales de caractérisation

II.3.1. Diffraction de rayons X

Principe de la technique

La DRX a été largement utilisée au cours de ce travail pour déterminer les phases cristallisées présentes dans les poudres. Le diffractogramme de rayons X obtenu lors de ces analyses peut également nous révéler d'autres informations telles que les paramètres de maille, le système cristallin ainsi que la taille apparente des cristallites. Le phénomène mis en jeu repose sur la diffusion cohérente et élastique qui se produit lorsque les rayons X envoyés sur la matière réagissent avec cette dernière si celle-ci est organisée. L'onde diffractée résulte de l'interférence des ondes diffusées par chaque atome comme représenté sur la Figure II-3.

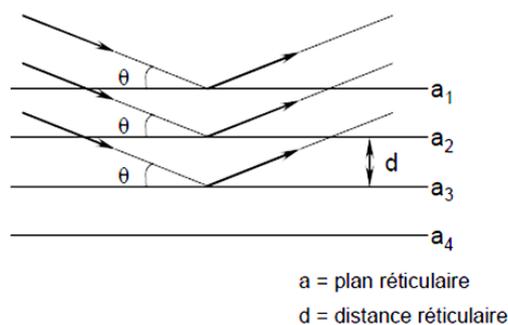


Figure II-3. Principe de la loi de Bragg

La matière organisée, appelée corps cristallin, peut être considérée comme un assemblage de plans réticulaires séparés par une distance dite inter-réticulaire (d_{hkl}). Lorsque les rayons X irradient le matériau cristallin, ceux-ci sont réfléchis par les familles de plans indexés selon les indices de Miller (h,k,l). La distance inter-réticulaire, associée à une famille de plan, est corrélée à l'angle de diffraction (θ) suivant la relation de Bragg donnée par l'équation suivante.

$$2d_{hkl} \cdot \sin \theta = n\lambda$$

Avec : λ = la longueur d'onde du rayonnement diffracté (nm),

n = l'ordre de diffraction,

d = la distance inter-réticulaire du plan cristallographique correspondant (nm),

θ = l'angle d'incidence du faisceau de rayons X (angle de Bragg).

Équipement et préparation des échantillons

Les enregistrements de diffraction de rayons X sur poudre ont été effectués sur :

- *Un diffractomètre STOE, modèle STADI-P*. Ce diffractomètre permet de travailler en transmission suivant la méthode Debye-Scherrer. Le dispositif se compose d'une source monochromatique de rayonnement obtenu grâce à la présence d'un monochromateur avant (cristal de germanium) permettant la sélection de la seule longueur d'onde $K\alpha_1$ du cuivre ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), d'une fente, d'un collimateur, d'un porte-échantillon et d'un détecteur proportionnel de type linear PSD (*Position Sensitive Detector*). L'échantillon (quelques milligrammes) est introduit entre deux feuilles d'acétate de cellulose dans un support de transmission. Le support est ensuite placé de manière reproductible au centre d'un cercle virtuel sur lequel se déplace le détecteur. Les mesures sont enregistrées pour un domaine angulaire de 3 à 70° en 2θ , avec un pas de mesure de $0,04^\circ$ en 2θ .

- *Un diffractomètre X PANalytical, modèle X'Pert PRO MPD* avec passeur d'échantillons à température ambiante. Ce diffractomètre permet de travailler en réflexion selon le montage de Bragg-Brentano. La géométrie Bragg-Brentano (θ - 2θ) utilise un faisceau divergent et impose une symétrie entre la source de rayons X et le détecteur par rapport à la surface de l'échantillon. Les rayons X, émis à l'aide d'un tube équipé d'une anticathode en cuivre (45 kV, 40 mA), permettent de travailler avec la raie $K\alpha$ moyenne ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, rapport $K\alpha_2/\alpha_1 = 0,5$). La poudre était soit placée sur une plaque de verre, soit compactée en pastille placée dans un porte-échantillon prévu à cet effet. Les mesures ont été enregistrées, comme pour les mesures de DRX en réflexion, pour un domaine angulaire de 2 à 70° en 2θ , avec un pas de mesure de $0,02^\circ$ en 2θ .

- *Un thermodiffractomètre PANalytical, modèle X'Pert PRO MPD* (support d'échantillon en alumine) pour réaliser par réflexion une analyse *in situ* par variation de température. Les mesures ont été enregistrées pour un domaine angulaire de 10 à 50° en 2θ , avec un pas de mesure de $0,02^\circ$ en 2θ .

Le logiciel X'Pert HighScore a ensuite été utilisé pour interpréter les différents diffractogrammes et réaliser l'identification des différentes phases cristallines par comparaison des diffractogrammes obtenus avec ceux de la base de données PDF-4+ de l'ICDD (*International Centre of Diffraction Data*).

II.3.2. Analyses élémentaires

Ces analyses portent sur les éléments zinc (Zn), phosphore (P), argent (Ag) et calcium (Ca), et ont été réalisées sur la plateforme Analytique Inorganique du département des Sciences Analytiques (DSA) – Equipe Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM) (CNRS UMR 7178) de l'Université de Strasbourg. Les analyses ont été faites par ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*) après minéralisation des poudres par attaque acide.

II.3.3. Analyses thermiques

Principe de la technique

L'analyse thermique différentielle (ATD) consiste à enregistrer la différence de température (ΔT) entre l'échantillon à étudier et une référence (creuset vide), tous deux placés dans la même enceinte et soumis à la même montée ou descente en température. Cette technique permet de mettre en évidence des transformations physiques et chimiques en fonction de la température. En effet, la décomposition ou l'oxydation de molécules organiques potentiellement présentes dans le produit donnent lieu à une variation enthalpique. Ces variations d'enthalpie, qui dépendent de la nature de l'atmosphère (inerte ou oxydante) et de la molécule éliminée, se traduisent par des effets thermiques observables sur le thermogramme obtenu en modifiant la température de l'échantillon par rapport à celle de la référence (ΔT). Si on impose comme convention : ΔT positif pour une réaction exothermique et ΔT négatif pour une réaction endothermique, l'élimination d'eau physisorbée se traduit toujours par un endotherme ($\Delta T < 0$), mais la décomposition oxydante de la matière organique se traduit par un exotherme ($\Delta T > 0$) sous atmosphère d'air ou d'oxygène (combustion). En l'absence de phénomène, ΔT est nulle.

L'analyse thermogravimétrique (ATG) consiste, quant à elle, à suivre les variations de masse d'un échantillon au cours d'une montée en température. Cette technique permet de

quantifier, par exemple, les teneurs en eau et en matière organique éventuellement contenues dans l'échantillon et renseigne donc sur la composition du matériau analysé.

Équipement et préparation des échantillons

Les enregistrements ont été effectués simultanément (ATG/ATD) sur un thermoanalyseur Setaram Labsys. La masse d'échantillon est de l'ordre de 10 mg. Ce dernier est introduit dans un creuset en alumine placé dans une enceinte chauffante. Un creuset de référence également en alumine, permet de suivre les variations thermiques. Les analyses ont été effectuées sous un flux continu d'air reconstitué (mélange O₂/N₂ : 25/75) avec une montée en température fixée à 5 °C. min⁻¹ sur une gamme de températures allant de 30 °C à 900 °C.

II.3.4. Microscopies

a. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Principe de la technique

Cette technique permet d'obtenir des informations directes sur la morphologie (forme, taille) des cristaux/agglomérats et leur rugosité de surface éventuelle. Plus précisément, elle consiste à balayer, ligne par ligne, la surface des particules par un faisceau incident d'électrons de haute énergie, entraînant ainsi l'émission d'électrons secondaires de plus faibles énergies. Ces derniers sont envoyés vers un détecteur qui transmet le signal à un écran dont le balayage est synchronisé avec celui de l'échantillon. Le contraste de l'image traduit le relief de ce dernier. Ces électrons secondaires permettent ainsi la reconstruction d'une image agrandie de la surface. Toutefois, le flux très important d'électrons incidents nécessite que la surface de l'échantillon soit conductrice afin d'éliminer une grande partie de ces électrons par l'intermédiaire du porte-échantillon. Lorsque les échantillons à analyser ne sont pas conducteurs, ce qui est le cas des matériaux utilisés au cours de cette thèse, la surface des cristaux est rendue conductrice grâce au dépôt d'une fine couche d'or par un procédé de métallisation.

Équipement et préparation des échantillons

Une étude de la morphologie des cristaux, de leur état de surface, de la macroporosité a été réalisée sur un microscope XL30 FEG de Philips.

La préparation des échantillons consiste à déposer une très petite quantité de poudre sur un support recouvert d'une pastille de graphite à double face adhésive puis de métalliser l'échantillon sous vide par pulvérisation cathodique d'une fine couche d'or (10 à 20 nm) avec un équipement BAL-TEC SCD 004. Le vide de la chambre d'analyse du microscope est inférieur à 3×10^{-6} mbar et la tension d'accélération des électrons est de 7 kV.

b. Microscopie électronique en transmission (MET)

Principe de la technique

La microscopie électronique en transmission permet d'observer la morphologie (taille et forme) des particules déposées sur une grille. Contrairement à la microscopie électronique à balayage, seuls les électrons traversant l'échantillon sont analysés. La distinction entre les électrons transmis et les électrons diffusés permet de créer le contraste des images. En effet, lorsque les électrons sont directement transmis ou faiblement déviés (atomes légers), l'image apparaît claire. Tandis que les électrons fortement déviés par des atomes lourds tels que le silicium sont éliminés et provoquent une image sombre.

Cette technique est utilisée au cours de la thèse pour déterminer de façon précise la taille des nanoparticules d'argent, ainsi que pour réaliser des cartographies des éléments Zn, P, Ag.

Équipement et préparation des échantillons

Le microscope en transmission utilisé est un microscope JEOL, ARM200 sous une tension d'accélération des électrons de 200 kV et une résolution de 80 pm. Il est également équipé d'un analyseur EDX (*Energy Dispersive X-ray fluorescence Analysis*) Centurio JED 2300 1sr marque JEOL. L'enregistrement des cartographies a été réalisé avec un détecteur multicanaux SDD (*Silicon Drift Detector*) possédant un angle solide de 1 stéradian pour un temps d'acquisition de 0,013 à 7600 millisecondes de balayage par point dans une échelle spectral de 0 à 20 keV.

II.3.5. Résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide

Principe de la technique

La RMN du solide est une technique très utile en complément de la diffraction de rayons X. En effet, alors que les rayons X permettent de caractériser l'agencement des atomes à longue distance, la RMN, quant à elle, est sensible à l'ordre local. Ainsi, la mesure du

déplacement chimique permet de caractériser l'environnement immédiat d'un noyau donné. De plus, dans le cas de spectres bien résolus, des informations d'ordre cristallographique peuvent être obtenues. En effet, dans un cristal parfaitement ordonné, chaque site cristallographique non équivalent donne lieu, en théorie, à une résonance distincte.

Dans le cas de l'étude des solides par RMN, l'anisotropie de déplacement chimique, l'existence d'interactions dipolaires ou quadripolaires ($spin > 1/2$) conduisent à l'élargissement des signaux par rapport à ceux observés pour un liquide. Différentes méthodes spécifiques ont été développées afin de masquer les effets de ces interactions. La technique utilisée dans ce travail est brièvement présentée ci-dessous.

Technique de rotation à l'angle magique (MAS) : Cette technique consiste à faire tourner l'échantillon sur lui-même suivant un axe faisant un angle de $54^{\circ}44'$ (« angle magique ») avec la direction du champ magnétique B_0 afin de minimiser l'anisotropie de déplacement chimique et les effets des couplages dipolaires.

Équipement et préparation des échantillons

Les différentes expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance II 300 en utilisant une sonde cylindrique de zircone 2,5 mm de deux canaux Bruker MAS. Les principales caractéristiques du noyau étudié ^{31}P ainsi que les conditions d'enregistrement utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le Tableau II-3.

Tableau II-3. Caractéristiques du noyau ^{31}P étudié et conditions d'enregistrement des spectres RMN par la technique MAS.

| Noyau | ^{31}P |
|--|-----------------------------|
| Spin | 1/2 |
| Référence | H_3PO_4 85% |
| Champ magnétique (T) | 7,1 |
| Fréquence (MHz) | 121,47 |
| Angle d'impulsion | $\Pi/4$ |
| Durée de l'impulsion (μs) | 2,87 |
| Temps de recyclage (s) | 40 |
| Vitesse de rotation (kHz) | 25 |
| Nombre d'accumulations | 1368 |

II.3.6. Manométrie d'adsorption/désorption du diazote (N₂)

Principe de la technique

La manométrie d'adsorption/désorption du diazote est une technique qui permet de caractériser la micro/mésoporosité des matériaux. En effet, elle permet d'accéder aux propriétés texturales des matériaux, et en particulier, à leur surface spécifique, leur volume poreux et à leur distribution en tailles des pores.

Cette technique analytique consiste à mesurer la quantité de diazote adsorbée par le matériau à la température du diazote liquide (77 K) et ce dans un domaine de pression relative p/p_0 compris entre 0 et 1, avec p la pression d'équilibre du gaz et p_0 la pression de vapeur saturante de diazote. Pour cela, du diazote gazeux est introduit dans la cellule sous une pression initiale P_i connue, à une température fixe de 77 K. Cette pression diminue progressivement du fait de l'adsorption d'une certaine quantité de diazote dans la porosité du solide puis atteint une pression d'équilibre P . La mesure de la différence de pression $P_i - P$ permet de déterminer la quantité de diazote adsorbée par l'échantillon (rapportée aux conditions normales de température et de pression (STP)) à la pression d'équilibre. Une isotherme d'adsorption/désorption du diazote, représentant le volume de gaz adsorbé par gramme d'échantillon ramené aux conditions standards de température et de pression ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ou $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ STP) en fonction de la pression relative de diazote (p/p_0), est enregistrée.

L'allure des isothermes d'adsorption et de désorption ainsi que la forme des hystérèses sont caractéristiques de la porosité de l'adsorbant lorsque les interactions adsorbat/adsorbant sont dues à des phénomènes physiques. Selon l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), les isothermes sont réparties selon six types principaux.¹

Équipement et préparation des échantillons

Les isothermes d'adsorption/désorption du diazote à 77 K ont été réalisées grâce à un appareil ASAP 2020 Micromeritics, pouvant travailler dans une large gamme de pressions relatives p/p_0 (10^{-7} à 1). L'échantillon étudié (environ 50 mg) est pesé avec précision dans un tube en verre. Le tube est garni d'un insert (tube en verre scellé aux deux extrémités) destiné à diminuer le volume mort. L'activation de l'échantillon (pour libérer la surface du solide) est réalisée par chauffage pendant 1 heure à 90 °C, puis 15 heures à 150 °C sous vide ($\sim 10^{-6}$ bar).

¹ M. Thommes, K. Kaneto, A.V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K. S. W. Sing, *Pure Appl.Chem.* 87, 9-10, 2015, 1051–1069.

Le tube est de nouveau pesé pour déterminer précisément la quantité de produit dégazé. Il est immergé dans un vase Dewar contenant du diazote liquide. Les données ($p/p_0 = f(V_{\text{adsorbé}})$) des isothermes d'adsorption/désorption du diazote enregistrées ont été traitées avec le logiciel MicroActive.

II.3.7. Porosimétrie au mercure

Principe de la technique

La porosimétrie au mercure est une technique qui permet de caractériser la porosité d'un matériau par application de différents niveaux de pression à un échantillon immergé dans du mercure. Elle est capable de mesurer des pores dont le diamètre est compris entre 3 nm à 400 μm . Cette méthode est aussi appelée « injection de mercure » car le mercure liquide est injecté dans le réseau poreux de l'échantillon sous pression croissante. L'utilisation du mercure, un fluide non-mouillant (c'est à dire qu'il ne pénètre pas spontanément dans la porosité) permet de contrôler l'injection au moyen de la pression. À mesure que la pression augmente, le mercure occupe des régions de plus en plus confinées de la porosité, remplissant des pores plus petits.

Dans les conditions normales de température et de pression le mercure possède une grande tension de surface $\sigma = 480 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ à 25 °C avec un angle de contact $\theta \approx 135^\circ$ entre le liquide et la surface du solide. L'injection du mercure dans un capillaire « le pore » de rayon r_{cap} requiert donc une forte pression ΔP_{cap} , donnée par la loi de Laplace qui énonce que la pression nécessaire pour porter le mercure dans les pores de l'échantillon, est inversement proportionnelle à la taille des pores. Elle est définie avec l'équation suivante :

$$\Delta P_{\text{cap}} = \frac{2\sigma \cdot \cos \theta}{r_{\text{cap}}}$$

Cette technique permet de calculer de nombreuses propriétés d'un échantillon de structure poreuse telles que la répartition des tailles de pores, le volume total des pores, leur surface totale, leur diamètre moyen, etc. Toutefois, elle possède des inconvénients tels que la toxicité du mercure, ce qui complique le protocole expérimental, compte tenu aussi des déchets qu'il faut traiter.

Équipement et préparation des échantillons

Les analyses ont été effectuées sur un porosimètre au mercure Micromeritics, Autopore IV dans une gamme de pression variant de 0,004 à 220 MPa. Préalablement à l'analyse, l'échantillon étant introduit dans une cellule en verre appelée pénétrromètre (Figure II-4) est dégazé sous vide afin d'éliminer humidité et gaz de la structure poreuse. Ensuite, durant la montée progressive en pression, le mercure sature la porosité de l'échantillon, faisant varier le volume de mercure resté dans la canule. Cette dernière étant recouverte d'un film métallique, il est alors possible de mesurer la capacité électrique du condensateur formé par le film métallique et le mercure dans la canule. À chaque augmentation de la pression, la variation de capacité électrique est mesurée et le volume de mercure injecté dans l'échantillon est calculé. À la fin de l'analyse une courbe d'intrusion est obtenue, elle correspond au volume de mercure qui est entré dans la porosité du matériau à une pression donnée.

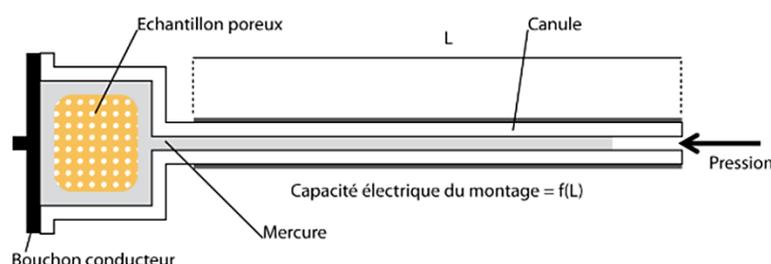


Figure II-4. Schéma du pénétrromètre utilisé pour les mesures de porosimétrie au mercure.

II.3.8. Spectroscopie de fluorescence

Principe de la technique

Des analyses de spectroscopie de fluorescence des solides ont été effectuées en raison de l'utilisation de biomolécules dans nos synthèses et de leur possible présence dans les produits finaux. La fluorescence désigne l'émission de photon par une molécule qui a été irradiée par une onde lumineuse, sans modification de spin des états énergétiques impliqués. Dans un premier temps le processus d'absorption de lumière permet l'excitation de l'électron de son état de plus basse énergie (état fondamental S_0) pendant un temps très court ca. 10^{-15} s. L'électron à l'état excité S_1 peut ensuite retourner à l'état fondamental en libérant de l'énergie sous forme d'une onde lumineuse (Figure II-5). C'est processus est appelé fluorescence, elle est plus lente que l'absorption, et varie typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques centaines de nanosecondes (ca. 10^{-10} à 10^{-7} s). Les différentes fréquences de lumière

fluorescence émise par l'échantillon sont mesurées avec une lumière excitée gardée (λ_{exc}) à longueur d'onde constante. Cela est appelé « spectre d'émission ». Un spectre d'émission est mesuré par l'enregistrement de la somme de la lumière de fluorescence émise à toutes les fréquences comme fonction de la fréquence d'une lumière incidente monochromatique.

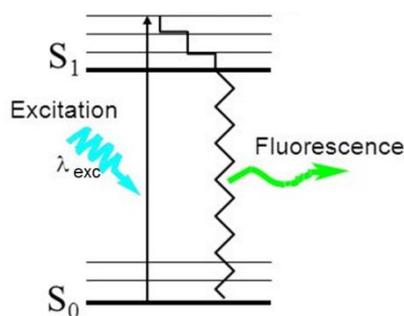


Figure II-5. Schéma du principe de fluorescence.

Équipement et préparation des échantillons

Les analyses de fluorescence des échantillons à l'état solide (poudres) ont été réalisées avec un spectrofluorimètre Horiba, Fluoromax-4, Jobin Yvon équipé d'une lampe à arc au xénon exempt d'ozone de 150 W comme source d'excitation fixée à longueur d'onde $\lambda_{exc} = 430$ nm par le monochromateur Czerny-TurnerTM. Les spectres d'émission ont été enregistrés à température ambiante et dans l'intervalle de longueurs d'onde de 430 à 600 nm à l'aide d'un détecteur qui consiste en un photomultiplicateur R928P (couverture spectrale : 200 à 870 nm). Le processus d'acquisition de données de fluorescence et leur analyse ont été réalisés avec le logiciel FluorEssenceTM de Horiba scientific.

II.3.9. Microscopie à fluorescence « classique »

Principe de la technique

La microscopie en fluorescence à la différence de la spectroscopie de fluorescence permet la formation d'une image par détection de la lumière émise d'un échantillon fluorescent. En sciences biologiques le microscope à fluorescence « classique » le plus courant permet une épi-illumination (illumination de la lumière réfléchie) de l'échantillon. La source lumineuse est une lampe à mercure qui produit un rayonnement intense et qui traverse un filtre d'excitation (de type passe-bande) ne transmettant que la longueur d'onde désirée. La fluorescence émise est collectée par un objectif constitué de plusieurs lentilles pour former

une image réelle grandie, débarrassée des rayons excitateurs réfléchis par le filtre d'arrêt du tube (de type passe-haut), au niveau du plan d'image (Figure II-6).

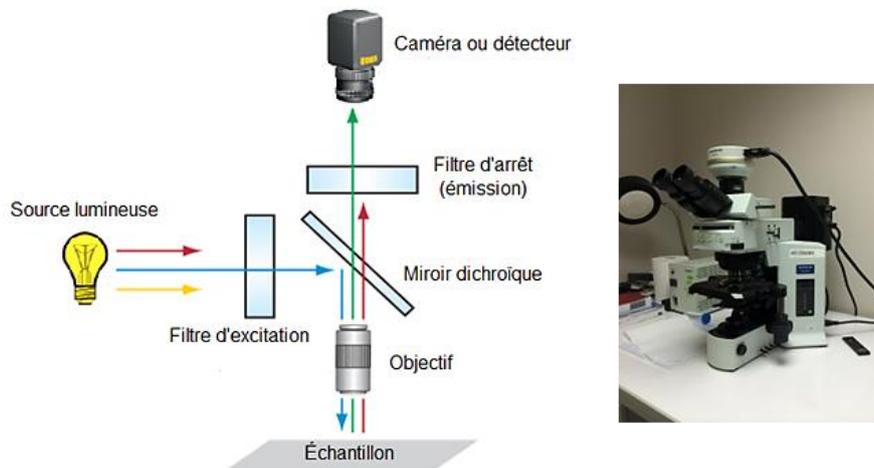


Figure II-6. Principe du microscope à fluorescence « classique » (à gauche) et le microscope Olympus BX51 utilisé (à droite).

Équipement et préparation des échantillons

Cette technique a été utilisée en microbiologie pour l'observation du biofilm d'*E. coli* SCC1 fluorescents sur les solides avec un microscope à fluorescence Olympus BX51 (Figure II-6) équipé d'une caméra couleur Olympus DP70. Des images ont été acquises avec un objectif Olympus 50X/0,45 à air de 15 mm de distance focale pour différentes durées d'exposition. L'irradiation de l'échantillon a été réalisée avec une lampe de mercure et un filtre d'excitation à longueurs d'onde entre 395 et 489 nm avec émission au vert dans l'intervalle de 500 et 580 nm correspondant à la protéine fluorescente verte (GFP en anglais) contenue dans la bactérie *E. coli* SCC1.

II.3.10. Microscopie confocale à balayage laser

Principe de la technique

En microscopie à fluorescence classique, il existe une perte de résolution due à l'émission de fluorescence délocalisée qui se superpose à l'image du plan focal, ce que se traduit par une image contaminée par un bruit de fond. La microscopie confocale à balayage laser (CLSM pour *confocal laser scanning microscopy* en anglais) a permis de pallier cet inconvénient puisque son principe repose sur la confocalisation sur l'échantillon d'un faisceau laser d'excitation et du champ de l'objet perçu par le détecteur constitué d'un photomultiplicateur

(Figure II-7). L'échantillon est éclairé point par point et de façon successive grâce au mécanisme de balayage. Chaque point joue le rôle de foyer excité et renvoie une lumière, réfléchiée ou de fluorescence, selon le mode d'observation choisie. C'est grâce à un diaphragme variable (pinhole) qu'il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation et d'éliminer ainsi le signal provenant des autres plans. Ces rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde, puis détectés par des photomultiplicateurs. Le signal reçu est enfin converti en signal numérique conduisant à la création d'une image. En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur (direction z) dans l'échantillon, il est aussi possible de réaliser des séries d'images « sections optiques » à partir desquelles on peut reconstruire une représentation tridimensionnelle de l'objet. Le CLSM comprend donc des lasers (source lumineuse d'excitation), des éléments optiques, des dispositifs de balayage rapide et des ordinateurs qui traitent numériquement les images.

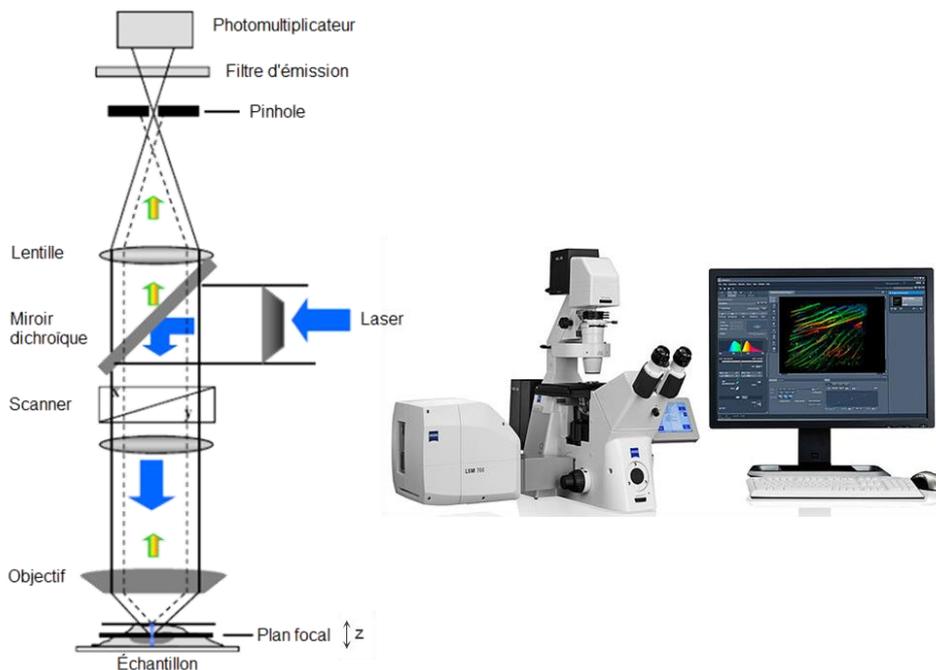


Figure II-7. Schéma de principe du microscope confocal à balayage laser (à gauche) et le microscope confocal Carl Zeiss LSM 700 utilisé (à droite).

Équipement et préparation des échantillons

La fluorescence de la GFP provenant des bactéries *E. coli* SCC1 adhérentes aux solides a été analysée sur un microscope confocal à balayage laser Carl Zeiss LSM 700 (Figure II-7)

équipé d'un objectif 63X à immersion dans l'eau de 2,4 mm de distance de travail. Des images de fluorescence et de réflexion ont été prises en même temps sur 6 emplacements différents pour chaque échantillon à température ambiante. Deux lasers aux longueurs d'onde 488 nm (fluorescence) et 405 nm (réflexion) respectivement ont été utilisés comme sources lumineuses d'excitation et un filtre d'émission passe-bande 490–555 nm pour la capture de données de fluorescence. À chaque emplacement, des piles d'images 2D x,y (intervalle de 1 µm dans la direction z) ont été acquises. Le traitement des images acquises a été réalisé avec le logiciel et les plug-ins ImageJ[®] 1.50b.

II.3.11. Electrophorèse sur gel

Principe de la technique

L'électrophorèse est une technique qui sépare des molécules en fonction de leur charge ou de leur masse molaire en les faisant migrer au travers d'un gel (un polymère) sous l'effet d'un champ électrique vers le pôle complémentaire (la cathode (-) ou l'anode (+)) selon leur charge. Elle est la technique la plus résolutive pour la séparation des protéines permettant leur détection par coloration. Les principaux gels utilisés sont le gel d'agarose et le gel de polyacrylamide (PAGE). Dans ces travaux de thèse nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SD-PAGE en anglais). La particularité de la SDS-PAGE est de soumettre les échantillons protéiques à un prétraitement dénaturant. Les protéines sont soumises à l'action de deux composés :

- Le mercaptoéthanol : un composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous-unités des protéines sont donc dissociées.
- Le SDS (sodium dodécyl sulfate) : c'est un composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative. Influencées ainsi par le SDS, elles migreront donc toutes vers l'anode (+) : la charge réelle des protéines n'est donc plus mise en jeu et donc seule leur masse molaire influencera leur migration.

Grâce à la SDS-PAGE, il est possible principalement : i) de déterminer la présence d'une protéine donnée dans un échantillon protéique. Une protéine sera caractérisée par une masse molaire donnée; ii) de comparer le contenu protéique de différents échantillons et iii) d'établir la pureté d'une protéine. C'est ainsi que cette technique a été utilisée pour l'analyse protéinique de la caséine et des solides qui contiennent de la caséine.

Équipement et préparation des échantillons

Les expériences ont été réalisées avec un système d'électrophorèse sur gel V3 Western Workflow™ de chez Bio-Rad. Le mode opératoire suivi est résumé ci-dessous :

Préparation des solutions : 50 μL des milieux d'extractions préparés avec la caséine commerciale (réactif) et les solides qui contiennent de la caséine ont été mélangés avec 50 μL de tampon 2x Laemmli (pH = 6,8) contenant 4% SDS, 10% 2-mercaptoéthanol, 20% glycérine, 0,004% bleu de bromophénol et 0,125 M Tris-HCl. Les solutions protéiques résultantes ont été ensuite chauffées à 95 °C pendant 5 min.

Séparation protéique par électrophorèse : Les solutions protéiques migrent dans un système d'électrophorèse Bio-Rad constitué de gels de polyacrylamide Bio-Rad (TGX Stain-Free™). Des aliquotes de 10 μL des solutions protéiques sont déposés dans chaque puits au-dessus du gel (Figure II-8). Les protéines sont ensuite séparées suivant leur taille dans le gel de séparation tamponné avec un « tampon de migration » à pH = 8,3 (Tris/Glycine/SDS : 25 mM Tris, 190 mM glycine et 0,1% SDS). La migration des protéines est réalisée à 200 V pendant 25 min vers la direction de l'anode (+).

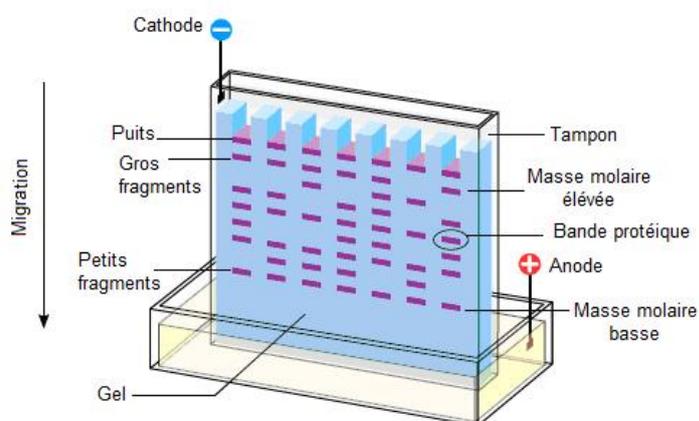


Figure II-8. Principe de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Détection des bandes protéiques : Les bandes protéiques ont été révélées par imagerie avec le système ChemiDoc™ qui est basé sur la technologie de détection CCD (pour *Charge Coupled Device* en anglais) qui assure la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique et permet de visualiser les protéines par chimiluminescence et fluorescence UV-visible. Ce système permet de photographier les gels utilisés sans marquage puisqu'ils contiennent des composés trihalogénés que forment des liaisons covalentes avec les unités

tryptophane des protéines permettant leur détection par fluorescence. Le système est contrôlé par le logiciel Image Lab™ afin d'optimiser les performances pour une capture d'image rapide, intégrée et automatisée et l'analyse de divers échantillons.

II.3.12. Lecteur de microplaques UV-visible

Principe de la technique

Le lecteur de microplaques est un instrument de travail pour des essais d'absorbance habituels en biologie. Comme tout spectrophotomètre UV-visible, il est basé sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert qui énonce que l'absorption d'un faisceau de lumière monochromatique dans une solution homogène est proportionnelle à la longueur du trajet optique suivi par cette radiation et la concentration en des espèces absorbantes selon l'équation suivante :

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot \ell \cdot C$$

Avec : A = l'absorbance ou densité optique à une longueur d'onde λ (sans unité),

I/I_0 = est la transmittance de la solution (sans unité),

ε = l'absorptivité molaire exprimée en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. Elle dépend de la longueur d'onde, la nature chimique de l'entité et la température,

ℓ = la longueur du trajet optique dans la solution traversée (en cm),

C = la concentration molaire de la solution (en $mol \cdot L^{-1}$).

Pour la mesure de l'absorbance, le lecteur de microplaques envoie le faisceau lumineux verticalement à travers l'échantillon, soit de haut en bas soit de bas en haut. C'est pourquoi la qualité de la microplaque utilisée est importante lors des mesures. Une microplaque de haute qualité, optiquement claire influe sur la reproductibilité des mesures. En outre, l'utilisation d'une longueur d'onde de référence (à laquelle l'échantillon d'intérêt n'absorbe pas) permet de contrôler les interférences optiques provenant de la microplaque (rayures, taches,...) qui peuvent obstruer le faisceau lumineux.

Équipement et préparation des échantillons

La quantification relative des cellules viables lors des tests de cytotoxicité des solides a été estimée à partir de la mesure de l'absorbance à 570 nm avec un lecteur de microplaques UV-visible EZ Read 400 de Biochrom (Figure II-9) équipé avec une lampe halogène de tungstène (source lumineuse). Il a été utilisé 620 nm comme longueur d'onde de référence. Cet appareil permet de lire dans un temps très court (ca. 25 sec) une microplaque de 96 puits contenant différents aliquotes des solutions. Le lecteur est contrôlé à l'aide du logiciel ADAP logiciel de Biochrom permettant de simplifier l'acquisition et l'analyse des données.

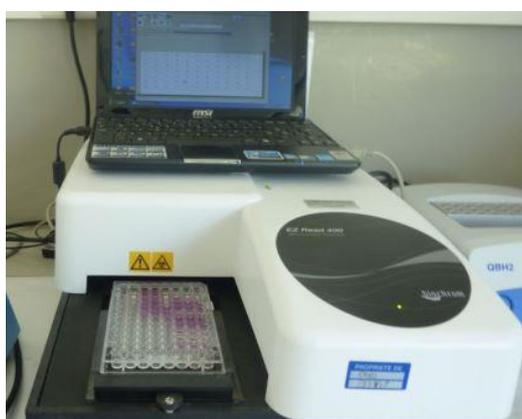


Figure II-9. Lecteur de microplaques UV-visible EZ Read 400.

CHAPITRE III

Synthèse de métallophosphates poreux biosourcés à partir de caséine

III.1. Introduction

Parmi les molécules phosphorées d'origine biologique répertoriées dans le chapitre I, la caséine est celle que nous avons choisie d'utiliser prioritairement en raison de sa capacité à former des micelles et sa facilité d'approvisionnement en vue d'une utilisation à l'échelle industrielle.

Dans un premier temps, nous préciserons dans ce chapitre les procédés de récupération de la caséine, chiffrerons sa production et ses utilisations à l'échelle industrielle. Nous détaillerons ensuite les études que nous avons réalisées avec cette phosphoprotéine à savoir l'étude de sa solubilité et les essais de synthèse réalisés dans les systèmes Zn/P(caséine)/eau/NaOH et Al/P(caséine)/eau/NaOH.

Les travaux concernant la synthèse de zincophosphates poreux ont fait l'objet d'un article publié qui a été inséré dans ce chapitre.

III.2. La caséine à l'échelle industrielle

III.2.1. Procédés de récupération du lait de vache

Les procédés de récupération des caséines du lait sont très spécifiques. Les principales étapes sont les suivantes (Figure III-1) :

- Coagulation du lait (écrémé), obtention d'un caillé.
- Séparation solide (caillé)/liquide (sérum) par centrifugation.
- Purification des grains de caillé (le « lavage »).
- Séchage sur séchoir vibro-fluidisé.
- Éventuellement broyage des grains.

Il existe deux types de caséine :

- La caséine « acide », obtenue par coagulation avec de l'acide chlorhydrique ou de l'acide lactique.
- La caséine « présure », obtenue par coagulation avec de la présure (comme pour les fromages).

Les unités de production modernes, les caséineries, ont un procédé le plus souvent continu. Pour la caséine « présure », des cuves de maturation sont nécessaires : c'est une production semi-continue par permutation successives des cuves.

Les caséines obtenues par acidification du lait sont insolubles à pH neutre. Afin de pouvoir les utiliser en tant qu'ingrédient alimentaire, il est nécessaire de procéder à une « neutralisation » chimique à l'aide d'une base. Suivant la nature de celle-ci, différents types de caséinates aux propriétés légèrement différentes sont obtenues :

- Caséinate de sodium (ajout de soude).
- Caséinate de calcium (ajout d'hydroxyde de calcium).
- Caséinate de potassium (ajout de carbonate de potassium).

L'opération de neutralisation peut se faire de trois manières :

- À partir de caillé, en ajoutant une base en cuve. Ce procédé à basse concentration, nécessite ensuite une opération de séchage en tour d'atomisation. On obtient alors un caséinate spray.
- À partir de caséine déjà séchée, à dissoudre dans une solution basique. Ce procédé, à basse concentration également, se poursuit comme précédemment.
- À partir de caséine séchée, par un procédé haute concentration utilisant la technologie « extrusion » développée par PILLET (société intégrée à TECNAL depuis 1996) pour réaliser la réaction. La réaction de neutralisation est alors réalisée avec un minimum d'eau.

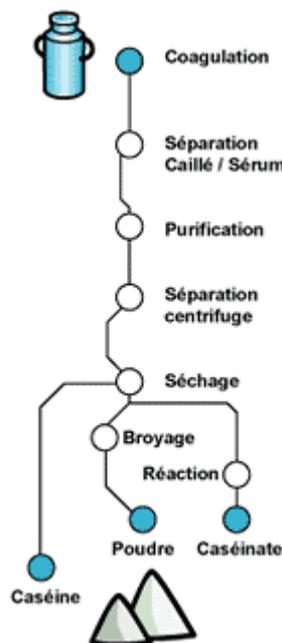


Figure III-1. Principales étapes du procédé permettant la récupération de la caséine [1].

Le type d'agent coagulant utilisé conditionne le domaine d'application. Les caséines obtenues par précipitation par un acide minéral sont utilisées généralement dans l'industrie non-alimentaire, tandis que celles obtenues après utilisation de présure ou acide lactique sont utilisées pour l'alimentation humaine et animale. Dans notre étude nous avons utilisé une caséine obtenue par précipitation avec l'acide lactique.

III.2.2. Disponibilités en Europe

La production européenne de caséines et caséinates était de 125 000 tonnes en 2010 [2]. Les fabrications ont fortement diminué entre 2004 et 2009 (Tableau III-1). Une partie importante de la production européenne est exportée. Les importations sont également importantes : cela inclut un volume significatif de caséines destinées à des utilisations non alimentaires.

Tableau III-1. Quantités de caséines et caséinates disponibles dans l'Union Européenne (UE 25 puis UE 27) entre 2004 et 2010 (t : tonnes) [2].

| en 1000 t | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | UE 25 | UE 25 | UE 25 | UE 27 | UE 27 | UE 27 | UE 27 |
| Production | 175 | 175 | 141 | 130 | 135 | 110 | 125 |
| Importations | 51 | 41 | 45 | 43 | 35 | 36 | 30 |
| Exportations | 92 | 92 | 76 | 63 | 66 | 66 | 75 |
| Variation de stocks | 0 | 10 | -5 | 5 | 15 | -10 | -5 |
| Disponible | 134 | 114 | 115 | 110 | 98 | 71 | 85 |

Source : AMI¹

Les principaux producteurs européens sont la France et l'Irlande (de l'ordre de 30 000 tonnes de production par an; Tableau III-2). Ces pays sont également des exportateurs importants. L'Allemagne est un producteur de moindre importance (13 000 tonnes) mais importe 16 000 tonnes de caséine par an.

Tableau III-2. Estimation des caséines et caséinates disponibles en 2010 dans 5 pays européens et dans l'UE 27 (en tonnes) [2].

| Caséines | FR | DE | IT | UK | ES | UE 27 |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Production | 33 | 13 | nd | nd | nd | 125 |
| + Achats | 3 | 16 | 10 | 5 | 8 | 30 |
| - Expéditions | 20 | 5 | 1 | 0 | 0 | 75 |
| = Disponible | 17 | 24 | nd | nd | nd | 80 |

Source : AMI, COMEXT²

¹AMI : Agricultural Market Information Company est un organisme qui retravaille les statistiques publiques européennes et mondiales sur le marché agricole.

²COMEXT : base de données statistiques sur les échanges intra- et extra-communitaires dans l'UE.

La caséine produite en France jouit d'une excellente réputation de qualité. La production française a représenté environ 26 % de la production européenne de caséine (UE-27) en 2010. Certaines données diffusées par l'office agricole français FranceAgriMer montrent que la production de caséines et caséinates en France a augmenté de l'année 2010 (33 900 tonnes) à 2015 (44 000 tonnes). Par contre une diminution de 3,4 % entre 2014 et 2015 a été indiquée [3].

L'évolution du prix de la caséine, reporté Figure III-2 montre que la hausse des prix observée pour les années 2005, 2006 à 2008 et 2010 correspond à une baisse des caséines disponibles et que la baisse des prix en 2009 correspond à une stabilisation, voire une faible hausse de la disponibilité en caséine (Figure III-2) [2].

Selon l'INSEE, le prix du marché pour la caséine est actuellement (08/2016) comparable à celui de 2010 (voire légèrement inférieur) [4].

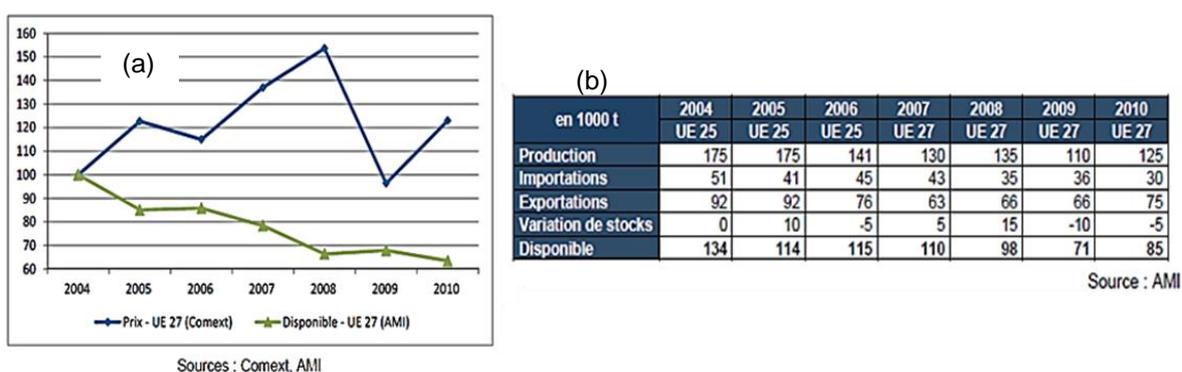


Figure III-2. (a) Évolutions des prix des caséines et de la quantité disponible en Europe en indice (base 100 : 2004), (b) Caséines et caséinates disponibles en UE 25 puis UE 27 entre 2004 et 2010 [2].

III.2.3. Principales utilisations

Environ 92 % des utilisations de caséines et caséinates ont été identifiées. Ces valeurs sont représentées graphiquement par secteur dans la Figure III-3. Les caséines et caséinates sont notamment utilisées dans l'industrie alimentaire (72 %) et interviennent principalement dans la production de fromages fondus, de produits laitiers frais, de produits de charcuterie, de blanchisseurs de café et de produits diététiques grâce à leurs propriétés texturantes (fromages fondus, PLF « Produits Laitiers Fondus »), émulsifiantes (charcuterie) ou pour leur apport en protéines comme supplément alimentaire (diététique). Notons également une incorporation

importante dans des préparations alimentaires diverses à destination de différents secteurs alimentaires, notamment les plats cuisinés [2].

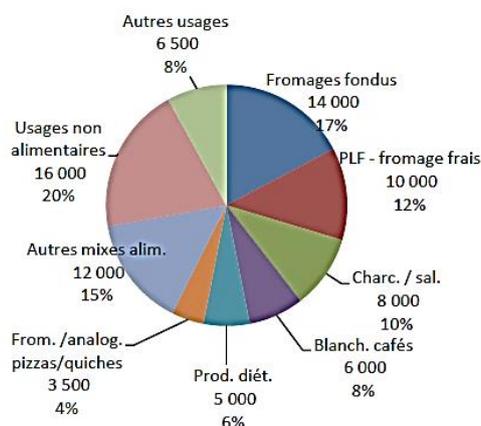


Figure III-3. Les utilisations identifiées des caséines et caséinates dans l'UE 27 [2].

Par ailleurs, l'utilisation de la caséine dans le secteur non-alimentaire est moins importante (28 %). Depuis le milieu du 19^{ème} siècle, elle a été employée dans l'industrie des adhésifs et des peintures à base d'eau. Ces applications se sont multipliées au cours du 20^{ème} siècle, le plus souvent pour l'industrie des matières plastiques [5], de la peinture [6], des colles [7], et des textiles [8].

D'autres applications importantes de la caséine d'intérêt à mentionner dans le cadre de cette thèse, se trouvent dans le domaine médical et spécifiquement dans l'industrie pharmaceutique. La biodégradabilité, la bonne biocompatibilité, la non-toxicité et la stabilité en milieu aqueux que la caséine présente ont permis son utilisation en tant que supports pour l'encapsulation et la libération contrôlée des molécules actives des médicaments en remplacement des protéines employées communément (la gélatine et les albumines par exemple), ainsi que des polysaccharides ou d'autres polymères [9-12]. Quelques exemples de son application sont : la synthèse de microsphères à base de caséine pour l'administration orale de molécules actives chimio-thérapeutiques. Ces microsphères de caséine contenant la substance active sont censées être digérées dans l'estomac au long du tractus gastro-intestinal pour le traitement du cancer de l'estomac par exemple [13, 14].

La caséine est aussi utilisée dans la synthèse de biomatériaux hydrogels. Les hydrogels ne se dissolvent pas et gonflent dans certains milieux comme l'eau [15]. Les hydrogels à base de caséine sont utilisés pour libérer divers types de molécules. Par exemple, la caséine traitée avec l'enzyme transglutaminase tissulaire [16], ou avec un composant chimique appelé

génipine (extrait du Gardénia) [17] ont permis la gélification de systèmes aqueux de caséine pour la formation de nouveaux hydrogels, qui se sont révélés être de bonnes matrices pour le piégeage et la libération contrôlée de la vitamine B₁₂ et de la protéine BSA.

III.3. La caséine : composition chimique et solubilité

III.3.1. Analyses élémentaires

Les caséines « acides » sont les plus commercialisées. Parmi elles, la plus courante est la caséine obtenue en utilisant l'acide lactique; c'est précisément celle que nous avons utilisée dans nos expériences.

Le Tableau III-3 regroupe des analyses élémentaires réalisées sur différentes caséines dont celle que nous avons utilisée. Comme attendu, les pourcentages de C, H et N sont supérieurs à ceux de P et Ca en raison de la teneur élevée en protéines présentes dans la caséine environ 80 à 90 % [18, 19]. D'autres études relatent plus précisément les pourcentages de Ca et P dans la caséine : ces valeurs correspondent à 0,1 % [20] et 0,17 % [18] pour le Ca, et 0,7 % [21], 0,78 % [18] et 0,85 % [22] pour le P. Le pourcentage en P est associé : i) *au phosphore organique* présent dans les groupements phosphosérines des séquences d'acide aminés (Figure III-4), la α_s -caséine étant la caséine qui présente le plus grand nombre de groupements phosphosérines (8 à 11), tandis que les β - et κ -caséines en présentent 5 et 1, respectivement [23-25], et ii) *au phosphore inorganique* qui provient du phosphate de calcium colloïdal qui n'a pas été éliminé lors des étapes de récupération de la caséine à partir du lait.

Tableau III-3. Analyses élémentaires (% massique) de différentes caséines.

| Elément | Caséine [26] | Caséine [27] | Caséine [28] | Caséine [29] | Caséine (Sigma-Aldrich) ^a |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------------------|
| C | 52,88 | 52,49 | 52,96–53,50 | n.m. | 47,93 |
| H | 6,99 | 7,14 | 7,09–7,13 | n.m. | 7,14 |
| N | 15,51 | 15,75 | 15,63 | n.m. | 13,96 |
| P | 0,789 | n.m | n.m. | 0,7 | 0,71 |
| Ca | n.m | n.m | n.m. | n.m. | 0,14 |
| O et autres ^b | 23,05 | 24,63 | 24,12–24,51 | (Na : 1,3) | 30,12 |

^a : éléments dosés par ICP-AES, caséine utilisée dans le cadre de notre étude.

^b : calculés par différence, n.m. : non mentionné.

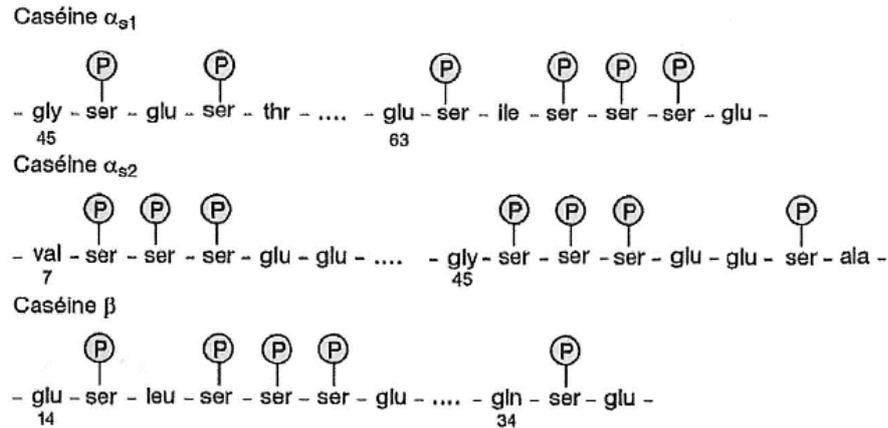


Figure III-4. Séquence de certains fragments peptidiques phosphorylés des caséines bovines [30].

III.3.2. Solubilité

III.3.2-1. Point bibliographique

La caséine, poudre blanche jaunâtre et amorphe, est insoluble dans les acides, l'éthanol et l'éther. Elle est très faiblement soluble dans l'eau (environ 0,11 g. L⁻¹ à 25 °C) [31]. Elle est soluble dans les alcalis et les carbonates alcalins en formant des caséinates dont les solutions sont visqueuses [32].

La solubilité de la caséine dépend fortement du pH. De façon générale, son point isoélectrique (noté pI) est voisin de 4,6 [32]. De façon plus précise, les α_{s1} , α_{s2} , β et κ caséines bovines ont des points isoélectriques situés entre 4,9–5,0; 5,0–5,4; 5,1–5,6 et 5,4–5,9 respectivement [33].

Afin d'expliquer le comportement de la caséine en fonction du pH, rappelons que selon le modèle submicellaire décrit par Schmidt (1982) [34] et Walstra et Jenness (1984) [35], la micelle de caséine serait constituée d'un ensemble de sous-unités ou submicelles, de nature exclusivement protéique et de composition variable, associées les unes aux autres par des éléments minéraux (calcium, magnésium, phosphate) (Figure III-5). Les sous-unités sont constituées d'un cœur hydrophobe, formé par les fragments apolaires des caséines et d'une enveloppe hydrophile constituée par les segments polaires des caséines. En présence de calcium et phosphate minéral, les sous-unités s'associent par l'intermédiaire de liaisons phosphocalciques. Les sous-unités riches en β -caséine, présentant de par leur densité en phosphosérine une forte réactivité vis-à-vis du calcium, sont préférentiellement localisées à

l'intérieur de la structure micellaire alors que les sous-unités riches en caséine κ sont localisées en périphérie.

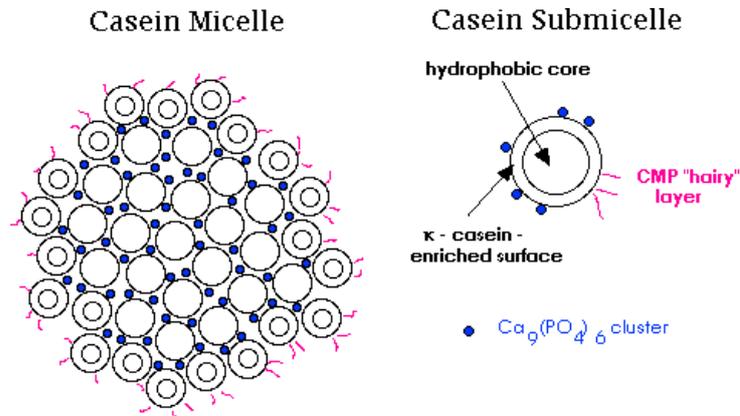


Figure III-5. Structure micellaire et sub-micellaire de la caséine [36].

Les caséines étant des protéines, leur structure chimique est composée de différents acides aminés (Tableau III-4), dont les principaux cités par Barthélemy (1918) sont : la serine (Ser), la proline (Pro), la leucine (Leu), la valine (Val), la phénylalanine (Phe), l'acide glutamique (Glu), l'acide aspartique (Asp), la lysine (Lys), le tryptophane (Trp) et la tyrosine (Tyr) [37]. Les acides aminés se caractérisent principalement par des groupements fonctionnels carboxyles ($-\text{COOH}$) et amines ($-\text{NH}_2$) dans leur structure dont la charge varie en fonction du pH (Figure III-6).

Tableau III-4. Composition en acides aminés (nombre) des caséines bovines [33].

| | α_{s1} | α_{s2} | β | κ |
|------------------|---------------|---------------|---------|----------|
| Asp | 7 | 4 | 4 | 4 |
| Glu | 24 | 25 | 18 | 13 |
| Asn | 8 | 14 | 5 | 7 |
| Gln | 15 | 15 | 21 | 14 |
| Thr | 5 | 15 | 9 | 14 |
| Ser | 8 | 6 | 11 | 12 |
| Ser ^P | 8 | 11 | 5 | 1 |
| Pro | 17 | 10 | 35 | 20 |
| Gly | 9 | 2 | 5 | 2 |
| Ala | 9 | 8 | 5 | 15 |
| Val | 11 | 14 | 19 | 11 |
| Ile | 11 | 11 | 10 | 13 |
| Leu | 17 | 13 | 22 | 8 |
| Phe | 8 | 6 | 9 | 4 |
| Tyr | 10 | 12 | 4 | 9 |
| Met | 5 | 4 | 6 | 2 |
| Cys | 0 | 2 | 0 | 2 |
| Lys | 14 | 24 | 11 | 9 |
| His | 5 | 3 | 5 | 3 |
| Arg | 6 | 6 | 4 | 5 |
| Trp | 2 | 2 | 1 | 1 |

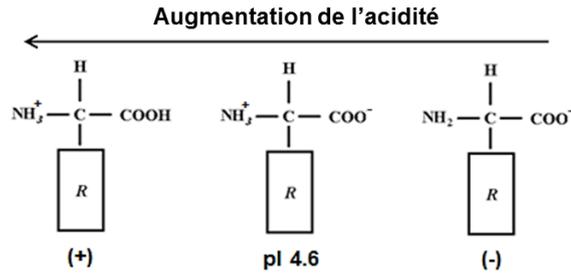


Figure III-6. Diagramme représentatif de l'effet de la variation du pH sur la charge électrique globale de la caséine par rapport à son pI. R : chaîne carbonée. (+) et (-) indiquent que la caséine est chargée positivement ($\text{pH} < \text{pI}$) et négativement ($\text{pH} > \text{pI}$) respectivement.

De plus, compte-tenu de leur composition, les caséines présentent des zones hydrophiles et hydrophobes (Figure III-7).

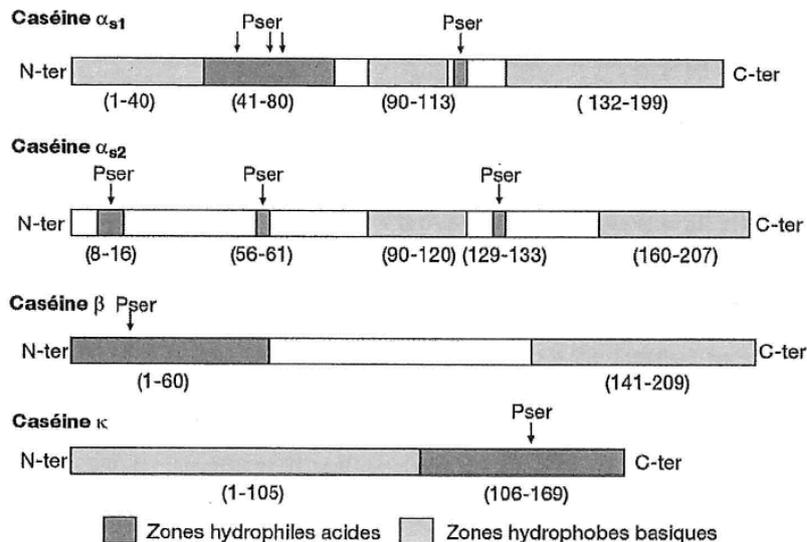


Figure III-7. Répartition des zones hydrophiles et hydrophobes sur les caséines bovines [30].

Les interactions hydrophobes (de type Van der Waals), liaisons hydrogène et actions électrostatiques sont les principales interactions qui interviennent dans la formation de micelles [38].

Pour une valeur de $\text{pH} < 3$, beaucoup de résidus d'acides aminés présents dans la caséine sont protonés. La capacité des protons H^+ des groupements $-\text{NH}_3^+$ à former des liaisons hydrogène est beaucoup plus forte que celle des protons H « neutres » des groupements $-\text{NH}_2$. Ainsi, il s'établit de fortes liaisons hydrogène entre molécules de caséine. Par ailleurs, il convient de noter que de fortes interactions cations– électrons π peuvent s'établir entre d'une

part les sites cationiques présents dans les « chaînes » de la lysine, l'arginine et l'histidine, et d'autre part les noyaux aromatiques présents dans la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane [39, 40]. Les liaisons hydrogène et interactions cation–électrons π jouent donc un rôle clé dans l'auto-assemblage des molécules de caséine, en plus des interactions hydrophobes conduisant ainsi à la structure de caséine la plus compacte à $\text{pH} < 3$. Selon Liu et Guo (2008) [38], la structure des micelles de caséine est la plus compacte à $\text{pH} = 3$ à cause du peu de charges négatives présentes dans les micelles. Bien que les nanoclusters de phosphate de calcium soient essentiellement dissous à $\text{pH} < 3$, la taille moyenne des micelles de caséine reste inchangée par rapport à celle observée à $\text{pH} = 7$ (Figure III-8). Ceci indique que les liaisons hydrogène associées aux interactions hydrophobes comptent beaucoup dans la formation des micelles de caséine aux pH acides [38].

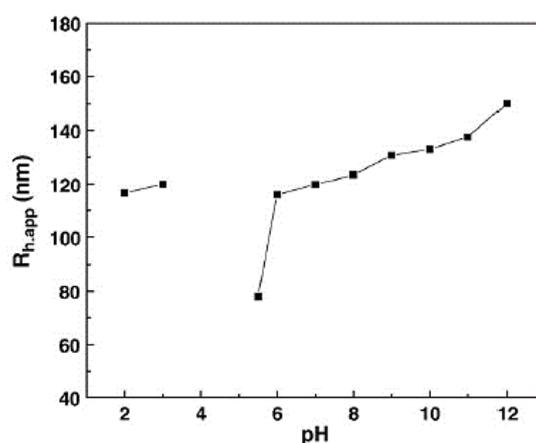


Figure III-8. Relation entre le rayon hydrodynamique apparent des micelles de caséine et le pH [38].

Pour un pH compris entre 5,5 et 12, la déprotonation des groupements acides carboxyliques des résidus acides aspartiques et glutamique induit de nombreux changements dans la formation des micelles de caséine incluant :

- Des répulsions électrostatiques entre les groupements carboxyliques qui sont ionisés (charge < 0). Cela induit un relâchement des nanodomains hydrophobes et une augmentation de la taille des micelles de caséine (Figure III-8).
- La destruction de ponts salins.
- La formation de charges isolées qui entraîne éventuellement un relâchement (gonflement) de la structure de la micelle de caséine lorsque le pH augmente.

À pH 5,5, la valeur du pH est proche de la valeur théorique du point isoélectrique de la caséine. La charge globale des molécules est proche de 0. Ainsi la structure de la micelle de caséine a tendance à rester compacte (coagulation). La taille des micelles de caséine est donc plus faible qu'en milieu basique.

La Figure III-9 illustre également l'effet du pH . Le comportement de la caséine peut conduire à l'encapsulation puis la libération de certaines molécules par modification du pH [23].

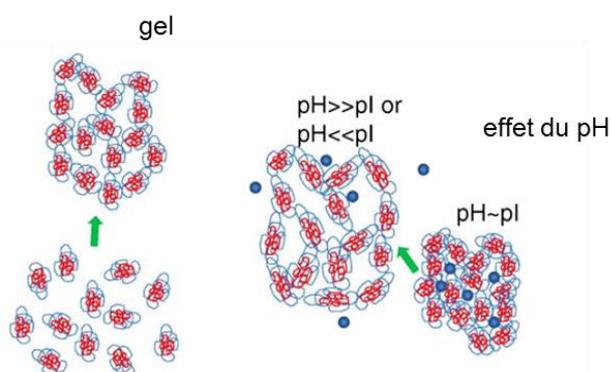


Figure III-9. Illustration de l'effet du pH sur la solubilité de la caséine (figure modifiée à partir de [23]). Les cercles bleus représentent des molécules libérées par modification du pH .

Très récemment, Gonzales-Jordan *et al.* (2015) [29] ont étudié par RMN ^{31}P l'effet du pH sur la structure et la mobilité des phosphates présents dans la caséine en solution aqueuse. Ils ont travaillé notamment sur des solutions aqueuses de phosphocaséinate « natif » c'est-à-dire contenant du calcium et formant des micelles en solution. À partir des valeurs de déplacements chimiques mesurées pour une solution amenée à $pH = 6,8$, ils ont identifié :

- À $\delta = 1,5$ ppm (signal étroit) : le P_i (phosphore inorganique) sous forme d'orthophosphate mobile.
- À $\delta = 3,2$ ppm (signal étroit) : du P_o (phosphore organique) mobile.
- À $\delta = 2,5$ ppm (signal large) : des P_i et P_o « immobiles ».

Une acidification des solutions provoque une diminution des déplacements chimiques expliquée par les valeurs de $pK_a = 5,8$ pour les P_o et $6,5$ pour P_i . À $pH = 6,8$, 97 % du P_i et 81 % du P_o sont immobiles et très probablement, ces phosphores sont impliqués dans la formation des nanoclusters CCP (phosphate de calcium colloïdal). La fraction des P mobiles (P_o et P_i) augmente faiblement avec une diminution du pH jusqu'à 5,5. Elle augmente ensuite très rapidement pour atteindre 75 % à $pH = 4,8$.

Malgré la libération de phosphate à partir des nanoclusters CCP en abaissant le pH, la plupart des protéines sédimentent lentement sous l'effet de la gravité pour des $\text{pH} < 5$ et de larges flocculats ont été observés par microscopie confocale à balayage laser pour des $\text{pH} < 5,2$ (Figure III-10). Par ailleurs, selon les auteurs, il n'y a pas de corrélation entre la mobilité des phosphates et la solubilité des caséines.

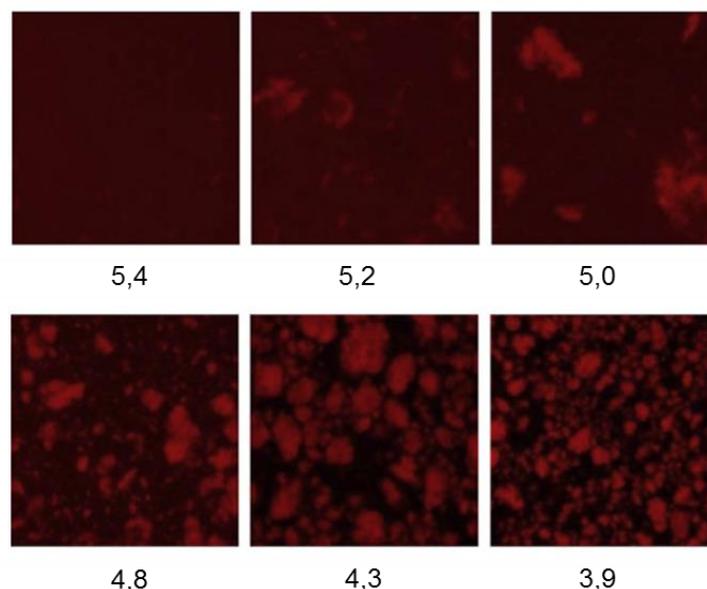


Figure III-10. Images de microscopie confocale à balayage laser (dimensions = $150 \times 150 \mu\text{m}$) de solutions micellaires à différents pH [29].

Par ailleurs, il est important de noter que la concentration de la caséine, la température et la force ionique des solutions affectent les propriétés des micelles. Cela rend les effets du pH plus complexes. En fonction de l'intensité du traitement thermique du lait, diverses modifications de la structure micellaire de la caséine ont lieu. Certaines études mentionnent qu'un chauffage « sévère » (par exemple à 120°C pendant 20 min.) provoque des changements irréversibles dans les micelles tels que l'hydrolyse partielle des résidus de phosphosérine [41, 42]. Il semblerait également que la déphosphorylation des résidus de phosphosérine puisse être réalisée à $T > 110^\circ\text{C}$ grâce à un mécanisme de β -élimination conduisant à la formation de déshydroalanine [43, 44]. Un traitement thermique des micelles de caséine peut induire diverses autres modifications comme une acidification du milieu, la précipitation du CCP ou la désagglomération des micelles en caséines individuelles [45]. Par ailleurs, selon Chu *et al.* (1995) [46] les sub-micelles sont stables à haute température. Elles peuvent résister à un chauffage à 140°C pendant 10 s et s'agrègent progressivement en particules de 200 nm pour une durée de chauffage comprise entre 4 et 10 min.

D'autre part, Philippe *et al.* (2005) [47] ont étudié les effets de différents cations sur les caractéristiques physico-chimiques des micelles de caséine. Ils ont préparé des suspensions de micelles à partir de poudre de phosphocaséinate dispersée dans du lait ultrafiltré. Ils ont travaillé à des concentrations en cations comprises entre 2,5 et 8,0 mmol. kg⁻¹, à un pH ajusté à 6,75 et à une concentration finale en caséine dans les différentes suspensions micellaires de 26,1 g. kg⁻¹. Les principales conclusions de leurs travaux sont les suivantes :

- L'ordre d'association des cations avec les micelles de caséine est le suivant : Fe³⁺ > Zn²⁺ > Ca²⁺ > Cu²⁺ > Mg²⁺.
- L'étude suggère également que l'association des cations avec les micelles de caséine n'est pas directe, et que notamment les phosphates inorganiques présents dans le sérum jouent un rôle important dans la formation des nouveaux sels tels que les phosphates inorganiques-cations.
- En l'absence de cations ajoutés, les suspensions de micelles de caséine contiennent une petite quantité de molécules de caséines en phase aqueuse (ca. 5 % de la quantité totale de caséine). L'ajout de cations provoquerait la formation de complexes cation-caséine « libres » *via* des interactions électrostatiques (Ca²⁺, Mg²⁺ et Zn²⁺) ou des liaisons de coordination (Fe³⁺, Cu²⁺) avec les atomes d'oxygène des résidus de phosphoséryl, aspartyl et glutamyl.
- La stabilité des micelles de caséine durant un traitement thermique à 115 °C durant 30 min dépend de la nature et de la concentration du cation ajouté. L'addition de calcium, zinc et cuivre ne déstabilise alors pas les suspensions de micelles.

III.3.2-2. Résultats expérimentaux

Des tests de solubilité ont été réalisés avec la poudre de caséine utilisée pour nos synthèses dans des solutions aqueuses de soude, milieu utilisé pour la synthèse de nos matériaux.

Pour cela, des solutions saturées de caséine ont été préparées à partir du mélange de 0,6 g de caséine du lait de vache ajoutés dans 10 mL d'une solution aqueuse de soude à différentes concentrations et à température ambiante. Le Tableau III-5 regroupe les concentrations de soude utilisées ainsi que les observations faites lors des expériences (pH du mélange, aspect, ...). Ces résultats révèlent un effet de la quantité de soude et du pH du milieu sur la solubilité de la caséine. Ils sont résumés ci-dessous :

- Des solutions concentrées en soude (0,05 M–1 M) et fortement basiques (pH= 12,5–14,0) permettent la dissolution complète de la caséine. Les solutions obtenues de couleur jaune sont également basiques (pH= 10,5–13,5).
- Des solutions moins concentrées en soude (0,003 M–0,03 M) et moins basiques (pH= 10,5–12,0) permettent la dissolution partielle de la caséine. Il se forme alors un mélange biphasique composé d'une phase solide de couleur blanche (caséine non soluble) et d'une phase liquide (jaunâtre). Visuellement le niveau de dissolution diminue avec la diminution du pH du mélange (pH= 8,0–4,5) et lorsque la valeur du pH se rapproche de celle du pI.

Tableau III-5. Concentrations des solutions aqueuses de NaOH utilisées pour la dissolution de la caséine (poudre). Les pH_{NaOH} et $\text{pH}_{\text{NaOH/caséine}}$ correspondent aux pH de la solution de soude et du mélange soude + caséine, respectivement.

| [NaOH] M | $\text{pH}^a_{\text{NaOH}}$ | $\text{pH}^a_{\text{NaOH/caséine}}$ | Niveau de dissolution | Aspect du mélange |
|----------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 1,00 | 14,0 | 13,5 | complète | phase liquide (jaunâtre) |
| 0,50 | 13,5 | 13,5 | “ | “ |
| 0,10 | 13,0 | 12,5 | “ | “ |
| 0,05 | 12,5 | 10,5 | “ | “ |
| 0,03 | 12,0 | 8,0 | partielle | 2 phases (liq. jaunâtre : sol. blanc) |
| 0,01 | 11,0 | 5,5 | “ | ++ |
| 0,003 | 10,5 | 4,5 | “ | +++ |

^a : précision de pH ($\pm 0,5$) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

+ : indique l'intensité de la séparation des phases (formation de phase solide avec la diminution du pH).

III.3.2-3. Conclusion

Le cation zinc est donc un élément qui interagit avec la caséine et ces interactions avec les phosphates inorganiques pourraient favoriser la synthèse biosourcée de zincophosphates poreux.

D'autre part, dans le cadre de nos travaux concernant la synthèse de métallophosphates poreux, le contrôle de divers paramètres comme le pH, la concentration de soude et la température de synthèse apparaît pertinent car il a été relevé dans la littérature que ces

paramètres ont une influence sur la structure de la caséine, la libération du phosphore et donc sur les rôles attendus de la caséine comme agent directeur de structure et comme source de phosphore.

Le paragraphe suivant regroupe les essais de synthèse hydrothermale de zincophosphates. Les caractérisations des solides obtenus ainsi que leur stabilité en milieu aqueux et leur propriété de fluorescence sont étudiées car ces propriétés pourraient permettre d'ouvrir des voies d'applications intéressantes dans les domaines environnementaux et biomédicaux (chapitres V et VI de la thèse).

III.4. Synthèse de zincophosphates

Les synthèses ont été réalisées en suivant le mode opératoire décrit dans le paragraphe II.2. L'influence de différents paramètres de synthèse a été étudiée. De plus, l'influence des conditions de calcination (température et la vitesse de montée en température) a été précisée.

III.4.1. Influence de paramètres de synthèse

Tenant compte du fait que le pH et la température de synthèse influent sur la solubilité de la caséine et sur la libération des groupements phosphate de la protéine, nous avons fait varier principalement ces deux paramètres de synthèse. Le mélange réactionnel a pour composition molaire $1 \text{ ZnO} : 0,093 \text{ P}_2\text{O}_5 : x \text{ Na}_2\text{O} : 1085 \text{ H}_2\text{O}$. Une teneur en P de 0,71 % en masse caractérise la caséine employée (Tableau III-3). Le rapport molaire Zn/P = 5,3 pour le milieu réactionnel est utilisé pour favoriser la consommation du phosphore.

III.4.1-1. Influence du pH

Le pH du milieu réactionnel a été modifié de deux façons différentes à partir du mélange de départ constitué de caséine + solution aqueuse basique (NaOH). Diverses quantités d'acide ou des solutions aqueuses basiques contenant différentes quantité de soude ont été utilisées. Il est important de mentionner que les valeurs de pH des milieux réactionnels avant (ici montrés) et après le traitement hydrothermal n'ont pas eu de différences remarquables pour des mesures avec des bandelettes de papier pH.

a. Modification du pH par ajout d'acide

Le pH du milieu réactionnel est modifié par ajout d'acide chlorhydrique (HCl 1 M) (entre 0 et 0,65 mL) dans le mélange de départ caséine + solution aqueuse de soude (NaOH 1 M). La solution de nitrate de zinc à 0,35 M est ensuite ajoutée. La Figure III-11 regroupe les diffractogrammes de rayons X des produits bruts de synthèse et le Tableau III-6 résume les résultats des analyses. Il apparaît que dans les conditions de synthèse ($7,5 < \text{pH} < 14$) aucune phase phosphate ne cristallise. De l'oxyde de zinc de type wurtzite (PDF n°01-079-9878) se forme et la présence d'une phase amorphe (caséine) est clairement visible pour des pH compris entre 7,5 et 9,0. Dans ce cas, la caséine précipite puisque sa solubilité diminue lorsque la valeur du pH se rapproche de son pI. À $\text{pH} = 14$ et pour une température de synthèse de $60\text{ }^\circ\text{C}$, seul $\text{Zn}(\text{OH})_2$ s'est formé (PDF n°04-012-2300).

Tableau III-6. Résultats des analyses de DRX des produits bruts de synthèse obtenus en faisant varier le pH du mélange réactionnel par ajout d'acide (HCl 1M). Température de synthèse comprise entre $60\text{ }^\circ\text{C}$ et $120\text{ }^\circ\text{C}$ pour une durée de 6 jours.

| Quantité de HCl 1M ajouté* (mL) | 1 ZnO : 0,093 P ₂ O ₅ : 8,60 Na ₂ O : 1085 H ₂ O | | | |
|------------------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| | pH ^a | 60 °C | 100 °C | 120 °C |
| 0 | 14,0 | Zn(OH) ₂ | ZnO | n.r. |
| 0,51 | 9,0 | n.r. | <u>ZnO</u> + amorphe | <u>ZnO</u> + amorphe |
| 0,65 | 7,5 | <u>ZnO</u> ^b + amorphe | <u>ZnO</u> + amorphe | <u>ZnO</u> + amorphe |

^a : précision de pH ($\pm 0,5$) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

— : phase majoritaire. * : volume associé = 0 à 0,65 mL. n.r. : synthèse non réalisée.

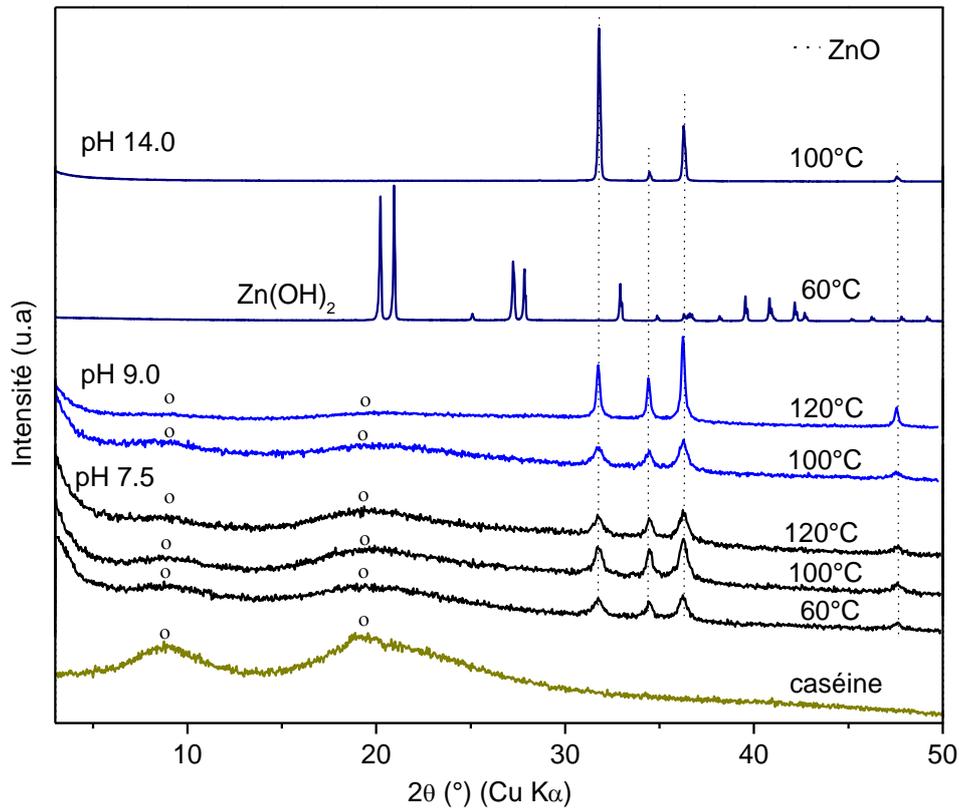


Figure III-11. Diffractogrammes de rayons X sur poudre des produits bruts de synthèse obtenus par variation du pH du mélange réactionnel par ajout d'acide (HCl 1M).

b. Modification du pH par variation de la quantité de soude

Des solutions à 3×10^{-3} M, 0,10 M, 0,50 M et 1,0 M ont été utilisées. À la solution/mélange résultant a été introduit la solution de nitrate de zinc 0,35 M comme également fait avec les synthèses préparées par ajout d'acide. Le Tableau III-7 regroupe les conditions de synthèse ainsi que les résultats des analyses réalisées par DRX sur des produits bruts de synthèse obtenus pour une durée de 6 j, temps pour lequel nous avons observé la présence de phases zincophosphates assez bien cristallisées. De l'oxyde de zinc se forme également à pH très basique. Aux environs de $\text{pH} = 7,5$, une phase amorphe pouvant correspondre à de la caséine est essentiellement détectée. À un pH proche du point isoélectrique, soit 4,5, de l'hopéite ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (PDF n°00-037-0465) est identifiée à côté d'une phase amorphe qui correspond probablement toujours à de la caséine. L'identification d'une phase majoritaire de caséine à ces deux valeurs de pH n'est pas surprenante en raison de sa précipitation comme évoqué précédemment dans la section III.3. Par ailleurs, quelques travaux dans la littérature reportent également la cristallisation de l'hopéite (phase dense = non poreuse) pour des valeurs de pH plutôt acides (par exemple $\text{pH} = 4,0$ [48], $4,0\text{--}6,0$ [49] et $7,2$ [50]).

Tableau III-7. Résultats des analyses de DRX des produits bruts de synthèse obtenus en faisant varier le pH du milieu réactionnel par variation de la quantité de soude (NaOH). Température de synthèse 100 °C pour une durée de 6 jours.

| 1 ZnO : 0,093 P ₂ O ₅ : (0,027–8,6) Na ₂ O : 1085 H ₂ O | | |
|---|-------------------|---|
| pH ^a | Na ₂ O | 100 °C |
| 4,5 | 0,027 | <u>amorphe</u> + hopéite Zn ₃ (PO ₄) ₂ .4H ₂ O |
| 7,5 | 0,81 | <u>amorphe</u> + traces d'impureté n.i. |
| 13,0 | 4,05 | ZnO |
| 14,0 | 8,60 | ZnO |

^a : précision de pH (± 0.5) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

— : phase majoritaire. n.i. : non identifié.

c. Conclusion

Bien que les pH basiques permettent une dissolution complète de la caséine (Tableau III-5), il s'avère que, dans nos conditions de synthèse, cette gamme de pH conduit à la formation d'oxyde/hydroxyde de zinc. Ce résultat est en accord avec la solubilité apparente de l'hydroxyde de zinc, à température ambiante, en fonction du pH (Figure III-12).

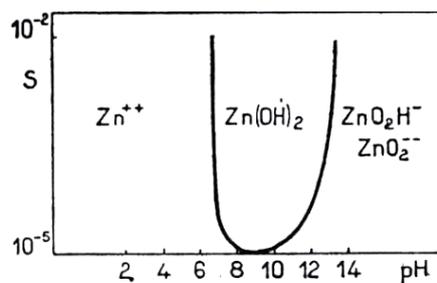


Figure III-12. Solubilité apparente de l'hydroxyde de zinc en fonction du pH (10⁻² M) à température ambiante [51]

En effet, Zn²⁺ n'est plus soluble vers pH = 6,8 (10⁻² M, température ambiante). Il apparaît que le pH du milieu réactionnel doit être voisin de 4,5 pour permettre la cristallisation de zincophosphates. Les cations Zn²⁺ réagiraient alors avec les phosphates libérés par la caséine au cours du traitement hydrothermal.

Une étude plus complète de l'influence du pH par variation de la quantité de soude sur la cristallisation de phases zincophosphates synthétisés à partir de caséine est incluse dans l'article Hinostroza *et al.* (2016) [52].

III.4.1-2. Influence de la température de synthèse

À partir des diffractogrammes de rayons X des produits bruts de synthèse représentés dans la Figure III-11, il semblerait que la cristallinité des phases formées augmente avec une élévation de température. Par ailleurs d'après la littérature, une température au moins égale à 100 °C permettrait l'hydrolyse de la caséine et la libération partielle du phosphore contenu dans celle-ci [41, 42]. C'est pour ces raisons que des synthèses réalisées à 100 °C semblent avantageuses pour la formation de zincophosphates à partir de caséine.

Les principaux résultats obtenus sur la synthèse hydrothermale de zincophosphates poreux à partir de la caséine sont regroupés dans l'article Hinostroza *et al.* (2016) qui a été publié en 2016 [52]. Il fait l'objet du paragraphe suivant.

III.4.1-3. Publication

Cet article relate : i) une étude de l'influence du pH par variation de la quantité de soude à la température de 100 °C, ainsi que ii) l'influence des conditions de calcination sur l'obtention de phases cristallines de zincophosphates poreux. Cette publication présente également les résultats de caractérisation des matériaux par différentes techniques, lesquels ont permis de proposer un mécanisme de formation des zincophosphates poreux à partir de caséine comme biosource de phosphore. Une évaluation de leur stabilité structurale dans l'eau ainsi que leur caractéristique en fluorescence sont aussi présentées en vue de l'utilisation de ces matériaux dans des systèmes aqueux, comme les milieux biologiques par exemple.

**HYDROTHERMAL SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BIOSOURCED
MACROPOROUS ZINC PHOSPHATES PREPARED WITH CASEIN PROTEIN**

Jessica Hinostroza Ramos, Lydie Ploux, Karine Anselme, Lavinia Balan and
Angélique Simon-Masseron

Université de Strasbourg (UDS), Université de Haute Alsace (UHA), Institut de
Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), UMR CNRS 7361, ENSCMu, 3
bis rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse Cedex, France

Crystal Growth & Design (ACS), 2016, 16, 4897–4904.

DOI: 10.1021/acs.cgd.6b00454

Abstract

The development of an original and simple procedure of hydrothermal porous biosourced zinc phosphates synthesis from casein protein is reported in this study. The synthesis procedure does not require additional phosphorus source and structure-directing agent for macroporosity formation. The formation of zinc phosphates has been investigated as a function of the pH of the starting mixture (4.5 to 14.0) and of the temperature of calcination (from 150 to 750 °C). A material composed of hopeite ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) and casein was obtained after synthesis at pH 4.5 and 100 °C from a mixture of casein and zinc nitrate solutions. Macroporous zinc phosphates composed of $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ and $\alpha\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ with large porous size distribution (pore diameter between 350 to 1000 nm) were successfully obtained after the complete casein decomposition at 750 °C. Samples were characterized by X-ray powder diffraction, solid-state ^{31}P NMR spectroscopy, thermal analysis, scanning electron microscopy, nitrogen adsorption and by fluorescence spectroscopy. The macroporous zinc phosphates have a good stability in water for at least 24 h with no detectable change in their structure, porosity and crystal morphology.

1. Introduction

Metal phosphates are one of the most important families of inorganic zeolite-type materials. Their various chemical composition and structural diversity are potentially interesting for applications in catalysis, gas adsorption and separation.¹ The hydrothermal synthesis is a typical method used for zeolites and metal phosphates in highly crystalline form.² This method presents many advantages, among them the relatively low temperature (< 250 °C) of synthesis and the simple procedure required. Another advantage is the possibility to obtain crystalline phases with different chemical composition, structure and morphology only by changing reaction conditions, that is, temperature, pH, type of reagent, proportion of the reagents, additives, etc.³

Among metal phosphate materials, zinc phosphates crystallize rapidly under a hydrothermal synthesis and display a large variety of microporous compounds.^{4, 5} Several studies report on the potential applications of (micro)porous zinc phosphate materials as absorbents and catalysts, especially those with FAU (faujasite) and CZP (chiral zinc phosphate) structure types.^{6, 7} (Micro)porous zinc phosphates are commonly synthesized by hydrothermal method in the presence of an inorganic phosphorus source, an organic or inorganic structure-directing agent around which the mineral species are organized, and a mineralizer (OH⁻, F⁻, etc) that favors the formation of soluble species which participate in the crystallization. Most of the time, organic molecules with an amine group are used as structure-directing agents and stabilize the structure mainly through hydrogen-bonding.⁸⁻¹⁰ Neeraj *et al.* (1999) suggest that phosphates of the organic amines may act as intermediates in the formation of the metal phosphates.¹¹

This last decade, several research groups have developed original ways in order to obtain porous phosphates. By comparison with the MOF (Metal Organic Framework) synthesis, a stepwise hierarchical and rational synthesis of porous phosphate frameworks by predictable and directed assembly of isolable tetrameric metal phosphate with D4R units was developed.¹²⁻¹⁴ These secondary building units are coordinatively interconnected through a varied choice of bipyridine-based ditopic spacers.¹⁵ Then the guest accessibility of the porosity can be tuned by suitable modification of bipyridine spacers. Although the preparative procedure is simple and does not require high pressure or temperature, the process involves pyridine based molecules, methanol and/or DMSO which are not harmless molecules for the health and the environment.

An important area of applications of zinc phosphates is for metal protection. These materials, considered as alternative pigments, can be introduced in an epoxy coating to replace toxic pigments containing lead and chromium.¹⁶⁻¹⁸ Zinc phosphate cements are also used in dentistry for many years.¹⁹

Phosphoric acid H_3PO_4 85% is the most usual inorganic phosphorus source for the preparation of zinc phosphate dental cements and for the hydrothermal synthesis of zinc phosphates even though this reagent is corrosive and has a toxic effect. Phosphoric acid is produced from phosphates rocks of 'apatite' $Ca_5(PO_4)_3(F, Cl, OH)$, the major natural phosphorus source.²⁰ About 75% of apatite deposits exploited in the world are used to produce H_3PO_4 , an important reagent in the production of fertilizer, animal food and phosphorus chemicals.²¹ However, natural phosphorus resources are non-renewable and substitutes for phosphorus (in agriculture principally) do not exist yet.

With this objective, biosourced materials synthesis gets currently important attention from many researchers. The synthesis of new materials by substituting reagents from fossil resources by raw materials with living origin represents one of the major challenges in the domain of porous materials synthesis mostly aiming at more environmentally friendly and low-cost processes. In particular, organic phosphorus sources are considered to be very promising for biosourced porous metal phosphates synthesis by hydrothermal method. A number of studies describe the utilization of phosphorus-containing biomolecules as the main phosphorus source. Adenosine triphosphate (ATP), creatine phosphate and fructose 1,6-bisphosphate trisodium salt (FBP) were used for porous calcium phosphates synthesis,²²⁻²⁴ which have been investigated for drug delivery application. In contrast, the synthesis of porous zinc phosphate materials from phosphorus-containing biomolecules has not been reported yet.

Casein is a family of phosphoproteins, which correspond to about 80% of total proteins present in bovine milk.^{25, 26} Casein is composed of four principal types of casein, α_{s1} -, α_{s2} -, β - and κ -caseins, in proportion of approximately 45, 12, 34 and 10%.^{27, 28} They are in the form of dispersed spherical colloidal particles known as micelles (size diameter : 50–500 nm, average 150 nm).²⁹ The dry matter is composed of ~ 94 wt% protein and ~ 6 wt% mineral named 'colloidal calcium phosphate' (CCP) or 'inorganic phosphate'.³⁰ Casein also contains phosphoserine residues in the amino acid sequences, which are named 'organic phosphate' (-SerP-) and enable casein molecules to bind to calcium phosphate. α_s -casein is the major casein protein containing 8–11 phosphoserine groups, while β -casein and κ -casein have 5 and only 1 phosphoserine group respectively.^{29, 31, 32} According to this, the binding capacity of

casein components to calcium phosphate via their phosphoserine moieties is in the following order : $\alpha_{s1} > \alpha_{s2} > \beta > \kappa$ -casein.

Many studies have reported possible chemical bonding between caseins and divalent metals other than calcium, such as Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} and Fe^{2+} .³³⁻³⁸ This binding affinity between caseins and divalent cations is attributed to the ionized forms of phosphoserines and the electrostatic interactions or coordination bonds with the cations. Aside from the nature of cation, other factors such as the concentration, pH, and heat treatment have also shown an effect on the properties of casein micelles suspensions in presence of metallic cations.^{35, 39, 40}

Although phosphoserine groups of caseins have affinity to form chemical bonds with metallic cations, as mentioned before, no study reporting on the synthesis of metal phosphates solids from casein proteins seems to be available in the literature. However, some past studies mention the formation of poorly crystalline calcium phosphate by heat treatment of milk, that is, crystalline β -tricalcium phosphate or hydroxyapatite.^{41, 42} Besides, a recent study relates the formation of casein-iron-orthophosphates aggregates by di-potassium hydrogen orthophosphate addition for possible food applications.⁴³

In this context, the purpose of this work is the synthesis of macroporous zinc phosphates solids by a new procedure of hydrothermal synthesis using casein protein and $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ as phosphorus and zinc sources respectively. Casein protein was chosen because (a) it is easily available at a low cost and it represents an important phosphorus source from living origin for potentially environmentally friendly synthesis of metal phosphates solids, and (b) according to the literature, casein micelles have a binding capacity with divalent cations as Zn^{2+} . In this work, we report on the effect of experimental synthesis conditions on the nature of the crystallized phases, crystals morphology and samples porosity. Solids were characterized by X-ray diffraction, thermal analysis, solid-state ^{31}P NMR spectroscopy, scanning electron microscopy, nitrogen adsorption and fluorescence spectroscopy.

2. Experimental section

2.1. Reagents

Casein from bovine milk (technical grade) was purchased from Sigma Aldrich and zinc nitrate hexahydrate ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, analytical grade $\geq 99\%$) was obtained from Alfa Aesar. Sodium hydroxide (NaOH, pellets of analytical grade $\geq 97\%$) and phosphoric acid (H_3PO_4 85%) were purchased from Sigma Aldrich. All chemicals were used as received without further purifications.

2.2. Synthesis protocol

Casein dispersions were prepared by adding 9.50 g (~ 0.71 wt% of P) of casein powder to 190 mL of hydroxide sodium aqueous solution under magnetic stirring at room temperature for 30 min. Then, 32 mL of aqueous solution of zinc (II) 0.35 mol L^{-1} were added to the casein dispersion under magnetic stirring at room temperature for 20 min. The resulting solution was transferred to a 500 mL polypropylene flask, and stored at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 days. After crystallization, the product was filtered off, washed with distilled water and dried at $70 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight. Samples obtained at this synthesis step are in their as-synthesized form. Additionally, two reference samples were prepared : the first one by using 0.69 g of H_3PO_4 85% as phosphorus source instead of casein protein, and the second one in the presence of both 0.69 g of H_3PO_4 85% and 9.50 g of casein protein. Other experimental conditions were not changed.

2.3. Influence of pH

Different samples were prepared according to the previously detailed synthesis procedure. The pH of the starting mixture was varied between 4.5 and 14.0 according to the concentration of the solution of hydroxide sodium (i.e., 3.0 mmol L^{-1} ; 0.1 mol L^{-1} ; 0.5 mol L^{-1} and 1.0 mol L^{-1} for samples A, B, C and D respectively). Table 1 summarizes the molar composition of the different starting mixtures for these samples.

Table 1. Molar composition of the starting mixtures heated at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 days.

| sample | ZnO | P_2O_5^a | Na_2O | H_2O | pH |
|--------|-----|--------------------------|-----------------------|----------------------|------|
| A | | | 0.027 | | 4.5 |
| B | 1 | 0.093 | 0.810 | 1085 | 7.5 |
| C | | | 4.050 | | 13.0 |
| D | | | 8.600 | | 14.0 |

^a P from casein protein (~ 0.71 wt% of P)

2.4. Influence of the calcination conditions

Samples were calcined inside a muffle furnace within a temperature range of $150\text{--}750 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 h with a heating rate of $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. After calcination samples were cooled down to room

temperature (20 ± 5 °C). They are noted samples A, A-150, A-250, A-400, A-500, A-600 and A-750 in the text indicating the temperature of calcination used. Variations of the heating rate from 1 to 8 °C min⁻¹ were also performed with sample calcined at 750 °C.

2.5. Stability of macroporous zinc phosphates in water

A fraction of sample calcined at 750 °C (0.4 g) was introduced in 4 mL of distilled water at room temperature for 24 h with sporadic stirring. Then, the sample was dried at 70 °C overnight.

2.6. Characterization

The X-ray powder diffraction data were obtained using a STOE STADI-P diffractometer (Cu K α radiation, $\lambda = 1.5406$ Å) equipped with a curved germanium (111) primary monochromator. The measurements were recorded at room temperature and the identification of crystallized phases was realized with X'Pert HighScore software by comparison of the experimental patterns with diffraction patterns included in PDF-4 (powder diffraction files) data bases of the International Centre of Diffraction Data (ICDD).

Thermogravimetric (TGA) and differential thermal (DTA) analyses were performed on a Setaram Labsys thermoanalyser. About 10 mg of the samples were placed inside an alumina crucible and then into a heating chamber. The measurements were recorded under air stream with a heating rate of 5 °C min⁻¹ up to 900 °C.

The solid-state ³¹P-MAS NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II 300 spectrometer operating at $B_0 = 7.1$ T corresponding to a resonance frequency of 121.47 MHz for ³¹P; pulse angle = 2.87 μ s; relaxation time = 40 s and spinning rate = 25 KHz; using a probe with zirconia rotor 2.5 mm. All ³¹P chemical shifts are given relative to an external reference (H₃PO₄ 85%).

The morphology of samples, as well as the average size of macropores was determined by Scanning Electron Microscopy (SEM) using a Philips XL30 microscope. The samples were dispersed on a support covered with a graphite conductive tab and then coated with a thin film of gold (10–20 nm). The scanning electron micrographs were obtained with an accelerating voltage of 7 kV.

The presence of micro- and mesopores in the calcined samples was determined by N₂ adsorption–desorption measurements at the liquid nitrogen boiling point (77 K) using an ASAP 2020 Micrometrics equipment. The samples were previously degassed at 150 °C for 15

h under vacuum. The specific surface areas were determined by the BET (Brunauer, Emmett and Teller) multipoint method.

The photoluminescence (PL) emission spectra were recorded on a Horiba, Fluoromax-4, Jobin Yvon spectrofluorimeter equipped with a 150 W ozone-free xenon arc lamp as the excitation source.

3. Results and discussion

3.1. Effect of experimental conditions on the crystallization of zinc phosphates

3.1.1. Influence of pH

Figure 1 reports the XRD patterns of samples A–D prepared by pH variation of the starting mixture. The XRD pattern of casein powder used in the synthesis is also shown (Figure 1a) for comparison. Table 2 summarizes the effect of pH value on crystallization. At pH 4.5 (Figure 1b) the product of synthesis consists of a mixture of two phases : the major phase is an amorphous one related to casein protein. It corresponds to two very broad diffraction peaks centered at 9 and 19° (2 θ) also observed for casein (Figure 1a). The second phase is crystallized and is identified as hopeite ($Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$, PDF n°00-037-0465). When the pH value of the starting mixture increases to 7.5 (Figure 1c), the XRD pattern of the product does not show any crystallized phase. The two broad peaks that are observed were also identified to pH 4.5 and are related to casein powder used in the synthesis. For higher pH values, that is, 13.0 and 14.0 (Figure 1d, e), the synthesized product presents a well crystallized single-phase of zinc oxide (ZnO , PDF n°01-079-9878). These results indicate that pH value plays an important role on the hydrothermal synthesis of zinc phosphates from casein protein. At acid pH of 4.5, the solubilization of colloidal calcium phosphate (CCP) (inorganic phosphorus) of casein molecules produces phosphates ions,⁴⁴ that will react with the Zn^{2+} ions to form zinc phosphate hopeite at 100 °C. Furthermore, casein molecules precipitate during the solubilization of CCP due to the used 4.5 pH value which corresponds to the caseins isoelectric point (~ 4.5–4.6).⁴⁵ This could explain the amorphous phase of casein observed on the XRD pattern (Figure 1b). At this acid pH value, Zn^{2+} ions are not expected to bind to phosphoserine groups of caseins because the negative charges of carboxyl and phosphate groups (phosphoserine) of caseins are neutralized with protons, leading to a lower capacity to bind zinc.^{46, 47} On other hand, at pH 7.5, the inorganic CCP of casein micelles is insoluble and no formation of zinc phosphate phases has been reported.⁴⁸ The

precipitate of casein molecules here identified by XRD (Figure 1c) could be due mainly to the effect of synthesis temperature that was used in the present work (100 °C) for a long time (6 days).⁴⁹ When the pH value is highly basic, between 13.0 and 14.0, the casein micelles are strongly sterically stable because of their negative surface charge which induces repulsion forces between micelles.³¹ The Zn^{2+} ions tend to form oxides, as shown by XRD (Figure 1d, e).

Previous studies have also reported irreversible changes in casein micelles under heating at 120 °C during 20 min with the partial hydrolyze of phosphoserine residues of caseins to produce phosphate ions.^{39, 50} Therefore, based on the hydrothermal synthesis conditions reported in this study (100 °C for 6 days), it is probably that some phosphoserine residues may have been hydrolyzed releasing phosphate ions involved in hopeite crystallization at pH 4.5.

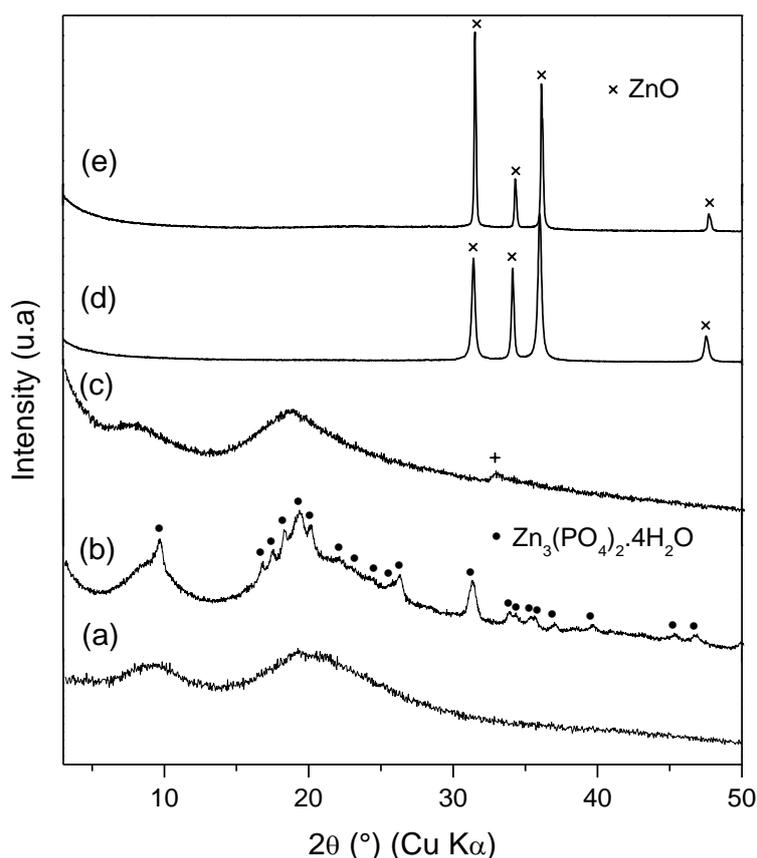


Figure 1. XRD patterns of the as-synthesized samples obtained by hydrothermal method at 100 °C for 6 days under different pH values : (a) casein powder; (b) sample A, pH = 4.5; (c) sample B, pH = 7.5; (d) sample C, pH = 13.0; (e) sample D, pH = 14.0. + : unidentified phase.

Table 2. XRD results of samples prepared from pH variation of the synthesis medium.

| sample | pH | T(°C) | crystallization time (days) | results (XRD) |
|--------|------|-------|-----------------------------|---|
| A | 4.5 | | | casein ^a + hopeite ^b |
| B | 7.5 | 100 | 6 | casein ^a + n.id. impurity to 32°(2θ) |
| C | 13.0 | | | ZnO |
| D | 14.0 | | | ZnO |

^a Major phase, ^b Zn₃(PO₄)₂·4H₂O, n.id. : not identified.

To determine the influence of casein protein on the formation of hopeite at about pH 4.5, two other samples were prepared : one with phosphoric acid as only source of phosphorus (absence of casein in the starting mixture), the second one with phosphoric acid and casein. They are named samples E and F respectively. The composition of the starting mixtures compared to that of sample A is reported in Table 3.

Table 3. Molar composition of the starting mixtures heated at 100 °C for 6 days.

| sample | ZnO | P ₂ O ₅ ^a | P ₂ O ₅ ^b | Na ₂ O | H ₂ O | pH |
|--------|-----|--|--|-------------------|------------------|------------------|
| A | | 0.093 | 0 | | | 4.5 |
| E | 1 | 0 | 0.252 | 0.027 | 1085 | 5.0 ^c |
| F | | 0.093 | 0.252 | | | 5.0 ^c |

^a P from casein protein (~ 0.71 wt% of P). ^b P from H₃PO₄ 85%. ^c Adjusted with NaOH 1M.

The XRD patterns of these samples are reported in Figure 2. Hopeite is mainly formed when phosphoric acid is the only phosphorus source (Figure 2c). However, when both phosphoric acid and casein are employed, the product had three compounds (Figure 2b) : a crystalline phase of hopeite, an amorphous phase of casein (broad peaks) and an unidentified compound. When casein is the only phosphorus source, the product is composed of casein and hopeite (Figure 2a). Therefore, although the amount of phosphorus is not similar in the three samples, XRD results indicate that hopeite can be formed whatever the phosphorus source used. Its best crystallization is obtained with phosphoric acid (sample E). These results suggest that casein limits hopeite formation during the hydrothermal treatment. Therefore, the

use of casein could enable a controlled growth of hopeite when compared to the use of H_3PO_4 for which unidentified peaks are detected (Figure 2b–c).

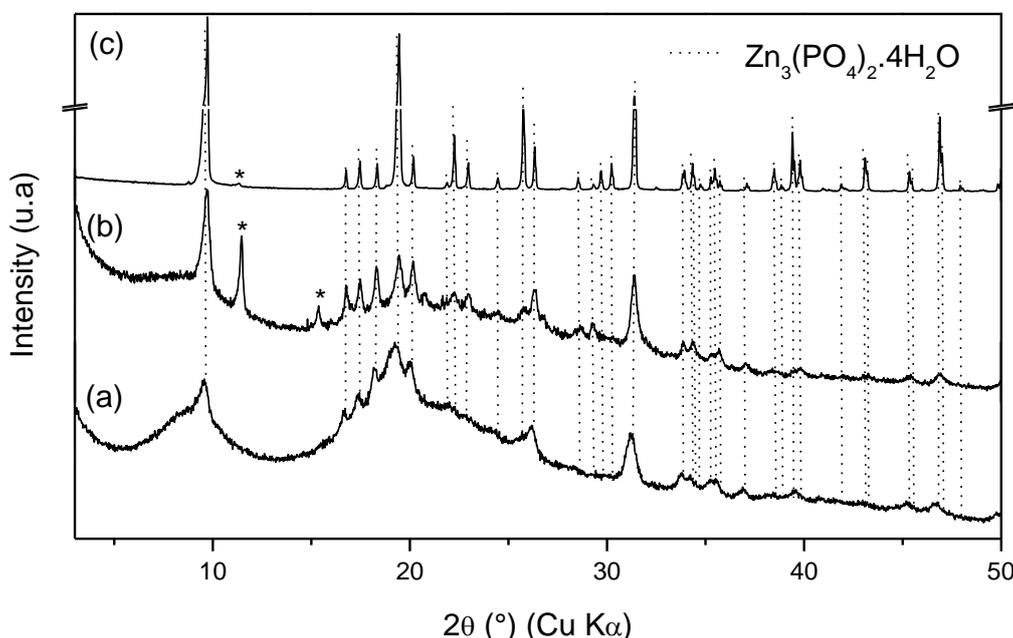


Figure 2. XRD patterns of as-synthesized samples obtained from a starting mixture with a pH value of 4.5 and after heating at 100 °C for 6 days : (a) sample A prepared using casein (9.50 g) as phosphorus source, (b) sample F prepared in the presence of both H_3PO_4 85% (0.69 g) and casein (9.50 g); (c) sample E prepared using H_3PO_4 85% (0.69 g) as phosphorus source. Asterisk (*) : not identified peaks.

3.1.2. Effect of calcination conditions

As casein may liberate only inorganic phosphorus from CCP and probably a fraction of organic phosphorus (phosphoserine residues) by hydrolysis during hydrothermal synthesis of sample A, the effect of calcination temperature on the crystallization of zinc phosphate phases was investigated. Figure 3 shows the XRD patterns of samples calcined at temperatures from 150 to 750 °C and Table 4 summarizes the XRD results. The XRD pattern of the sample calcined at 150 °C (Figure 3b) reveals the presence of amorphous phase attributed to the casein with traces of hopeite phase. However when the sample is calcined at 250 °C no obvious peak is identified (Figure 3c) indicating the amorphization of hopeite phase during casein decomposition. Then, the solid recrystallized into a zinc orthophosphate phase α - $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (PDF n°00-029-1390) at 400 °C (Figure 3d). At higher calcination temperatures

from 500 to 750 °C (Figure 3e–g), the crystallization of zinc diphosphates or pyrophosphates such as γ -Zn₂P₂O₇ (PDF n°00-049-1240) and α -Zn₂P₂O₇ (PDF n°00-008-038) structures is highlighted. These phases may be formed because of the presence of phosphates groups from phosphoserine residues released from casein decomposition. Such an evolution of the hopeite forming zinc phosphate phases during a thermal treatment is specific to the presence of casein because, as observed by Herschke *et al.* (2006), a heating of pure hopeite induces only dehydration.⁵¹ The black color observed for samples calcined from 250 to 600 °C is due to residual organic matter arising from the decomposition of casein. This was consistent with the broad band observed in the XRD patterns (Figure 3c–e) notably between 250 and 500 °C.

Furthermore, the influence of the heating rate, from 1 to 8 °C min⁻¹, for a calcination at 750 °C, was investigated. The XRD spectra (not reported) indicate that the heating rate has no relevant effect on the preferential formation of zinc phosphate phases (Table 4).

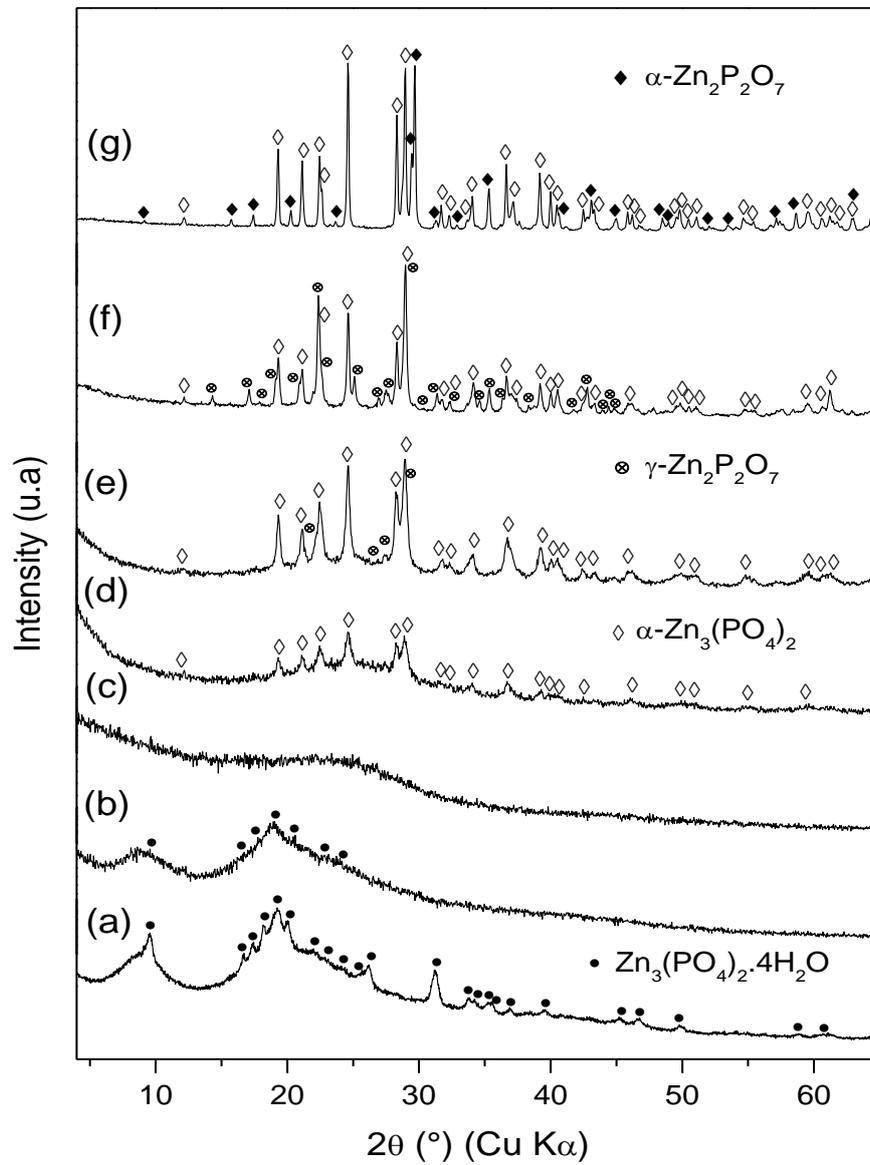


Figure 3. XRD patterns of sample A calcined at temperatures between 150 and 750 °C for 4 h with a heating rate of 5 °C min⁻¹ : (a) sample A; (b) sample A-150; (c) sample A-250; (d) sample A-400; (e) sample A-500; (f) sample A-600; (g) sample A-750.

Table 4. XRD analyses of sample A calcined at different temperatures and with different heating rate.

| sample | temperature (°C) | duration (h) | heating rate (°C min ⁻¹) | result (XRD) |
|--------|------------------|--------------|--------------------------------------|---|
| A-150 | 150 | | | casein ^a + hopeite ^b (traces) |
| A-250 | 250 | | | a.p ^c |
| A-400 | 400 | | | α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ ^a + a.p |
| A-500 | 500 | 4 | 5 | α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ ^a + γ -Zn ₂ P ₂ O ₇ + a.p (traces) |
| A-600 | 600 | | | α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ + γ -Zn ₂ P ₂ O ₇ |
| A-750 | 750 | | | α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ + α -Zn ₂ P ₂ O ₇ |
| | | | 1 | |
| A-750 | 750 | 4 | 3 | α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ + α -Zn ₂ P ₂ O ₇ |
| | | | 8 | |

^a Major phase, ^b Zn₃(PO₄)₂.4H₂O, ^c a.p : amorphous phase.

3.2. Thermal analyses

Differential thermal (DTA) and thermogravimetric (TGA) analysis were performed on sample A after calcination at a temperature from 500 to 750 °C. As shown in Figure 4 and 5, the DTA and TG curves of casein powder and sample A (Figure 4a–b, 5a–b) are similar. This is attributed to the presence of casein in sample A as previously revealed by XRD (Figure 1b). An endothermic peak with low intensity is observed between room temperature and 180 °C in the DTA curves (Figure 4a, b) : it is related to physisorbed water. In contrast, important exothermic broad bands are observed from 200 to 780 °C : they correspond to three weight losses observed on the TGA curves (Figure 5a, b). They are related to carbonization and ashing process during casein decomposition.⁵² Weight losses obtained from TGA curves (Figure 5a–e) are reported in Table 5. The casein content decreases with increasing the calcination temperature of the samples, which was suggested by XRD results. Sample A contains 84.6 wt% of casein. On other hand, the complete removal of organic compounds derived from casein decomposition is possible from 750 °C.

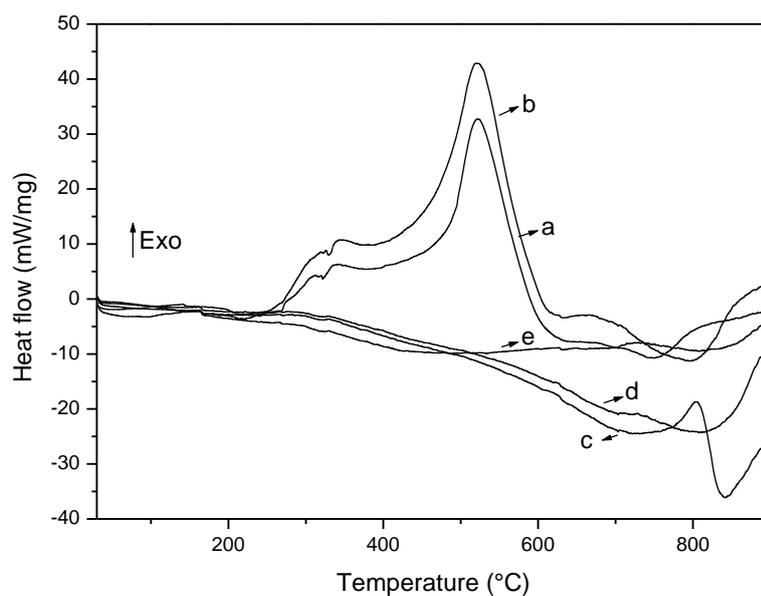


Figure 4. DTA curves recorded under air of the sample A calcined from 500 to 750 °C. (a) casein powder; (b) sample A; (c) sample A-500; (d) sample A-600; (e) sample A-750.

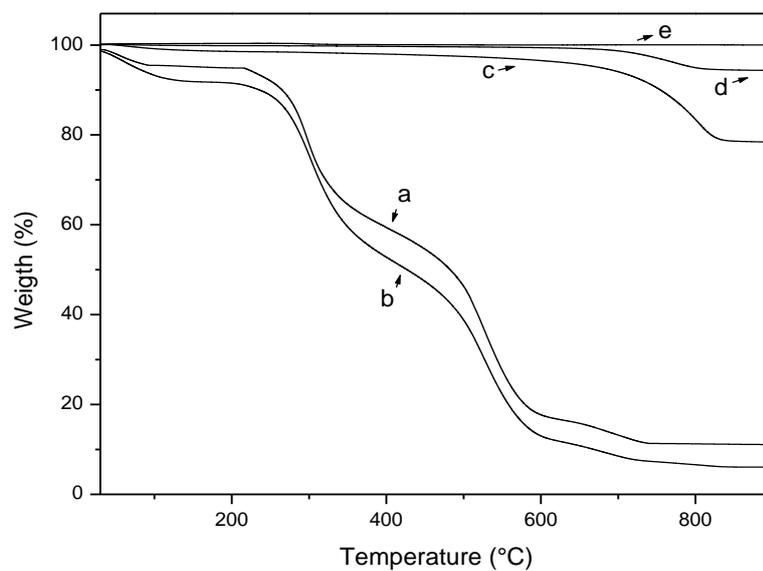


Figure 5. TGA curves recorded under air of sample A calcined from 500 to 750 °C. (a) casein powder; (b) sample A; (c) sample A-500; (d) sample A-600; (e) sample A-750.

Table 5. Weight loss percentages obtained from TGA curves of sample A calcined from 500 to 750 °C.

| sample | until 200°C wt% | from 200 to 780°C wt% |
|--------|--------------------|--------------------------|
| A | 8.5 | 84.6 |
| A-500 | 1.4 | 11.8 |
| A-600 | 0.2 | 4.1 |
| A-750 | ~ 0 | ~ 0 |

3.3. Solid-state ^{31}P -NMR spectroscopy

Sample A calcined at different temperatures from 250 to 750 °C was also characterized by ^{31}P NMR spectroscopy to follow the evolution of phosphorus atoms environment during the formation of zinc phosphate phases (Figure 6). The NMR spectrum associated to casein protein reported as reference shows a broad signal centered at 0 ppm (Figure 6a) as previously observed in the literature.⁵³ The analysis of sample A (Figure 6b) reveals a sharp signal at 4.1 ppm attributed to hopeite, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ identified by XRD (Figure 3a). This chemical shift value is in agreement with those found in the literature (i.e., 4.6 ppm, 4.2 ppm and 4.0 ppm).^{6, 7, 54} A broad signal observed at 0.7 ppm is related to phosphorus atoms with an electronic environment similar to those present in casein. The NMR spectrum of the sample calcined at 400 °C (Figure 6c) consists of a thin signal of low intensity at 3.9 ppm ascribed to the only crystallized phase, $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, observed by XRD (Figure 3d). Two broad signals are detected at 0.5 and -8.2 ppm; they exhibit the decomposition of casein into amorphous organic molecules. For higher temperatures, from 500 to 750 °C, signals are better resolved which shows a progressive organization within the sample. The fine and intense signal at 3.8 ppm in these spectra corresponds to the $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ phase revealed by XRD (Figure 3d-g). Three signals located at -5.4, -7.0, and -10.2 ppm are also present in the NMR spectrum of the sample calcined at 600 °C. They correspond to three different phosphorus crystallographic sites of the $\gamma\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ phase which were observed at -6.2, -7.1 and -10.4 ppm in the NMR spectrum of the sample calcined at 500 °C.⁵⁵ This result is consistent with the higher crystallization of the $\gamma\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ phase observed in the XRD pattern at 600 °C compared to that at 500 °C (Figure 3e-f). The polymorphic transformation of $\gamma\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ phase to $\alpha\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ one at 750 °C explains the shift to -16.0, -19.0 and -21.2 ppm of the three signals

previously assigned in the spectrum at 600 °C. The relative area of 1: 1: 1 of these three signals observed at 750 °C is in agreement with the study carried out by Jarbouï *et al.* (2008).⁵⁶

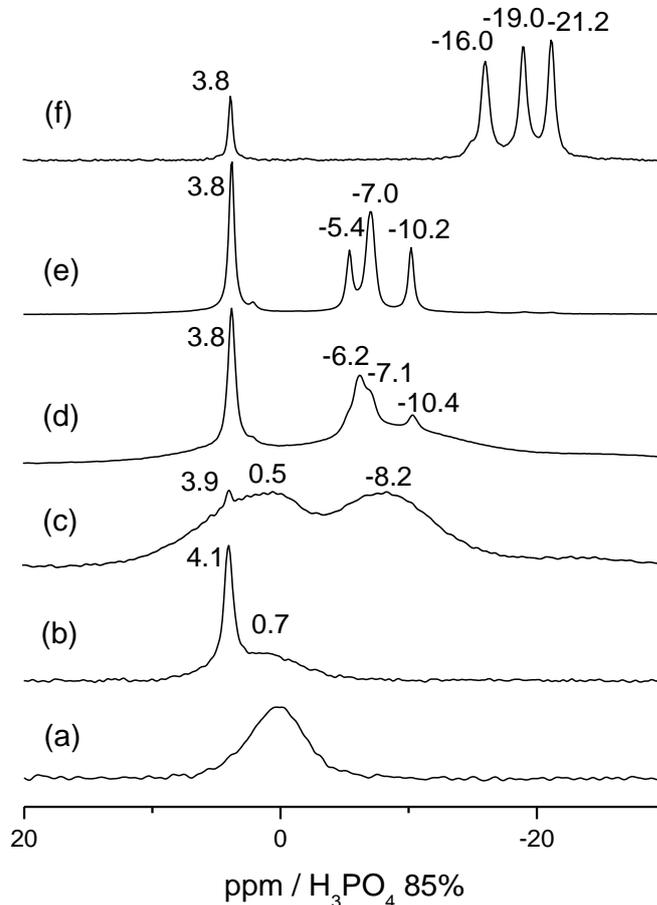


Figure 6. Solid-state ^{31}P -MAS NMR spectra of (a) casein powder; (b) sample A; (c) sample A-400; (d) sample A-500; (e) sample A-600 and (f) sample A-750.

3.4. Scanning electron microscopy

Sample A (Figure 7b) consists of large irregular particles with undefined shape and rough surface, which is comparable to the casein morphology (Figure 7a). Some spheres of around 20 μm in diameter are attached to the surface : they could be attributed to the crystallized hopeite phase. SEM micrographs of the sample calcined at 400 °C (Figure 7c) reveal the disappearance of the large irregular particles for large spheres of size diameter from 200 to 250 μm . This could be due to the melting of casein (~ 280 °C) followed by its decomposition, as it was observed by thermogravimetric analyses. However, the small spheres (~ 20 μm in diameter) observed in sample A are still present after calcination at 400 °C, which suggests

that they correspond to the $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ phase at this temperature. The formation of a macroporosity is evident from 500 °C (Figure 7d–f, 8). These results show that the macroporosity is formed during the casein decomposition and the assembly of particles. The macropores of sample calcined at 750 °C (Figure 8c–d) present heterogeneous diameter sizes in the range of 350 to 1000 nm (measured on the SEM images). Such values are higher than the average size diameter of spherical casein micelles and suggest that casein is not uniformly organized in well defined micelles in the synthesis mixture. Figure 8 suggests rather a macroscopic phase separation as already observed for casein/low molecular weight poly(ethylene oxide)⁵⁷ and casein/xanthan⁵⁸ mixtures. During the hydrothermal treatment, a gel-like structure trapping crystals of hopeite is probably formed. Casein rich-phases structure the macroporosity during the crystallization from 500 to 750 °C of a mixture of γ - and α - $\text{Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ phases identified by XRD.

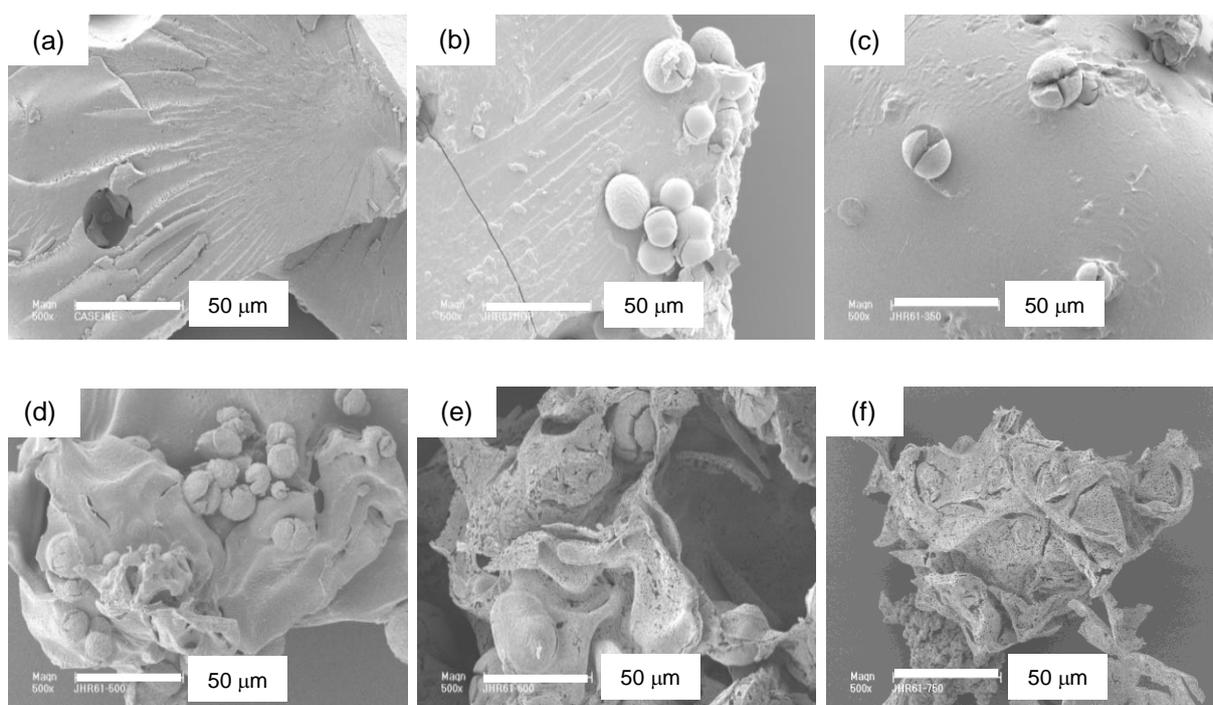


Figure 7. SEM micrographs of (a) casein powder; (b) sample A; (c) sample A-400; (d) sample A-500; (e) sample A-600; (f) sample A-750.

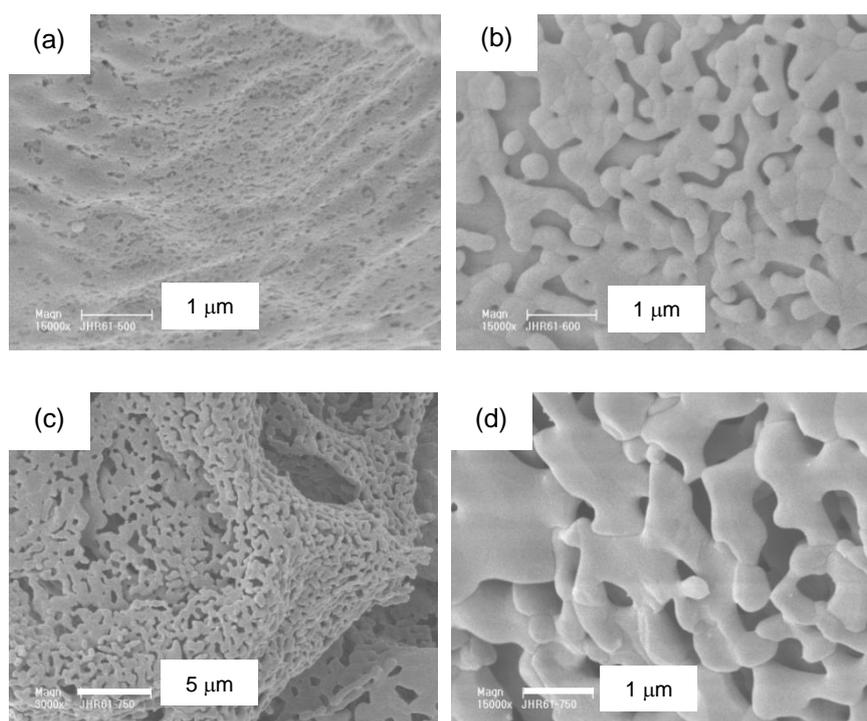


Figure 8. SEM micrographs of (a) sample A-500; (b) sample A-600; (c and d) sample A-750.

3.5. N_2 adsorption

On the other hand, the existence of micro and mesopores in samples calcined from 500 to 750 °C was investigated by N_2 adsorption measurements. The analysis indicates that samples have low specific surface area (S_{BET}) (for the samples A-500 and A-600, $S_{BET} \approx 4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; and for sample A-750, $S_{BET} \approx 1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). N_2 adsorption-desorption isotherms (data not shown) are of type III, which is typical of materials without micro- and mesopores.

3.6. Stability of macroporous zinc phosphates in water

The stability in water of sample A-750 ($\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2 + \alpha\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$) at room temperature was evaluated. The analysis realized by XRD and SEM (Figure SI) on the sample before and after contact with water revealed no difference in nature of the crystalline phases, crystal morphology and macropores size. These results therefore open the way for applications in aqueous medium of the as-synthesized macroporous zinc phosphates.

3.7. Fluorescence of the samples

The fluorescence of solid state casein, sample A and sample A-750, was recorded at room temperature. With the crude casein sample, a broad emission was detected upon excitation at 430 nm, with a maximum at λ_{max} of 487 nm (Figure 9a). This broad emission is still present in sample A with a ~ 20 nm red-shift ($\lambda_{\text{max}} = 505$ nm) but totally absent in sample A-750.

The fluorescence emission of beta-casein is known to fall within the range 335–350 nm in aqueous solutions depending on temperature, pH, ionic strength and others chemicals conditions.⁵⁹

In all likelihood, this green emission which red-shifts in the presence of zinc cations and vanishes upon calcination is probably due to an organic impurity.

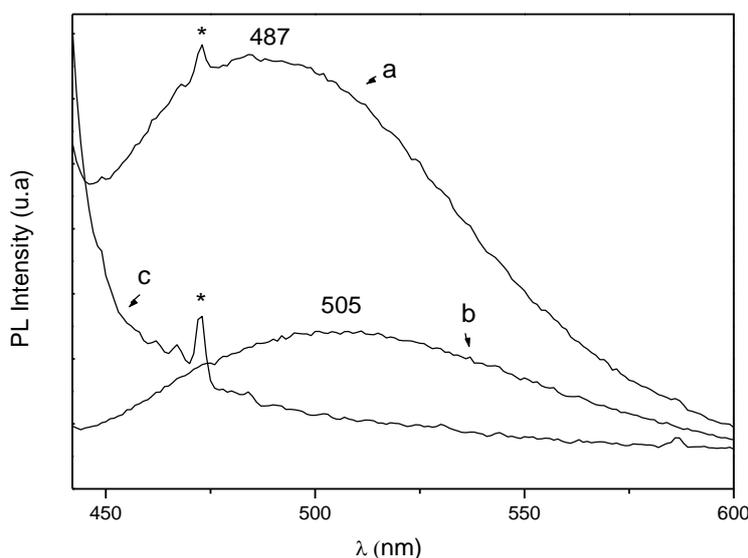


Figure 9. Fluorescence spectra solid-state of (a) casein powder, (b) sample A and (c) sample calcined at 750 °C (sample A-750). $\lambda_{\text{ex}} = 430$ nm. Asterisk (*) : signal due to experimental device.

4. Conclusion

In this work, we have developed a simple and original hydrothermal method for biosourced synthesis of macroporous zinc phosphates by using casein protein as the source of phosphorus in place of the commonly used phosphoric acid and as structure-directing agent. After a hydrothermal treatment at 100 °C, few $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (hopeite) was detected with casein. This last phase was completely removed by calcination at 750 °C. The decomposition

of the protein induces a) liberation of phosphate groups, probably from phosphoserine residues, which interact with zinc in order to form α -Zn₃(PO₄)₂, γ - and α -Zn₂P₂O₇ compounds and, b) generation of a macroporosity observed from 500 °C with pore size estimated between 350 and 1000 nm after calcination at 750 °C. On the other hand, this new and simple synthesis procedure of macroporous zinc phosphates is environmentally-friendly by considering the use of a sustainable/renewable compound (casein) which is not corrosive and by the use of a green solvent (water). In addition, the as-produced porous phosphates exhibit a good stability in water. By taking into account at the same time the stability and the presence of macropores, these materials could be used as support for molecules that are active for water decontamination (enzymes, titanium oxide). They are also promising pigments for the formulation of anticorrosive environmental-friendly coatings because of their macroporosity, which should induce a better mixture with resin, then positively influencing the pigment dissolution.

5. References

- (1) Lin, R.; Ding, Y. *Materials*. 2013, 6, 217–243.
- (2) Whittingham, M. S. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 1996, 1, 227–232.
- (3) Cheng, H.; Ma, J.; Zhao, Z.; Qi, L. *Chem. Mater.* 1995, 7, 663–671.
- (4) Harmon, S. B.; Sevov, S. C. *Chem. Mater.* 1998, 10, 3020–3023.
- (5) Mekhatria, D.; Rigolet, S.; Janiak, C. Simon, A.; Abdelkrim, M.; Bengueddach, A. *Cryst. Growth Des.* 2011, 11, 396–404.
- (6) Garcia, L.A.; Blasco, T.; Pérez, J.; Sastre, E. *Microporous zincophosphates as solid based catalysts. In Studies in Surface Science and Catalysis, Proceedings of the 13th International Zeolite Conference, Montpellier, France, July 8–13; Galarneau, A., Di Renzo F., Fajula, F., Vedrine. J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2001; Vol. 135, p 137.*
- (7) Wallau, M.; Patarin, J.; Widmer, I.; Caultet, P.; Guth, J. L.; Huve, L. *Zeolites*. 1994, 14, 402–410.
- (8) Fleith, S.; Josien, L.; Simon, A.; Gramlich, V.; Patarin J. *Solid State Sciences*, 2002, 4, 135-141.
- (9) Wang, G.-M.; Li, J.-H.; Gao, C.-L.; Zhang, J.-C.; Xiao Zhang, X.; Bao, Z.-Z. ; Wang, Y.-X.; Lin, J.-H. *Solid State Sciences* 2015, 39, 1-5.
- (10) Simon, A. Josien, L ; Gramlich, V.; Patarin J. *Microporous Mesoporous Mater.* 2001, 47, 135-146.
- (11) Neeraj, S.; Nataraj, S.; Rao, C.N.R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 3480-3483.
- (12) Murugavel, R.; Shanmugan, S. *Chem. Commun.* 2007, 1257-1259.
- (13) Gupta, S.K.; Kuppaswamy, S.; Walsh, J.P.S.; McInnes, E.J.L.; Murugavel, R. *Dalton Trans.*, 2015, 44, 5587–5601.
- (14) Murugavel, R.; Kuppaswamy, S.; Boomishankar, R.; Steiner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 33, 5536-5540.

- (15) Kalita, A. Ch., N.; Gogoi, N.; Jangir, R.; Kuppuswamy, S.; Walawalkar, M. G.; Murugavel R. *Inorg. Chem.* 2014, 53, 8959–8969.
- (16) Naderie, R; Attar, M.M. *Dyes Pigm.* 2009, 80, 349-354.
- (17) Hao, Y.; Fuchun, L.; Han, E-H; Anjum, S.; Xu, G. *Corros. Sci.* 2013, 69, 77-86.
- (18) Jaskova, V.; Kalendova, A. *Prog. Org. Coat.* 2012, 75, 328-334.
- (19) Czarnecka, B.; Limanowska-Shaw, H.; Nicholson, J.W. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 2003, 14, 601-604.
- (20) Kauwenbergh, S. J. V. World phosphate rock reserves and resources; International Center for Soil Fertility and Agricultural Development (IFDC) Technical Bulletin No. 75; Muscle Shoals, Alabama, USA, September 2010.
- (21) Jasinsky, S. M. Mineral Commodity Summaries, January 2015. U. S. Geological Survey. http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/phosphate_rock/mcs-2015-phosp.pdf (accessed Nov 15, 2015).
- (22) Qi, C.; Zhu, Y. J.; Zhao, X. Y.; Lu, B.Q.; Tang, Q. L.; Zhao, J.; Chen, F. *Eur. J. Chem.* 2013, 19, 981–987.
- (23) Qi, C.; Zhu, Y. J.; Lu, B.Q.; Zhao, X. Y.; Zhao, J.; Chen, F.; Wu, J. *Eur. J. Chem.* 2013, 19, 5332–5341.
- (24) Qi, C.; Zhu, Y.J.; Chen, F. *Asian J. Chem.* 2013, 8, 88–94.
- (25) Dalglish, D. G. The enzymatic coagulation of milk. In *Developments in Dairy Chemistry*; Elsevier: London, 1982, pp157–187.
- (26) Croguennec, T.; Jeantet, R., Brulé, G. *Fondements physicochimiques de la technologie laitière*, Editions TEC & Doc Lavoisier, 2008, p 84.
- (27) Modler, H. W.; *J. Dairy Sci.* 1985, 68, 2195–2205.
- (28) De Kruif, C.G.; Huppertz, T.; Urban, V.S.; Petukhov, A.V. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2012, 171-172, 36-52.
- (29) Livney, Y.D. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2010, 15, 73-83.
- (30) Farrell Jr, H. M.; Malin, E. L.; Brown, E. M.; Qi, P. X. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2006, 11, 135–147.
- (31) Dalglish, D. G. *Soft Mater.* 2011, 7, 2265–2272.
- (32) Horne, D. S. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2006, 11, 148–153.
- (33) Singh, H., Flynn, A.; Fox, P. F. *J. Dairy Res.* 1989, 56, 235–248.
- (34) Harzer, G.; Kauer, H. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982, 35, 981–987.
- (35) Philippe, M.; Le Graët, Y.; Gaucheron, F. *Food Chem.* 2005, 90, 673–683.
- (36) Bonnet, M.; Cansell, M.; Berkaoui, A. *Food Hydrocolloids.* 2009, 23, 92–101.
- (37) Sugiarto, M.; Ye, A.; Singh, H. *Food Chem.* 2009, 114, 1007–1013.
- (38) Gaucheron, F. *Trends Food Sci. Technol.* 2000, 11, 403–409.
- (39) Gaucheron, F. *Reprod., Nutr., Dev.* 2005, 45, 473–483.
- (40) Kitts, D. D. *Trends Food Sci. Technol.* 2005, 16, 549–554.
- (41) Nelson, L. S.; Holt, C.; Hukins, D. W. L. *Phys. B.* 1989, 158, 103–104.
- (42) Visser, J.; Minihan, A.; Smits, P.; Tjan, S.B.; Heertje, I. *Neth. Milk Dairy J.* 1986, 40, 351–368.
- (43) Mittal, V. A.; Ellis, A.; Ye, A.; Edwards, P. J.; Das, S.; Singh, H. *Food Chem.* 2016, 190, 128–134.
- (44) Gonzales, A.; Thomar, P.; Nicolai, T.; Dittmer, J. *Food Hydrocolloids.* 2015, 51, 88–94.
- (45) Walstra, P. *Int. Dairy J.* 1999, 9, 189–192.

- (46) Srinivas, S.; Prakash, V.; J. Food Biochem. 2011, 35, 1311–1326.
- (47) Pabon, M. L.; Lönnerdal, B. J. Trace Elem. Med. Biol. 2000, 14, 146–153.
- (48) Ghasemi, S.; Abbasi, S. Food Hydrocolloids. 2014, 42, 42–47.
- (49) Phadungath, C. Adv. J. Food Sci. Technol. 2005, 27, 201–212.
- (50) Pouliot, Y.; Boulet, M.; Paquin, P. J. Dairy Res. 1989, 56, 193–199.
- (51) Herschke, L.; Rottstegge, J.; Lieberwirth, I.; Wegner, G. J. Mater. Sci: Mater. Med. 2006, 17, 81–94.
- (52) Purevsuren, B.; Davaajav, Y. J. Therm. Anal. Calorim. 2001, 65, 147–152.
- (53) Sleight, R. W.; Mackinlay, A. G.; Pope, J. M. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 742, 175–183.
- (54) Sato, N. J. Mater. Sci. Lett. 1990, 10, 115–116.
- (55) Bataille, T.; Bénard, P.; Louër, D. J. Solid State. Chem. 1998, 140, 62–70.
- (56) Jarbouni, A.; Rhaeim, A. B.; Hlel, F.; Guidara, K. Ionics. 2010, 16, 67–73.
- (57) Mahmoudi, N.; Stradner, A. J. Phys. Chem. B 2015, 119, 15522–15529.
- (58) Gruijthuisen, K. van; Herle, V.; Tuinier, R.; Schurtenberger, P.; Stradner, A. Soft Matter 2012, 8, 1547–1555.
- (59) Pearce, K. N. Eur. J. Biochem. 1975, 58, 23–29.

Supporting Information

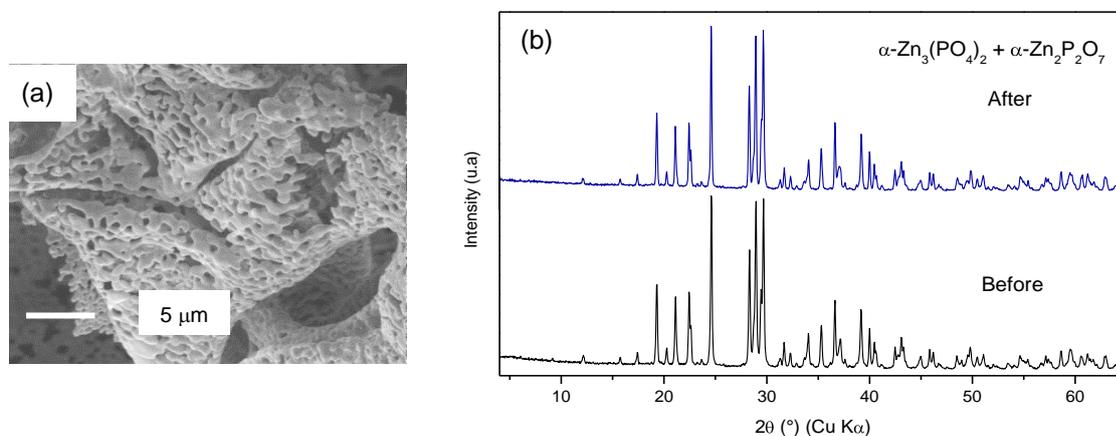


Figure SI (a) SEM micrographs of the sample A-750 after contact with water, (b) XRD patterns of the sample A-750 before and after contact with water (at room temperature for 24 h).

III.4.1-4. Caractérisations complémentaires des solides

Des résultats de caractérisation qui n'ont pas été inclus dans l'article sont présentés dans ce paragraphe. Ils concernent : i) l'influence de la vitesse de montée en température lors de la cristallisation des phases zincophosphates pour une calcination réalisée à 750 °C, ii) le suivi de la cristallisation des zincophosphates au cours de l'étape de calcination, et iii) la caractérisation de la porosité des zincophosphates par porosimétrie au mercure. Ces résultats sont importants pour proposer un mécanisme de synthèse des zincophosphates poreux.

a. Influence de la vitesse de chauffe lors de la calcination sur la cristallisation des phases zincophosphates

La Figure III-13 regroupe les diffractogrammes de rayons X associés aux produits obtenus après calcination du produit brut de synthèse (hopéite/caséine) à 750 °C avec des vitesses de montée en température comprises entre 1 et 8 °C. min⁻¹ (protocole décrit dans la section II.2. du chapitre II). Les résultats n'ont pas révélé un effet notable sur la formation des phases cristallines zincophosphates en fonction de la vitesse de chauffe. Tous les diffractogrammes font apparaître les deux mêmes phases cristallines, α -Zn₂P₂O₇ et α -Zn₃(PO₄)₂, présentes dans des proportions comparables ca. 60 % et 40 % respectivement (observation visuelle). Une différence notable apparaît au niveau de l'intensité des pics de diffraction qui est moins intense dans le cas de la vitesse de 8 °C. min⁻¹. Cette vitesse, trop élevée, ralentit la cristallisation probablement en raison d'une évacuation difficile des produits organiques. Cette hypothèse est en accord avec la couleur observée pour les poudres. En effet, la couleur du produit calciné est blanche pour des vitesses comprises entre 1 et 5 °C. min⁻¹. La vitesse de chauffe est alors suffisamment lente pour permettre une meilleure décomposition et évacuation des produits organiques provenant de la décomposition de la caséine. Ceci n'est pas le cas pour une vitesse de 8 °C. min⁻¹ puisque la couleur du produit calciné est grise.

Tenant compte de ces constatations, nous avons décidé d'utiliser une vitesse de chauffe de 5 °C. min⁻¹, ce qui permet une calcination à 750 °C plus rapide tout en assurant une décomposition et évacuation complètes des produits organiques.

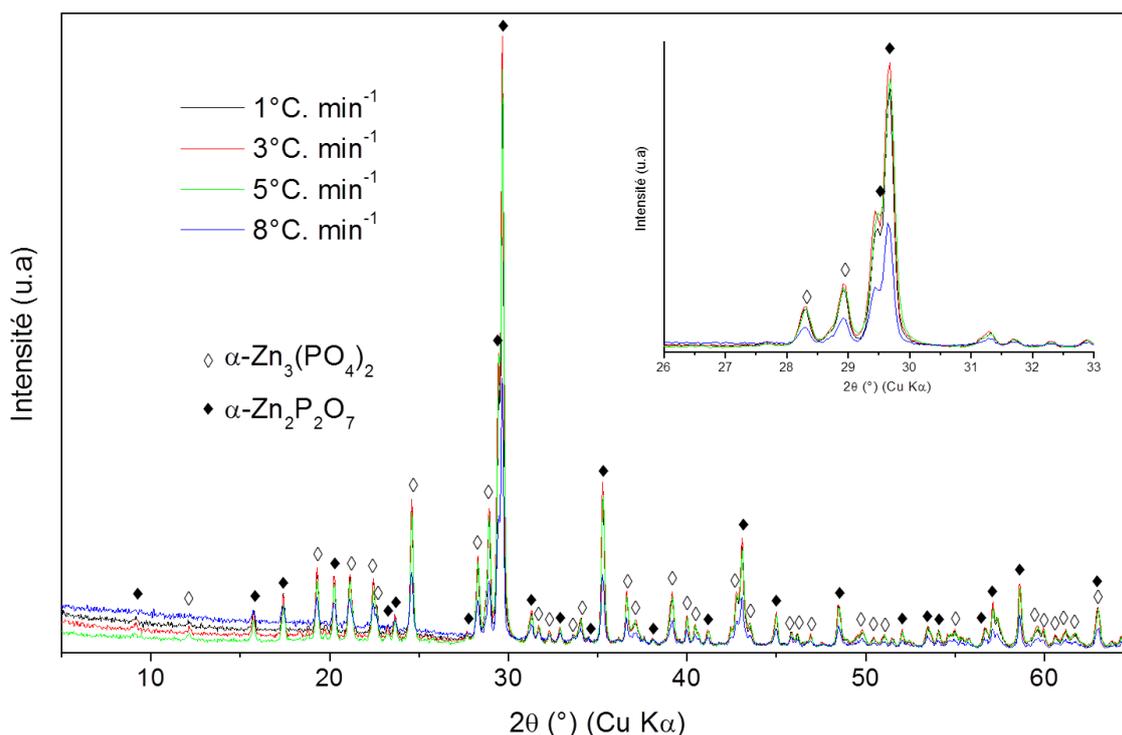


Figure III-13. Comparaison des diffractogrammes de rayons X sur poudre des produits obtenus après calcination à 750 °C du solide hopéite/caséine (brut de synthèse) avec différentes vitesses de montée en température : 1; 3; 5 et 8 °C. min⁻¹.

b. Diffraction de rayons X à haute température

Un suivi de la formation *in situ* des phases zincophosphates a été réalisé par DRX à haute température. Des diffractogrammes ont été enregistrés au cours de la montée en température fixée à 5 °C. min⁻¹ et pour des températures comprises entre 300 °C et 700 °C. Avant chaque enregistrement du diffractogramme, l'échantillon a été maintenu 5 h à la température considérée. La Figure III-14 représente l'évolution des différentes phases zincophosphates formées en fonction de la température de palier. Le produit brut de synthèse (hopéite/caséine également nommé échantillon A dans la publication) comportant une phase cristalline, hopéite, s'est amorphisé à 300 °C en raison de la décomposition de la caséine. Entre 400 °C et 700 °C, différentes phases zincophosphates (α -Zn₃(PO₄)₂, γ -Zn₂P₂O₇ et α -Zn₂P₂O₇) se forment. À 700 °C, un solide, composé principalement de deux phases α -Zn₃(PO₄)₂ et α -Zn₂P₂O₇ est obtenu. Ces résultats sont en accord avec des analyses de DRX présentées dans l'article.

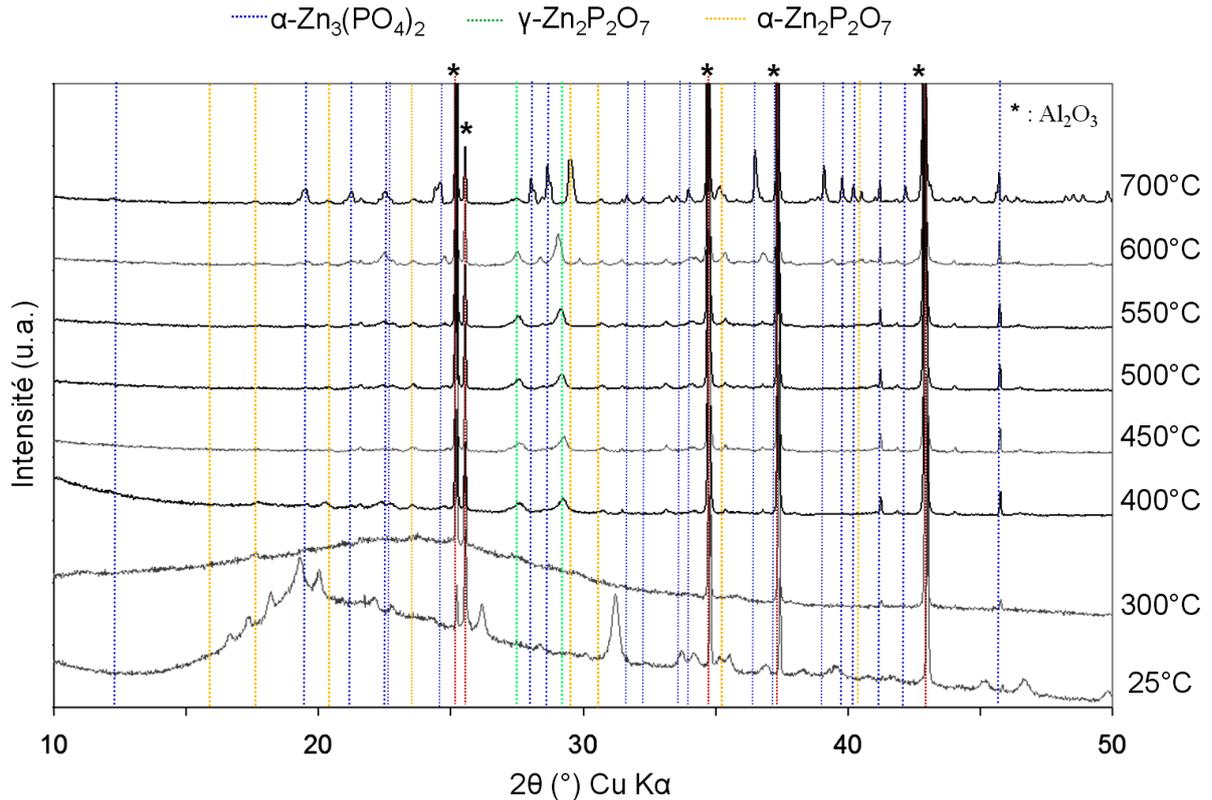


Figure III-14. Évolution des diffractogrammes de rayons X enregistrés consécutivement à différentes températures en partant du solide brut de synthèse hopéite/caséine. Vitesse de chauffe de $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les 5 pics repérés par les lignes rouges et le symbole * correspondent à ceux du support en alumine.

c. Caractérisation de la porosité par porosimétrie au mercure

Des analyses de porosimétrie au mercure ont aussi été réalisées afin de caractériser la macroporosité des solides calcinés. Cette technique apparait plus adéquate pour des échantillons contenant des macropores, c'est-à-dire des pores de taille supérieure à 50 nm, correspondant à des pressions relatives $p/p_0 > 0,98$ [53]. Le zincophosphate qui a été analysé par cette technique est celui calciné à $750\text{ }^\circ\text{C}$ ou nommé aussi échantillon A-750 dans la publication.

Les résultats des analyses (Figure III-15) ont permis d'arriver aux conclusions et hypothèses suivantes :

- La distribution en taille de pores est large (diamètre des pores compris entre ca. $1\text{ }\mu\text{m}$ et $25\text{ }\mu\text{m}$). Rappelons que pour le traitement des données, les pores sont assimilés à des sphères, ce qui n'est pas le cas dans notre matériau.

- Compte-tenu de l'aspect « d'éponge » de notre matériau, les macropores peuvent correspondre :
 - i) À de « petits » macropores associés à la valeur limite de 1 μm et observés dans le matériau (Figure 8 de la publication). La porosimétrie au mercure permettrait par ailleurs d'estimer le diamètre des gros macropores formés dans les « couches » constituées de petits macropores comme il apparaît clairement sur le cliché MEB de la Figure SI-a de la publication,
 - ii) À un écrasement du matériau (pour des faibles pressions) puis au remplissage de macropores du matériau,
 - iii) Au remplissage de la porosité intergrains (pour des faibles pressions) puis des macropores du matériau.

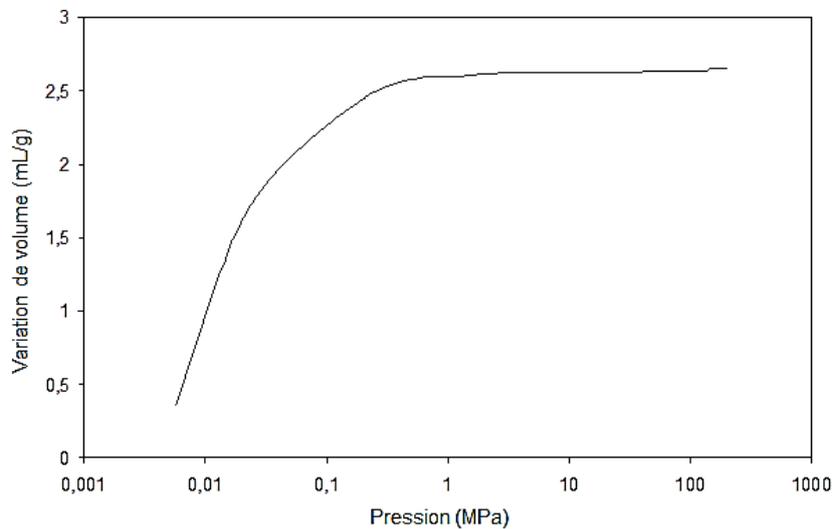


Figure III-15. Résultat de l'analyse de la porosité au mercure effectuée sur le zincophosphate calciné à 750 °C.

III.4.1-5. Étapes du mécanisme de synthèse des zincophosphates

La Figure III-16 reporte les principales étapes du mécanisme de synthèse des zincophosphates macroporeux. Le cadre situé à gauche dans la figure représente les étapes du protocole de synthèse, celui situé à droite associe les principaux processus chimiques. Les différentes étapes du mécanisme proposé sont les suivantes :

- i) Précipitation de la caséine à $\text{pH} = 4,5$ ($\text{pH} \approx \text{pI} \sim 4,6$) suite à la dissolution de la partie minérale de la caséine, dont les phosphates de calcium. Le phosphore inorganique est libéré mais les conditions de synthèse ne permettent pas la cristallisation de phosphate.

ii) Hydrolyse partielle des groupements phosphosérines (-SerP-) de la caséine lors du traitement hydrothermal à 100 °C. Cela permet la libération du phosphore organique. Les ions Zn^{2+} avec les groupements phosphate en solution réagissent pour former l'hopéite ($Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4 H_2O$) à 100 °C.

iii) La calcination à 750 °C permet l'élimination de la matière organique (composée, selon la température, de caséine et d'autres produits organiques dérivés d'elle) et la libération du P organique restant des groupements (-SerP-) pour la cristallisation des phases zincophosphates ($\alpha-Zn_3(PO_4)_2 + \alpha-$ et $\gamma-Zn_2P_2O_7$). À 750 °C, seules les phases $\alpha-Zn_3(PO_4)_2 + \alpha-Zn_2P_2O_7$ persistent en formant un solide macroporeux.

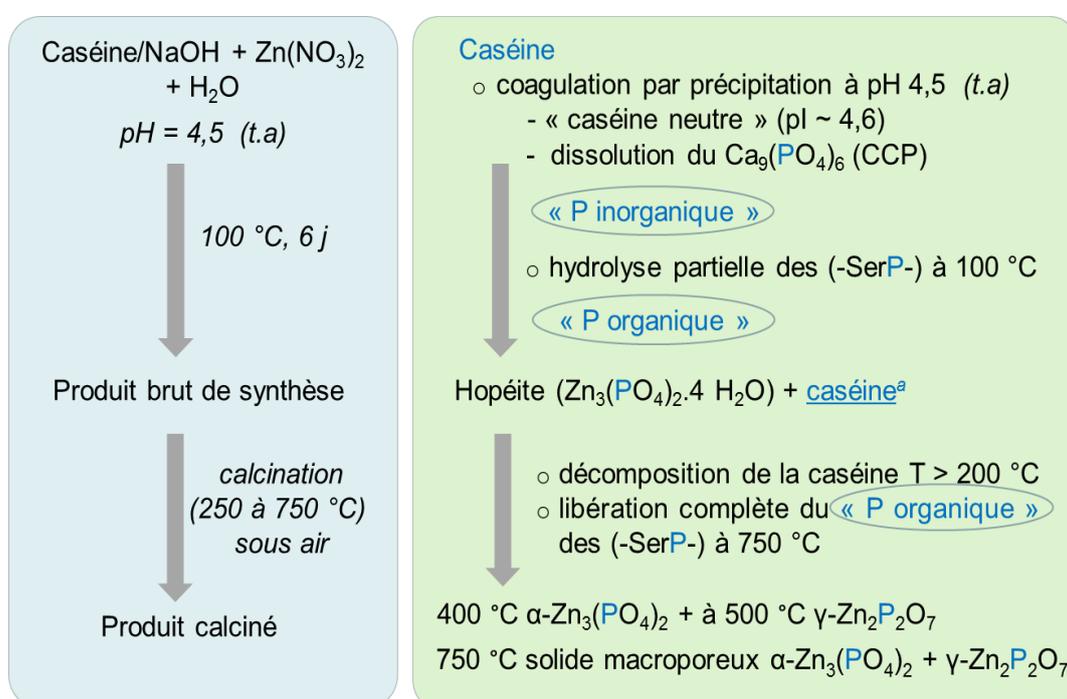


Figure III-16. Principales étapes du mécanisme de synthèse des zincophosphates poreux.

t.a.: température ambiante, ^a : phase majoritaire.

III.4.1-6. Bilan matière du P et du Zn pour la synthèse des zincophosphates macroporeux

Nous avons déterminé les pourcentages de P et de Zn en masse qui ont été consommés lors de la synthèse des zincophosphates macroporeux ($\alpha-Zn_3(PO_4)_2 + \alpha-Zn_2P_2O_7$) par rapport aux quantités initialement engagées de ces éléments. Il est important de mentionner que les calculs ont été faits à partir de ca. 5,0 g de produit brut de synthèse (100 °C) et de ca. 0,3 g de produit calciné récupéré (750 °C), en tenant compte aussi des résultats des analyses

élémentaires effectués par ICP-AES (Tableau III-8). Le Tableau III-9 résume les masses de P et Zn détectées, la caséine et le nitrate de zinc étant respectivement leurs réactifs de départ.

Tableau III-8. Analyses élémentaires (% en masse) du P et Zn des zincophosphates préparés à partir de caséine.

| Échantillon | P (%) | Zn (%) |
|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Produit brut de synthèse | 0,84 ($\pm 0,03$) | 2,41 ($\pm 0,06$) |
| Produit calciné | 15,60 ($\pm 0,54$) | 45,64 ($\pm 1,40$) |
| Caséine (réactif) | 0,71 ($\pm 0,03$) | - |

Les résultats présentés en pourcentage massique (Tableau III-9) montrent que pour la synthèse de zincophosphates macroporeux (produit final obtenu à 750 °C) environ 71,4 % de la quantité de P en masse contenue dans la caséine engagée au départ (gel de synthèse) ont été consommés, ce phosphore étant donc dans le produit final. Par rapport au Zn, 18,4 % de la masse de Zn utilisée initialement a été consommée. La quantité consommée dans ce dernier est notamment inférieure au P car à la base nous avons utilisé un rapport molaire élevé Zn/P = 5,3 dans le milieu réactionnel (gel) pour favoriser la consommation du P.

Par ailleurs, les rapports molaires Zn/P du produit brut de synthèse et du calciné sont très proches. Cela confirme qu'après la calcination du produit brut de synthèse, tout le P contenu dans la caséine éliminée (84,6 % en masse) a été utilisé pour l'obtention des zincophosphates macroporeux.

Tableau III-9. Quantités en masse de P et de Zn des zincophosphates préparés par rapport au gel de synthèse utilisés. Température de synthèse et de calcination 100 °C et 750 °C, respectivement.

| | Caséine (g) | P ^a (g) | Zn (g) | Zn/P* | P ^a (%) | Zn (%) |
|--------------------------|------------------|--------------------|--------|-------|--------------------|-------------|
| Départ (gel) | 9,5 | 0,07 | 0,76 | 5,3 | 100 | 100 |
| Produit brut de synthèse | 4,2 ^b | 0,04 | 0,12 | 1,4 | 57,1 | 15,8 |
| Produit calciné | 0 | 0,05 | 0,14 | 1,3 | 71,4 | 18,4 |

Incertitude sur les pesées : 0,02%.

^a : P issus de la caséine (caséine = 0,71 % de P en masse). *: rapport molaire.

^b : calculé par ATG, teneur organique de 84,6 % (sample A dans la publication).

III.5. Synthèse d'aluminophosphates

De manière similaire aux zincophosphates, les aluminophosphates (micro)poreux sont classiquement synthétisés à partir de sources inorganiques de phosphore. La plupart des auteurs mentionnent l'utilisation de l'acide orthophosphorique H_3PO_4 85% comme source principale de phosphore, et de différents composants organiques tels que les amines (éthylènediamine, pipérazine, di-(*i*-propyl)amine, etc.) comme agent directeur de structure [54-57].

Ces dernières années, l'introduction dans le milieu de synthèse de molécules d'origine biologique comme template a permis la formation d'aluminophosphates mésoporeux (à partir de cellules de levure [58]), d'un silicoaluminophosphate (SAPO-11) présentant une porosité hiérarchisée à partir de glucose [59] et d'aluminophosphates à porosité hiérarchisée (AIPO-5, AIPO-11) à partir de glucose [60].

À ce jour, à notre connaissance, des études sur la synthèse biosourcée d'aluminophosphates à partir de caséine ne sont pas reportées dans la littérature. Par ailleurs, très peu de travaux parlent de la capacité que possède la caséine à former des complexes avec les ions Al^{3+} . Par exemple, Malik et Muzaffaruddin (1965) [61] font mention de la formation de liaisons Al^{3+} -caséine entre pH 4,5 et 6,5 grâce aux groupements carboxyles de la caséine. Il semblerait que la formation des liaisons avec la caséine apparaisse plus favorable avec les ions métalliques divalents (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , ...) qu'avec les trivalents (notamment Fe^{3+}). Dans le premier cas, la formation d'associations entre les ions métalliques divalents et la caséine est souvent attribuée aux interactions électrostatiques, tandis que dans le deuxième cas, il se forme plutôt des liaisons de coordination avec les atomes d'oxygène des groupements phosphosérine, asparyl et glutamyl de la caséine [47, 62-64].

Parmi les ions métalliques trivalents, les ions Fe^{3+} ont montré avoir une bonne affinité pour former des complexes avec la caséine. D'après l'étude reportée par Hegenauer *et al.* (1979) [65] chaque ion Fe^{3+} est lié à deux groupes phosphosérine de la caséine Fe^{3+} (SerP-SerP) en formant de fortes liaisons chimiques, d'intérêt principalement dans le domaine alimentaire.

Dans ce contexte et sachant que les (silico)aluminophosphates poreux peuvent être intéressants pour des applications en séparation et catalyse, nous avons réalisé quelques essais de synthèse d'aluminophosphates poreux à partir de caséine en suivant le mode opératoire décrit dans la section II.2.

III.5.1. Influence des paramètres de synthèse

Nous avons étudié l'influence de la quantité d'aluminium, du pH et de la température de synthèse sur la cristallisation de phases aluminophosphates. Nous avons essayé de garder les rapports molaires du mélange réactionnel utilisé pour la synthèse de zincophosphates afin d'évaluer l'effet de la nature de l'ion Al^{3+} . Les synthèses ont été réalisées avec un milieu réactionnel de composition molaire $0,5 Al_2O_3 : 0,094 P_2O_5 : x Na_2O : 1090 H_2O$ présentant un rapport molaire Al/P = 5,3. Toutefois, dans certaines expériences, il a été nécessaire de faire varier ce dernier.

Une éventuelle cristallisation de phases aluminophosphates a été aussi étudiée dans le cadre d'une calcination des produits bruts de synthèse à 750 °C (une vitesse de chauffe de 5 °C. min⁻¹) sachant que c'est dans ces conditions que la cristallisation des zincophosphates synthétisés à partir de caséine était la meilleure.

III.5.1-1. Influence du pH par variation de la quantité de soude

Le pH du mélange réactionnel préparé à partir d'une solution basique de caséine et d'une solution d' Al^{3+} 0,35 M a été modifié en faisant varier la concentration en soude de la solution aqueuse : 3×10^{-3} M, 0,01 M, 0,10 M et 0,50 M. Les conditions de synthèse et un résumé des résultats des analyses de DRX effectuées sur les produits bruts de synthèse et calcinés à 750 °C sont reportés dans le Tableau III-10. La valeur du pH a été choisie de façon à ce qu'à ce pH l'aluminium soit soluble (Figure III-17). Notons que pour des compositions molaires avec un nombre de moles de NaOH similaires à celui utilisé dans la synthèse des zincophosphates (Tableau III-7) les valeurs de pH des mélanges préparés ici sont plus acides. Cela est associé au pH plus acide de la solution $Al(NO_3)_3$ 0,35 M (pH = 3,0) comparée à celle de $Zn(NO_3)_2$ 0,35 M (pH = 4,5). Il est aussi important de signaler que de façon similaire aux zincophosphates, les valeurs de pH des milieux réactionnels avant (ici indiqués) et après le traitement hydrothermal n'ont pas eu de différences remarquables pour des mesures faites avec des bandelettes de papier pH.

Les diffractogrammes représentatifs des différentes phases obtenues (Tableau III-10) sont visibles sur la Figure III-18. Aucune phase phosphate n'a été identifiée dans les produits bruts de synthèse (Figure III-18(a)). Une phase amorphe attribuée à la caséine pour des $pH \leq 4,5$ (échantillons G, H et I), et une phase boehmite ($AlO(OH)$, PDF n°00-005-0190) à $pH = 13$ (échantillon J) sont mis en évidence. Les résultats s'expliquent par le fait qu'en dessous de $pH = 4,5$, la caséine précipite et les ions Al^{3+} ne sont probablement pas retenus par la caséine de

charge globale positive, ce qui n'est pas favorable à la formation d'aluminophosphate mais plutôt à la formation de la boehmite $\text{AlO}(\text{OH})$. À pH basique, les ions Al^{3+} ont tendance à former les espèces $\text{Al}(\text{OH})_3$ et AlO_2^- (Figure III-17). Une comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour les synthèses de zincophosphates à pH 4,5 (Tableau III-7) révèle que les ions Al^{3+} présents en solution ne sont pas très réactifs pour la formation de liaisons avec les groupes phosphates provenant de la caséine à pI $\sim 4,6$ contrairement à ce qui a été observé avec les ions Zn^{2+} .

Tableau III-10. Résultats des analyses de DRX effectuées sur les produits bruts de synthèse et calcinés obtenus en faisant varier le pH du mélange réactionnel en modifiant la quantité de soude (NaOH). Température de synthèse : 100 °C, durée : 6 jours.

| 0,5 Al_2O_3 : 0,094 P_2O_5 : (0,027–4,23) Na_2O : 1090 H_2O | | | | |
|---|-----------------|-----------------------|-------------------------------------|--|
| Échantillon | pH ^a | Na_2O | Produit brut de synthèse | Produit calciné (750 °C) |
| G | 3,5 | 0,027 | amorphe (caséine) | amorphe |
| H | 3,5 | 0,08 | “ | “ |
| I | 4,5 | 0,82 | “ | $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ + p.n.i. ^b |
| J | 13,0 | 4,23 | boehmite $\text{AlO}(\text{OH})$ | $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ |

^a : précision de pH (± 0.5) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

— : phase majoritaire. ^b: traces. p.n.i. : pic(s) non identifié(s).

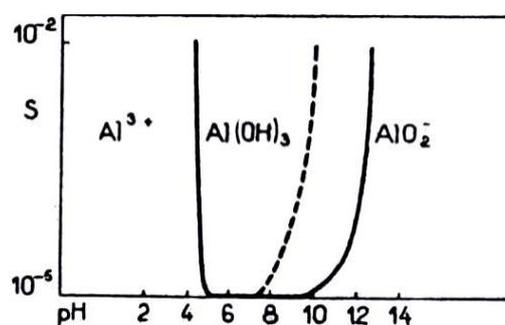


Figure III-17. Solubilité apparente de l'hydroxyde d'aluminium en fonction du pH (10^{-2} M) à température ambiante [66].

Les diffractogrammes enregistrés sur les produits calcinés (Figure III-18(b)) montrent que pour un pH de 3,5 (échantillons H et G), la calcination ne provoque pas de cristallisation. Par

contre, une alumine de transition, γ - Al_2O_3 (PDF n°00-010-0425 et 00-048-0367), est identifiée pour les échantillons I, J après calcination à 750 °C. Ce polymorphe de l'alumine se forme par traitement thermique de la boehmite (oxyhydroxyde d'aluminium) sous air entre environ 450°C et 780°C [67]. Des traces de phase(s) cristalline(s) non identifiée(s) ont été aussi mises en évidence dans l'échantillon I calciné.

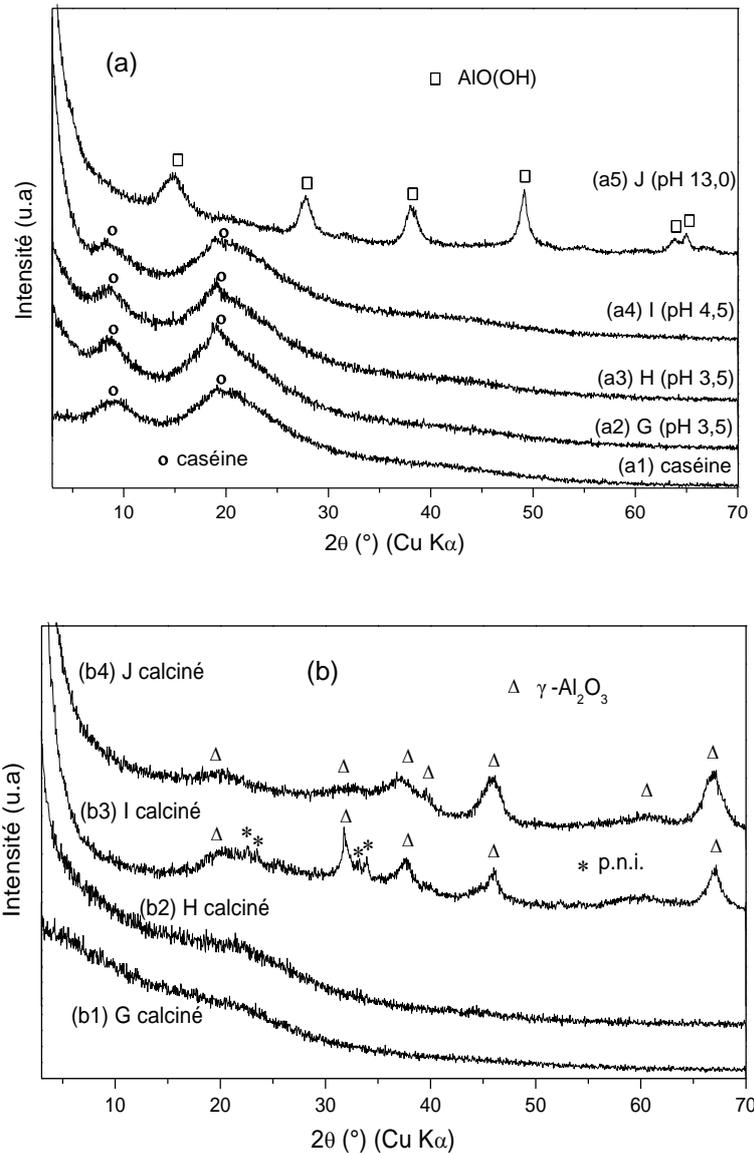


Figure III-18. Diffractogrammes de rayons X associés aux solides obtenus en faisant varier le pH du milieu réactionnel de composition 0,5 Al_2O_3 : 0,094 P_2O_5 : (0,027–4,23) Na_2O : 1090 H_2O : (a) bruts de synthèse (a1) caséine (référence), (a2) échantillon G (pH = 3,5), (a3) échantillon H (pH = 3,5), (a4) échantillon I (pH = 4,5) et (a5) échantillon J (pH = 13,0); (b) produits calcinés à 750 °C (b1) échantillon G (pH 3,5), (b3) échantillon H (pH = 3,5), (b4) échantillon I (pH = 4,5) et (b5) échantillon J (pH = 13,0). p.n.i. : pics non identifiés.

Le pic très large observé autour de $23,0^\circ$ (2θ) sur les diffractogrammes des échantillons G et H calcinés indique la présence de matière amorphe carbonisée [68], laquelle a été aussi confirmée par la couleur marron foncée des poudres.

En tenant compte des résultats de DRX obtenus avec l'échantillon I (préparé à $\text{pH} = 4,5$) pour lequel sont détectées des traces de phase(s) non identifiées après calcination, nous avons décidé de faire varier la quantité d' Al^{3+} introduit dans la synthèse dans le but de favoriser la formation de (la) ou (des) phase(s) non identifiée(s).

III.5.1-2. Influence de la variation de la quantité d'aluminium

La quantité d'aluminium présente dans le milieu réactionnel de la synthèse I (Tableau III-11) a été augmentée grâce à l'utilisation de solutions plus concentrées en aluminium (0,35 M; 0,50 M; 0,75 M), la suspension de caséine ayant été préparée avec une solution de NaOH 1 M ($\text{pH}_{\text{NaOH}} = 14,0$). La composition molaire des milieux réactionnels ainsi que les résultats des analyses DRX effectuées sur les produits bruts de synthèse et calcinés à 750°C sont reportés dans le Tableau III-11(i).

Les produits bruts de synthèse comportent uniquement une phase amorphe correspondant à de la caséine. D'autre part, les produits calcinés, dont les diffractogrammes sont reportés sur la Figure III-19, montrent une évolution en fonction de la quantité d'aluminium : plus la proportion d'Al augmente, moins de phase $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ se forme. Par ailleurs, quelques pics de très faible intensité non identifiés disparaissent également. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que l'utilisation de solutions plus concentrées en Al^{3+} conduit à une augmentation de l'acidité du milieu réactionnel (Tableau III-11(i)) ce qui réduit la possibilité de former des liaisons Al^{3+} -caséine et donc la cristallisation de phases aluminophosphates.

Dans un second temps, nous avons abaissé la quantité d'aluminium. Pour cela, nous avons utilisé des solutions aqueuses d'aluminium moins concentrées (10^{-3} M; $6,8 \times 10^{-3}$ M; $13,7 \times 10^{-3}$ M; $20,5 \times 10^{-3}$ M); la suspension de caséine ayant été obtenue avec une solution NaOH 0,01 M moins basique à $\text{pH}_{\text{NaOH}} = 11,0$ pour obtenir des mélanges réactionnels où l'Al soit soluble, en tenant compte du fait que les solutions d' $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ sont à plus basses concentrations et moins acides ($\text{pH} = 4,0\text{--}4,5$) que celles utilisées au-dessus. Les résultats des analyses de DRX sont reportés dans le Tableau III-11(ii)). Tous les produits bruts de synthèse sont amorphes (caséine). Par contre tous les échantillons calcinés à 750°C sont bien cristallisés et constitués d'un mélange d' AlPO_4 de structures tridymite et cristobalite dans des proportions différentes (Figure III-20).

À partir de ces résultats, nous estimons que les meilleures conditions de pH pour obtenir la synthèse d'aluminophosphates après traitement hydrothermal à 100 °C durant 6 jours sont comprises entre 4,5 et 5,0. La cristallisation d' $\text{Al}(\text{PO}_4)$ se fait durant la calcination à 750 °C si le rapport molaire Al/P est compris entre environ 0,02 et 0,6.

Tableau III-11. Résultats des analyses de DRX des produits bruts de synthèse et calcinés obtenus par variation de la quantité d'Al. Température de synthèse : 100 °C, durée : 6 jours.

| (i) (0,5–1,1) Al_2O_3 : 0,094 P_2O_5 : 0,82 Na_2O : 1090 H_2O | | | | | |
|--|---------------------------------------|-------|-----------------|--------------------------|---|
| Échantillon | Al_2O_3 | Al/P* | pH ^a | Produit brut de synthèse | Produit calciné (750 °C) |
| I | 0,5 | 5,3 | 4,5 | amorphe (caséine) | $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ + p.n.i. ^c |
| I-1 | 0,7 | 7,4 | 4,0 | “ | $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ + p.n.i. ^c |
| I-2 | 1,1 | 11,7 | 3,5 | “ | $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ^b + p.n.i. ^c |
| (ii) (0,002–0,059) Al_2O_3 : 0,094 P_2O_5 : 0,08 Na_2O : 1090 H_2O | | | | | |
| Échantillon | Al_2O_3 (10^{-3}) | Al/P* | pH ^a | Produit brut de synthèse | Produit calciné (750 °C) |
| K | 2 | 0,02 | 5,0 | amorphe (caséine) | $\text{Al}(\text{PO}_4)$ cristobalite + tridymite ^b |
| L | 19 | 0,2 | 5,0 | “ | “ |
| M | 39 | 0,4 | 4,5 | “ | $\text{Al}(\text{PO}_4)$ tridymite + cristobalite ^b |
| N | 59 | 0,6 | 4,5 | “ | $\text{Al}(\text{PO}_4)$ tridymite + cristobalite |

^a : précision de pH ($\pm 0,5$) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

— : phase majoritaire. ^b : traces. *: rapport molaire. p.n.i. : pic(s) non identifié(s).

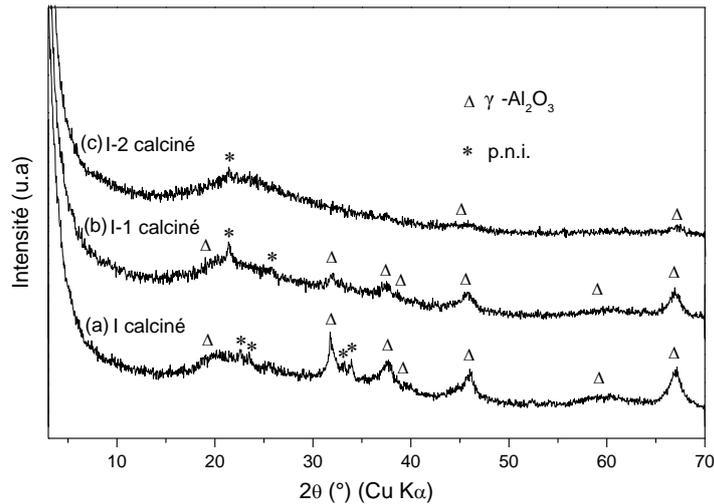


Figure III-19. Diffractogrammes de rayons X des solides calcinés (750 °C) préparés à partir de milieux réactionnels comportant beaucoup d'aluminium (Tableau III-11(i)): (a) échantillon I calciné (pH 4,5, Al/P = 5,3), (b) échantillon I-1 calciné (pH = 4,0, Al/P = 7,4) et (c) échantillon I-2 calciné (pH = 3,5, Al/P = 11,7). p.n.i. : pics non identifiés.

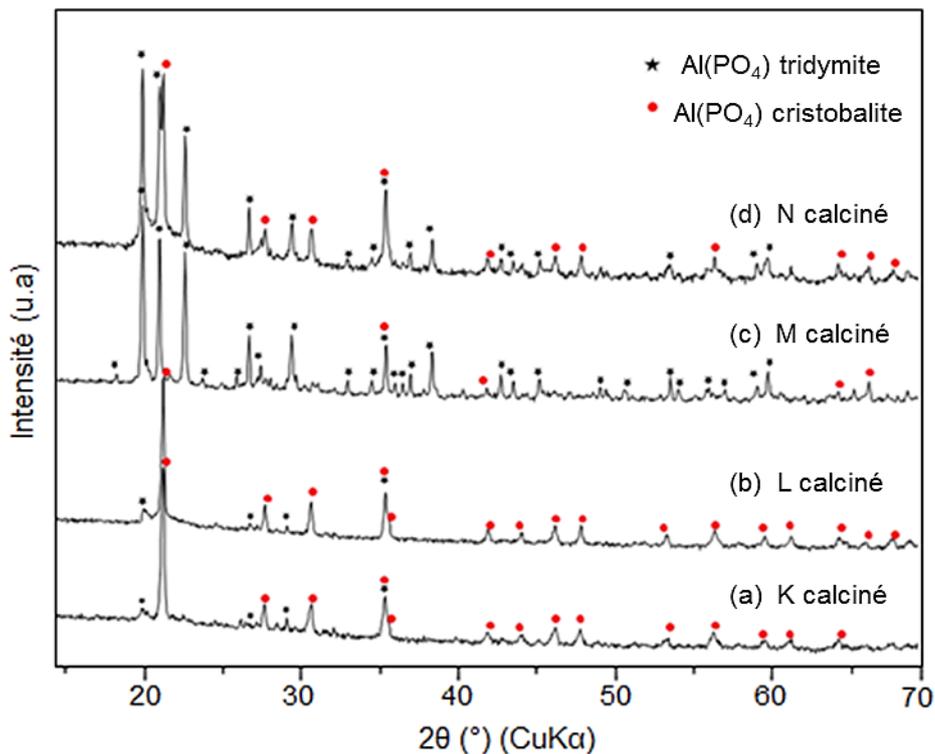


Figure III-20. Diffractogrammes de rayons X des solides calcinés (750 °C) préparés à partir de milieux réactionnels comportant peu d'aluminium (Tableau III-11(ii)): (a) échantillon K calciné (pH 5,0, Al/P = 0,02), (b) échantillon L calciné (pH = 5,0, Al/P = 0,2), (c) échantillon M calciné (pH = 4,5, Al/P = 0,4) et (d) échantillon N calciné (pH = 4,5, Al/P = 0,6).

III.5.1-3. Influence de la température de synthèse

Quelques essais de synthèse ont été réalisés à différentes températures ($T = 100, 120$ et 150 °C) en utilisant la composition molaire du mélange réactionnel de la synthèse L du Tableau III-11(ii) qui présente une phase $\text{Al}(\text{PO}_4)$ majoritairement de structure cristobalite. Les bruts de synthèse ont été nommés échantillons L-100, L-120 et L-150 respectivement. Les diffractogrammes de rayons X des produits calcinés à 750 °C sont regroupés dans la Figure III-21 et leur analyse par DRX ne révèle pas la présence de phases cristallisées mais de phases amorphes. L'intensité des pics de diffraction attribués à la phase $\text{Al}(\text{PO}_4)$ de structure cristobalite diminue avec l'augmentation de la température de synthèse. Certains pics de plus faible intensité disparaissent même. Ces résultats indiquent un effet de l'augmentation de la température de synthèse sur la perte de la cristallinité de la phase phosphate formée après calcination.

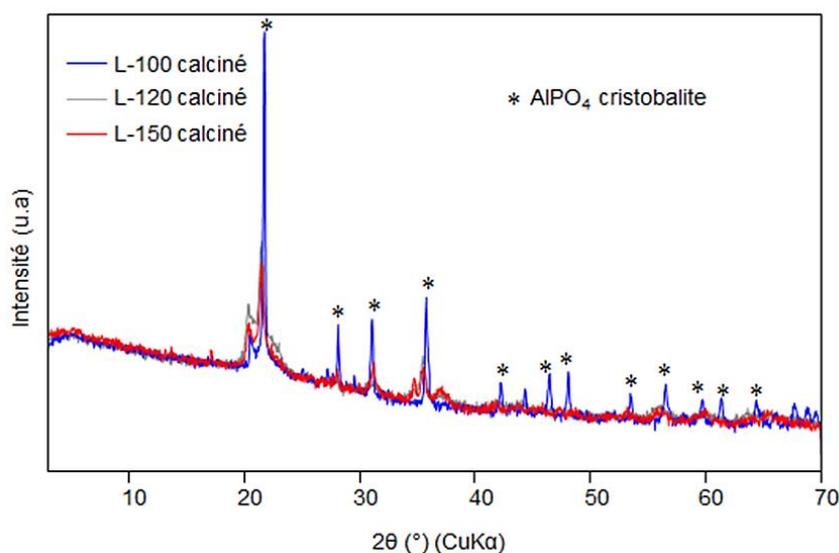


Figure III-21. Diffractogrammes de rayons X des solides calcinés (750 °C) et correspondant à des milieux de synthèse identiques à celui associé à l'échantillon L chauffé à différentes températures durant le traitement hydrothermal : 100 °C (échantillon L-100) (en bleu), 120 °C (échantillon L-120) (en gris) et (b) 150 °C (échantillon L-150) (en rouge).

III.5.2. Caractérisation par microscopie électronique à balayage

Les Figures III-22(a-b) montrent les clichés de microscopie à balayage (MEB) de l'échantillon J (Tableau III-10) contenant de la boehmite $\text{AlO}(\text{OH})$. Cette phase se caractérise par une morphologie de type rose des sables. Cependant elle est en grand partie perdue lors de

sa calcination à 750 °C. Le produit calciné (Figures III-22(c-d)) constitué d'une phase γ - Al_2O_3 se présente sous forme d'agrégats de cristaux sans morphologie définie. D'après ces clichés, les solides ne sont pas macroporeux.

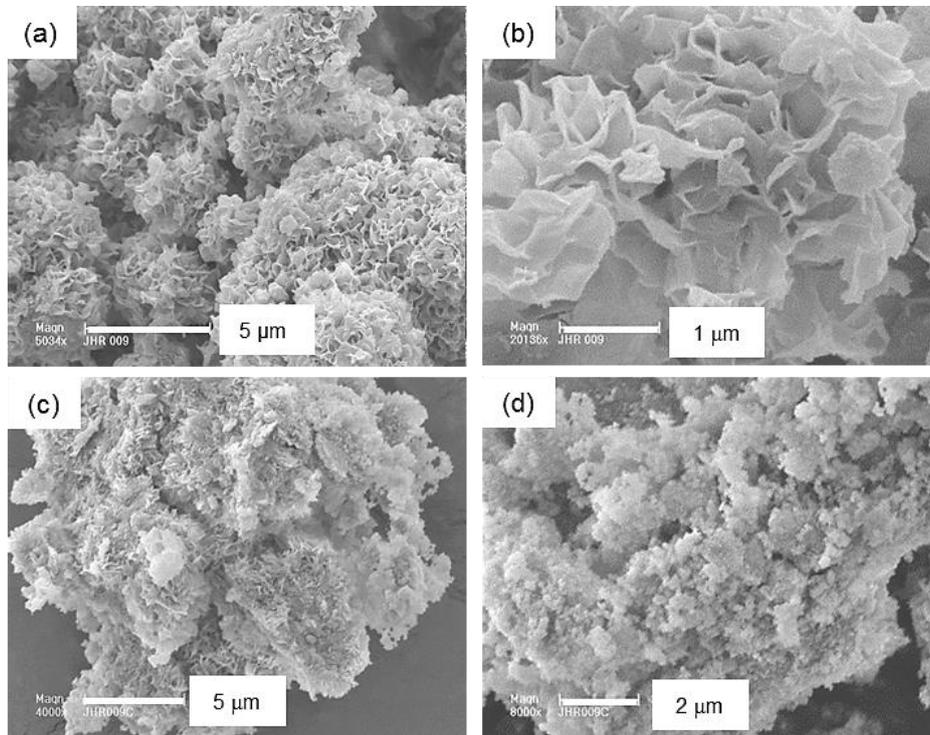


Figure III-22. Clichés de microscopie électronique à balayage de l'échantillon J (Tableau III-10) : (a et b) la phase boehmite $\text{AlO}(\text{OH})$ (forme brute de synthèse) et (c et d) γ - Al_2O_3 (échantillon calciné à 750 °C).

Les clichés des échantillons calcinés préparés à partir de milieux réactionnels de $\text{pH} = 4,5\text{--}5,0$ (Tableau III-11(ii)) sont regroupés dans la Figure III-23. Les solides calcinés composés majoritairement d'une phase $\text{Al}(\text{PO}_4)$ de structure cristobalite (échantillons K et L) présentent une macroporosité irrégulière sur différents endroits des échantillons (Figures III-23(a-d)). Par contre, les solides calcinés composés principalement d'une phase $\text{Al}(\text{PO}_4)$ de structure tridymite (Figures III-23(e-f)) ne présentent pas de macroporosité ni de morphologie bien définie.

Il est intéressant de noter que des volumes creux de forme plus ou moins sphériques sont visibles sur les clichés des Figures III-23(a, d et f). Ils pourraient avoir été générés par les floculats de caséine (Figure III-10 [29]).

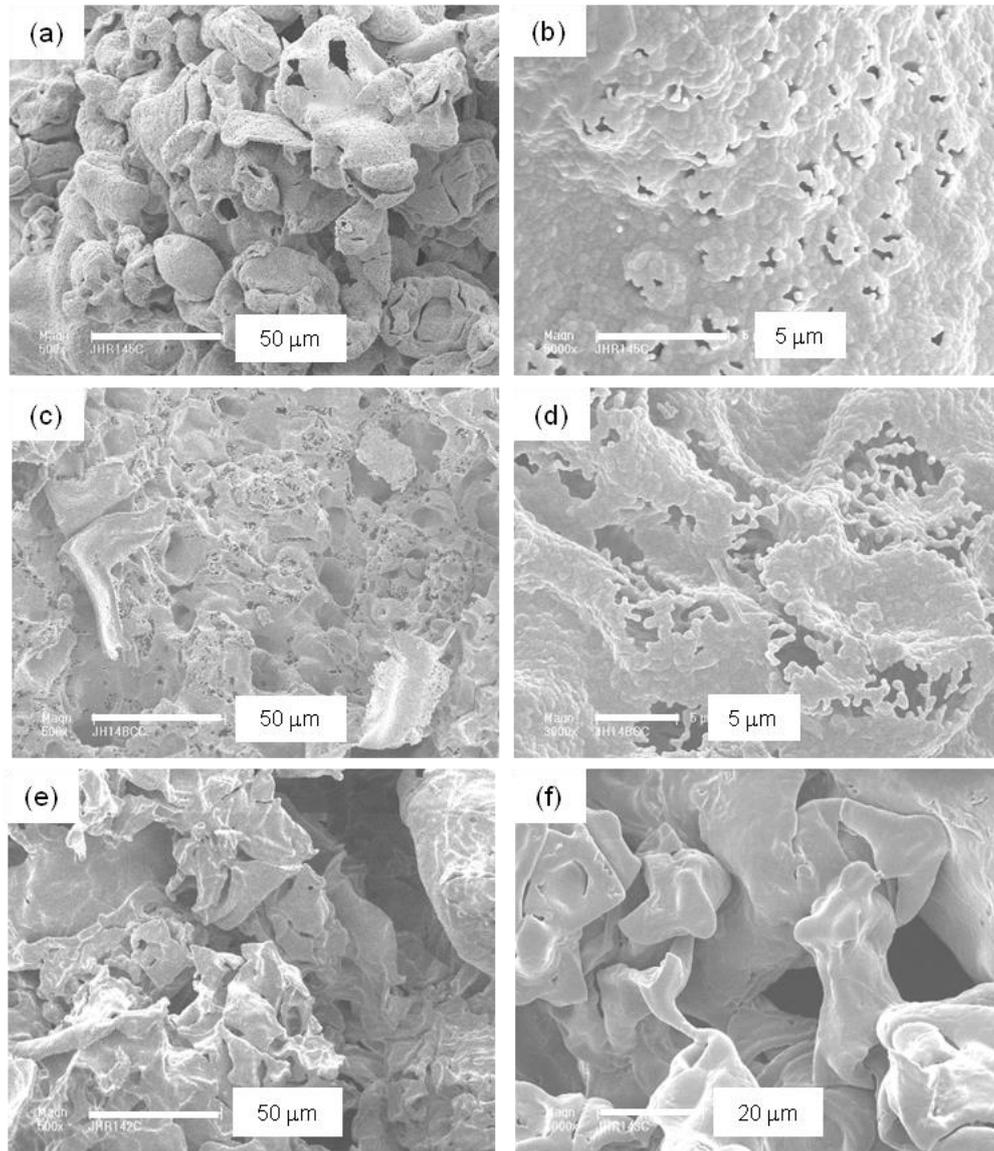


Figure III-23. Clichés de microscopie électronique à balayage des échantillons calcinés à 750 °C (Tableau III-11(ii)) : (a et b) $\text{Al}(\text{PO}_4)$ cristobalite et tridymite (échantillon K), (c et d) $\text{Al}(\text{PO}_4)$ cristobalite et tridymite (échantillon L), (e) $\text{Al}(\text{PO}_4)$ tridymite et cristobalite (échantillon M) et (f) $\text{Al}(\text{PO}_4)$ tridymite et cristobalite (échantillon N).

III.5.3. Caractérisation par analyses thermiques

Les courbes d'analyses thermogravimétrique (ATG) et thermique différentielle (ATD) des produits bruts de synthèse K et M (Tableau III-11(ii)) sont présentées sur la Figure III-24. Les profils des courbes ATG et ATD sont assez similaires à ceux de la caséine comme attendu d'après les résultats de DRX. Trois pertes de masses sont observées : une première en dessous

de 200 °C d'environ 8,0 % associée à un petit pic endothermique qui correspond à la désorption de molécules d'eau physisorbées. Les deuxième et troisième pertes de masse qui représentent 88,3 % se produisent entre 200 °C et 700 °C et sont accompagnées par de larges pics exothermiques observés sur les courbes ATD. Elles correspondent à la décomposition de la caséine et à la carbonisation des résidus organiques contenus dans les échantillons. Finalement, ~ 3,7 % de poudre récupérée correspondent aux phases phosphates identifiées par DRX après calcination à 750 °C (Tableau III-11(ii), Figure III-19).

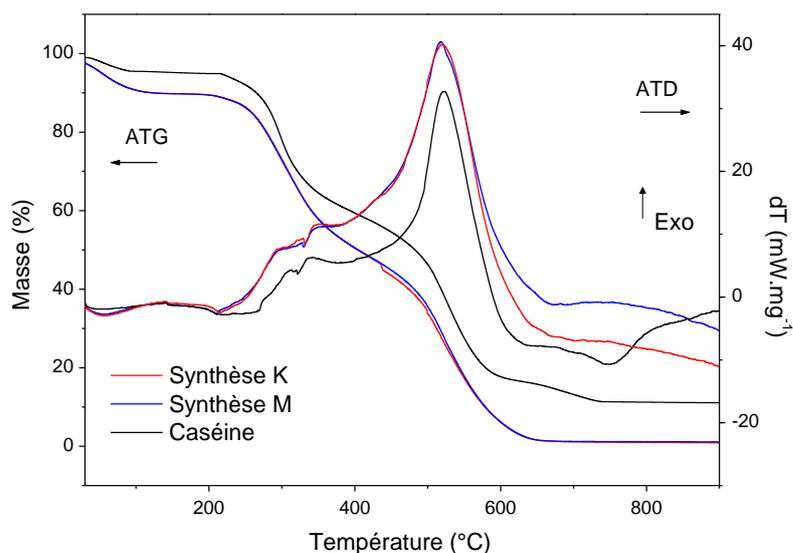


Figure III-24. Courbes d'analyses thermogravimétriques et thermiques différentielles correspondant aux synthèses K et M du Tableau III-11(ii). Mesures effectuées sous air avec une vitesse de chauffage de 5 °C. min⁻¹.

III.5.4. Mesures d'adsorption du diazote (N₂)

Les analyses d'adsorption de N₂ ont confirmé que les phases Al(PO₄) obtenues après calcination à 750 °C (échantillons M et N calcinés du Tableau III-11(ii)) sont des phases denses (structure tridymite ou mélange de tridymite et de cristobalite). L'isotherme d'adsorption-désorption de N₂ enregistrée pour l'échantillon M calciné (Figure III-25) ne révèle pas la présence d'une micro- ou d'une mésoporosité qui aurait pu se former grâce à la présence de la caséine ou de produits de dégradation issus de celle-ci. La très faible adsorption observée à pression relative élevée pourrait correspondre à de la porosité intergrains.

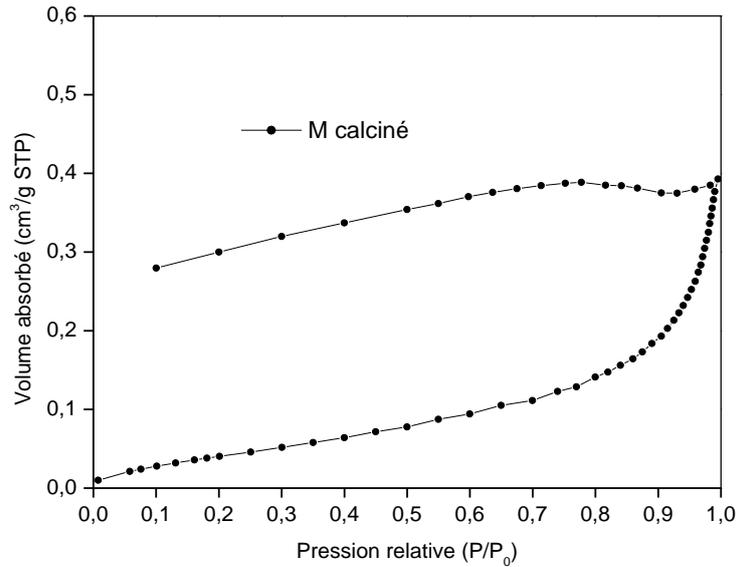


Figure III-25. Isotherme d'adsorption-désorption de N₂ de l'échantillon M calciné.

III.6. Conclusion

La synthèse de métallophosphates poreux a été possible avec la caséine, une protéine du lait de vache non encore utilisée en tant que source de phosphore pour la synthèse de matériaux. Les résultats présentés dans ce chapitre sont relatifs à la synthèse de zinco- et aluminophosphates.

Lors des expériences, nous avons constaté que le pH du milieu réactionnel joue un rôle essentiel pour la synthèse. Des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 5,0 ont rendu possible la synthèse de zinco- et aluminophosphates.

Dans le cas des zincophosphates, la caséine présente un double rôle : elle est source de phosphore et permet la formation d'une macroporosité après son élimination (calcination) du produit brut de synthèse. Concernant les aluminophosphates, la caséine joue seulement le rôle de source de phosphore.

La synthèse hydrothermale de zincophosphates à partir de caséine après chauffage à 100 °C pendant 6 jours a conduit à l'obtention d'un solide non poreux constitué d'une phase cristallisée zincophosphate appelée hopéite et d'une phase, majoritaire, amorphe (caséine). Un autre solide macroporeux composé d'un mélange de zincophosphate α -Zn₃(PO₄)₂ et α -Zn₂P₂O₇ a été obtenu après calcination à 750 °C. Ce matériau présente une structure et une macroporosité stables dans l'eau. Les différentes analyses effectuées sur les matériaux ont permis de proposer les principales étapes d'un mécanisme de synthèse.

D'autre part, des matériaux aluminophosphates $\text{Al}(\text{PO}_4)$ constitués par un mélange de structures tridymite et cristobalite présentes dans des proportions variables ont été obtenus uniquement après calcination à $750\text{ }^\circ\text{C}$ des produits bruts de synthèse. Selon les cas, ils présentent une macroporosité irrégulière. Il semblerait par ailleurs que dans le système aluminophosphates, les ions Al^{3+} ne réagissent pas facilement avec les phosphates de la caséine libérés dans des conditions hydrothermales et à $\text{pH} = 4,5$ contrairement aux ions Zn^{2+} . Cependant, ils resteraient piégés dans la structure de la caséine pour cristalliser sous forme de phosphates lors de la décomposition de la caséine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) <http://www.tecnal.fr/caseine.htm> (consulté le 26/10/2016)
- (2) Évolution et perspectives des utilisations de matières grasses et protéiques d'origine laitière par les industries agro-alimentaires dans l'Union européenne. FranciAgriMer. Ed. 2012. [http://www.franceagrimer.fr/content/download/16508/126234/file/ETU-LAI-2012-MG&MP%20LAITIERES%20DANS%20LES%20IAA%20EUROPEENNES%20 \(rapport\).pdf](http://www.franceagrimer.fr/content/download/16508/126234/file/ETU-LAI-2012-MG&MP%20LAITIERES%20DANS%20LES%20IAA%20EUROPEENNES%20(rapport).pdf) (consulté le 14/09/16).
- (3) Bilan statistique annuel 2015 : les produits carnés, avicoles et laitiers: LAIT. FranciAgriMer, 24 Août 2016. <http://www.franceagrimer.fr/content/download/46913/448715/file/STA-LAIT-Donn%C3%A9es%20statistiques%20Lait%202015.pdf> (consulté le 14/09/16)
- (4) <http://www.insee.fr/fr/bases-de-donnees/bsweb/graph.asp?idbank=001653374> (consulté le 15/09/2016)
- (5) J. Brigando. La Caséine et ses dérivés plastiques. Le Lait, INRA Editions, 1941, 21, p. 25.
- (6) F. Ren, N. Atlasevich, B. Baade, J. Loike, J. Arslanoglu. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 2016, 203–215.
- (7) Casein glues: their Manufacture, Preparation and Application. Forest Products Laboratory, Forest Service U. S. Department of Agriculture. Avril 1961. Site web : <https://www.fpl.fs.fed.us/documnts/fplrn/fplrn158.pdf> (consulté le 16/09/16)
- (8) G. Genin. Les Matières Textiles à base de caséine. Les recherches américaines. Le Lait, INRA Editions, 20, 1940, p.154–158.
- (9) N. Tanaka, S. Takino, I. Utsumi. *J. Pharm. Sci.* 52, 1963, 664–667.
- (10) P. Zimet, D. Rosenberg, Y. D. Livney. *Food Hydrocolloids.* 25, 2011, 1270–1276.
- (11) A. F. Metaxa, E. K. Efthimiadou, G. Kordas. *Colloid Interface Sci. Commun.* 13, 2016, 14–18.
- (12) Y. Lua, K. Parka. *Int. J. Pharm.* 453, 2013, 198–214.
- (13) A. Shapira, Y. G. Assaraf, Y. D. Livney. *Nanomed-Nanotechnol.* 6, 2010, 119–126.
- (14) M. M. Baracat, A. M. Nakagawa, R. Casagrande, S. R. Georgetti, W. A. Verri, O. de Freitas, *AAPS PharmSciTech.* 13, 2012, 364–372.
- (15) W. Yin, R. Su, W. Qi, Z. He. *J. Mater. Sci.* 47, 2012, 2045–2055.
- (16) F. Song, L. M. Zhang, J. F. Shi, N. N. Li. *Colloids Surf., B.* 79, 2010, 142–148.
- (17) F. Song, L. M. Zhang, C. Yang, L. Yan. *Int. J. Pharm.* 373, 2009, 41–47.

- (18) S. Vieira da Silva, R. Sogari Picolotto, R. Wagner, N. Silvia Peireira dos Santos Richards, J. Smanioto Barin. *J. Food Nutr. Res.* 2015, 3, 430–436.
- (19) Encyclopedia of Food and Health, Editor B. Caballero, P. M, Finglas, F. Toldra. Casein and Caseinate: Methods of Manufacture, 26 Aout 2015. Academic Press, 681p.
- (20) Casein products. New Zealand Institute of Chemistry. The Dairy Industry. Site web: <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3E.pdf> (consulté le 20/09/2016).
- (21) V. H. Nielsen. Properties and distribution of casein and non-casein proteins, calcium and phosphorus in skim milk, buttermilk and butterserum from the same whole milk, Iowa State College, 1953, p. 121. <http://lib.dr.iastate.edu/rtd/12432/> (consulté le 20/09 2016)
- (22) G. Genin. La production mondiale de caséine. Le Lait, INRA Editions, 17, 1937, 6605–6608.
- (23) Y. D. Livney. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 2010, 73–83.
- (24) D. G. Dalgleish. *Soft Mater.* 7, 2011, 2265–2272.
- (25) D. S. Horne. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 2006, 148–153.
- (26) G. A. Ramsdell, E. O. Whittier. *J. Biol. Chem.*, 154, 1944, 413–419.
- (27) B. Purevsuren, Y. Davaajav, *J. Therm. Anal. Calorim.* 65, 2001, 147–152.
- (28) Ya. S. Zaikovskii, Khimiya i Fizika moloka i Molochnikh Productov, Moscow, Pische promizdat, 1980, p. 61.
- (29) A. Gonzalez-Jordan, P. Thomar, T. Nicolai, J. Dittmer. *Food Hydrocolloids* 51, 2015, 88–94.
- (30) T. Croguennec, R. Jeantet, G. Brulé. Fondements physicochimiques de la technologie laitière; Editions TEC & Doc Lavoisier, 2008, p. 86.
- (31) E. J. Cohn, J. L. Hendry. *J. Gen. Physiol.* 1923, 521–554.
- (32) Biochimie structurale, Cl. Audigié, F. Zonszain, Doin éditeurs, Rueil-Malmaison, collection Biosciences et Techniques, 2009.
- (33) T. Croguennec, R. Jeantet, G. Brulé. Fondements physicochimiques de la technologie laitière, Editions TEC & Doc Lavoisier, 2008, p. 85.
- (34) D. G. Schmidt. Association of caseins and casein micelle structure. In: Fox PF, editor. Developments in Dairy Chemistry. Barking, UK: Applied Science Publishers, 1982, 61–86.
- (35) P. Walstra, R. Jenness. Dairy chemistry and physics. Wiley, New York, 1984.
- (36) <http://suppversity.blogspot.fr/2012/04/sipping-casein-ate-not-whey-for-maximal.html>
- (37) J. M. Michel, Contribution à l'histoire industrielle des polymères en France, A-4 Caséine SCF http://www.societechimiquedefrance.fr/IMG/pdf/a_4_000_000.vfx2_sav.pdf (consulté le 22/09/2016)
- (38) Y. Liu, R. Guo, *Biophys. Chem.* 136, 2008, 67–73.
- (39) J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2000, 870–874.
- (40) H. Minoux, C. Chipot, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1999, 10366–10372
- (41) F. Gaucheron. *Reprod., Nutr., Dev.* 45, 2005, 473–483.
- (42) H. Meisel, H. B. Andersson, K. Buhl, H. F. Erbersdobler, E. Schlimme. *Z Ernährungswiss.* 20, 1991, 227–232.
- (43) P. J. De Honing, P. J. van Rooijen. *J. Dairy Res.* 49, 1982, 725–736.
- (44) H. F. Erberodobler. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* 35, 1983, 301–311.
- (45) M. Panouille, T. Nicolai, D. Durand. *Int. Dairy J.* 14, 2004, 297–303.

- (46) B. Chu, Z. Zhou, G. Wu, H.M. Fanell. *J. Colloid Interface Sci.* 170, 1995, 102–112.
- (47) M. Philippe, Y. Le Graet, F. Gaucheron. *Food Chem.* 90, 2005, 673–683.
- (48) L. Herschke, J. Rottstegge, I. Lieberwith, G. Wegner. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17, 2006, 81–94.
- (49) L. Herschke, V. Enkelmann, I. Lieberwirth, G. Wegner. *Chem. Eur. J.* 10, 2004, 2795–2803.
- (50) L. A. Garcia, T. Blasco, J. Pérez, E. Sastre Microporous zincophosphates as solid based catalysts. In *Studies in Surface Science and Catalysis, Proceedings of the 13th International Zeolite Conference, Montpellier, France, July 8–13*; Galarneau, A., Di Renzo F., Fajula, F., Vedrine. J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2001; Vol. 135, p. 137.
- (51) G. Charlot. *Théorie et méthode nouvelles d'analyse qualitative*. Masson et Cie éditeurs libraires de l'académie de médecine, 1949, p. 195.
- (52) J. Hinostroza-Ramos, L. Ploux, K. Anselme, L. Balan, A. Simon-Masseron. *Cryst. Growth Des.* 16, 2016, 4897–4904.
- (53) N. Job, Matériaux carbonés poreux de texture contrôlée synthétisés par procédé sol-gel et leur utilisation en catalyse hétérogène, 2005, UNIVERSITÉ DE LIÈGE, Faculté des Sciences appliquées. <http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/92656/1/Thesis-NJob.pdf> (consulté le 29/09/2016)
- (54) H. Lu, J. Xu, P. Gao, W. Yan, F. Deng, R. Xu. *Microporous Mesoporous Mater.* 208, 2015, 105–112.
- (55) Y. Seo; S. Lee; C. Jo; R. Ryoo. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 2013, 8806–8809.
- (56) X. Tong, J. Xu, X. YiLi, W. Yan, J. Yu, F. Deng, H. S. Ruren. *Microporous Mesoporous Mater.* 176, 2013, 112–122.
- (57) B. Zhang, J. Xu, F. Fan, Q. Guo, X. Tong, W. Yan, J. Yu, F. Deng, C. Li, R. Xu. *Microporous Mesoporous Mater.* 147, 2012, 212–222.
- (58) A. B. Sifontes, G. Gonzales, L. M. Tovar, F. J. Mendez, M. E. Gomes, E. Canizales, G. Nino-Vega, H. Villalobos, J. L. Brito. *Mater. Res. Bull.* 48, 2013, 730–738.
- (59) Z. liu, L. Liu, H. Song, C. Wang, W. Xing, S. Komarneni, Z. Yan, *Mater. Lett.* 154, 2015, 116–119.
- (60) X. M. Tang, T. L. Lu, C. Chen, L. P. Zhou, F. Wang, Y. L. Su. *Microporous Mesoporous Mater.* 144, 2011, 176–182.
- (61) W. U. Malik, Muzaffaruddin, *M. Kolloid-Z. u.Z.Polymere.* 206, 1965, 55–60.
- (62) M. Bonnet, M. Cansell, A. Berkaoui. *Food Hydrocolloids.* 23, 2009, 92–101.
- (63) V. A. Mittal, A. Ellis, A. Ye, P. J. Edwards, S. Das; Singh, H. *Food Chem.* 190, 2016, 128–134.
- (64) V. A. Mittal, A. Ellis, A. Ye, S. Das, H. Singh. *J. Dairy Sci.* 98, 2015, 2103–2113.
- (65) J. Hegenauer, P. Saltman, G. Nace. *Biochemistry.* 18, 1979, 3865–3879.
- (66) G. Charlot. *Théorie et méthode nouvelles d'analyse qualitative*. Masson et Cie éditeurs libraires de l'académie de médecine, 1949, p. 155.
- (67) P. S. Santos, H. S. Santos, S. P. Toledo. *Mater. Res.* 3, 2000, 104–114.
- (68) H. A. Rojas, D. C. Guerrero, O. Y. Vásquez, J. S. Valencia. *Inf. Tecnol.* 23, 2012, 21–32.

CHAPITRE IV

Synthèse de métallophosphates poreux biosourcés à partir de nucléotides

IV.1. Introduction

De nouvelles molécules phosphorées issues du vivant autres que la caséine ont été également utilisées afin d'approfondir nos études sur la synthèse biosourcée de zinco- et aluminophosphates poreux. Il s'agit des nucléotides adénosine mono- et triphosphate (AMP et ATP) qui présentent dans leur structure un et trois groupements phosphates respectivement, un ribose et une base, l'adénine (Figure IV-1). Ce sont des biomolécules essentielles dans le métabolisme cellulaire. L'AMP sert à la formation de l'ATP qui est d'importance vitale car intermédiaire du transport d'énergie dans les cellules [1, 2]. Nous les avons sélectionnées pour la synthèse de zinco- et aluminophosphates biosourcés en prenant principalement en considération que :

- L'AMP et l'ATP disposent d'un pourcentage plus important en phosphore dans leur structure que la caséine. Cela représente environ 8,9 % et 18,3 % de la masse molaire de l'AMP et l'ATP respectivement, cette dernière avec environ une teneur double en phosphore par rapport à l'AMP.
- Ces nucléotides contiennent de l'adénine, une des principales purines de l'ADN et l'ARN [3]. Elle est une candidate potentielle pour la formation de la porosité dans des métallophosphates compte tenu de plusieurs travaux sur des matériaux microporeux de type MOF qui incluent des groupements adénine en tant que ligands dans des structures 3D poreuses [4, 5] (Figure IV-2).

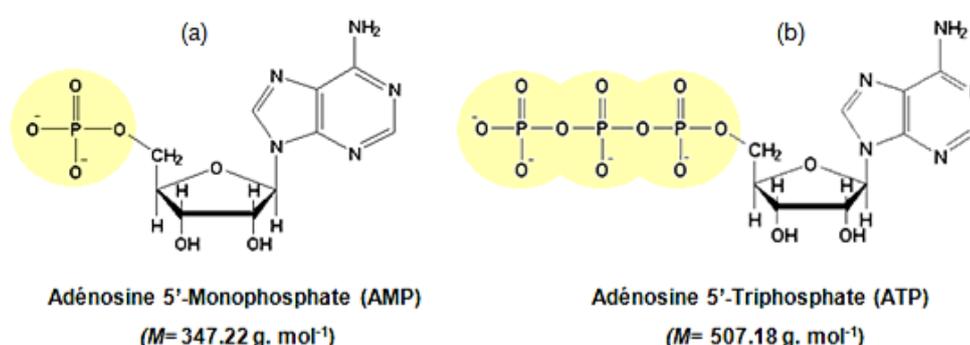


Figure IV-1. Représentation de la structure chimique des nucléotides utilisés dans la synthèse de zinco- et aluminophosphates : (a) adénosine 5-monophosphate (AMP) et (b) adénosine 5-triphosphate (ATP).

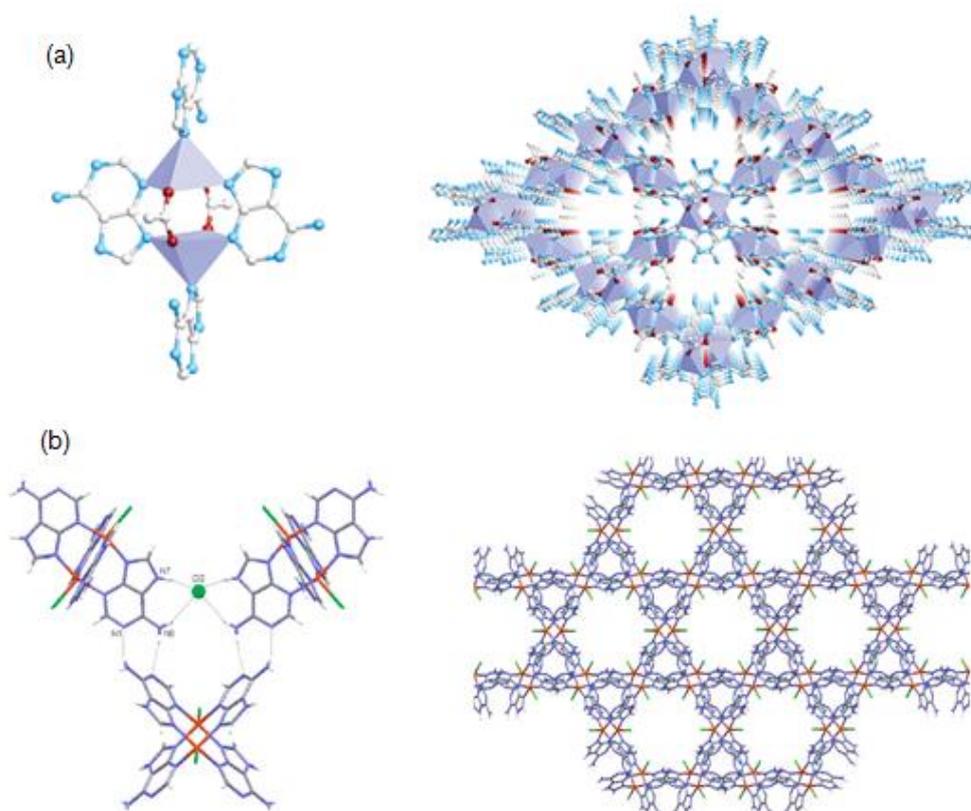


Figure IV-2. Exemples de structures 3D microporeuses de type MOF synthétisées à partir d'adénine (ligand): (a) structure $\text{Co}_2(\text{ad})_2(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2 \cdot 2\text{DMF} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ composée de clusters de Co^{2+} -adénine-acétate (à gauche) où deux Co^{2+} sont pontés par deux molécules d'adénine (via les positions $\text{N}^{\circ}3$ et $\text{N}^{\circ}9$) et deux molécules d'acétates en formant un réseau tridimensionnel (à droite) avec des pores de 5,8 Å de diamètre. Atomes de Co^{2+} : pyramides violet clair, C: sphères grises, O: sphères rouges, N: sphères bleu clair, et H: ont été omis pour la clarté [4]. (b) structure $[\text{Cu}_2(\mu\text{-adénine})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Vue en perspective de l'unité simple (à gauche) et de la structure tridimensionnelle avec des pores de 6,3 Å de diamètre (à droite) [5].

Les travaux sur la synthèse hydrothermale de phosphates de calcium publiés dans la littérature ont montré les avantages de l'utilisation de la molécule d'ATP comme source de phosphore et d'agent stabilisateur de nanosphères (Tableau I-3). Par contre, l'ATP n'a pas encore été utilisée dans la synthèse d'autres métallophosphates.

Pour ces raisons l'originalité des travaux inclus dans ce chapitre consiste en l'utilisation de l'ATP et de l'AMP pour la synthèse de zinc- ou aluminophosphates poreux sachant que l'AMP n'a pas non plus encore été employée dans le domaine de la synthèse de matériaux.

Ce chapitre présente les principaux résultats que nous avons obtenus sur le développement d'une nouvelle voie de synthèse hydrothermale de zinc- et aluminophosphates biosourcés

poreux à partir des nucléotides AMP et ATP. À cet effet le protocole expérimental suivi a été celui utilisé lors des synthèses hydrothermales de métallophosphates à partir de caséine avec pour objectifs d'évaluer les influences : i) de la nature des biomolécules phosphorées sur l'obtention de phases phosphates, ii) de la température du traitement hydrothermal, et iii) de la proportion des réactifs qui agissent comme source d'aluminium et de phosphore.

Les solides obtenus ont été caractérisés par diffraction de rayons X et microscopie électronique à balayage (MEB).

IV.2. Déphosphorylation de l'ATP

Les groupements phosphate présents dans les biomolécules phosphorées sont libérés grâce à des réactions d'hydrolyse illustrées par les réactions (1) et (2) pour l'ATP.



Avec Pi pour P inorganique, PPi pour pyrophosphate, AMP pour adénosine monophosphate et ADP pour adénosine diphosphate. Ce processus aussi appelée déphosphorylation a déjà été observé avec la phosphoprotéine caséine lors des synthèses de métallophosphates.

Par rapport aux nucléotides, diverses études sur la synthèse de phosphate de calcium à partir d'ATP réalisées par Ding *et al.* (2015) [6] et Qi *et al.* (2012, 2013) [1, 7] revendiquent la déphosphorylation de l'ATP produite par hydrolyse sous conditions hydrothermales. D'un autre côté, plusieurs travaux effectués par Sigel (1990, 1998) [8, 9] ont aussi révélé l'influence des cations métalliques et principalement de divalents (M^{2+}) en faveur de l'hydrolyse des molécules d'ATP dans un milieu aqueux. Cela se produit en fonction du pH *via* la formation de complexes/dimères $[\text{M}_2(\text{ATP})]_2(\text{OH})^-$ ou $[\text{M}_2(\text{ATP})]_2$ qui impliquent deux cations métalliques divalents par molécule d'ATP. À titre d'illustration la structure du dimère $[\text{M}_2(\text{ATP})]_2(\text{OH})^-$ est représentée dans la Figure IV-3(b).

Dans ce cas-là, la déphosphorylation de l'ATP peut se faire *via* une attaque nucléophile d'un ion hydroxyde sur le phosphate γ de l'ATP mettant en jeu la formation d'un composé $\text{M}(\text{OH})^+$ [10]. De façon similaire et en fonction de certaines conditions telles que le pH ou le type de cations métalliques impliqués, il est possible que la déphosphorylation se réalise également par une attaque nucléophile de l'eau sur le même phosphate γ (Figure IV-3(b)).

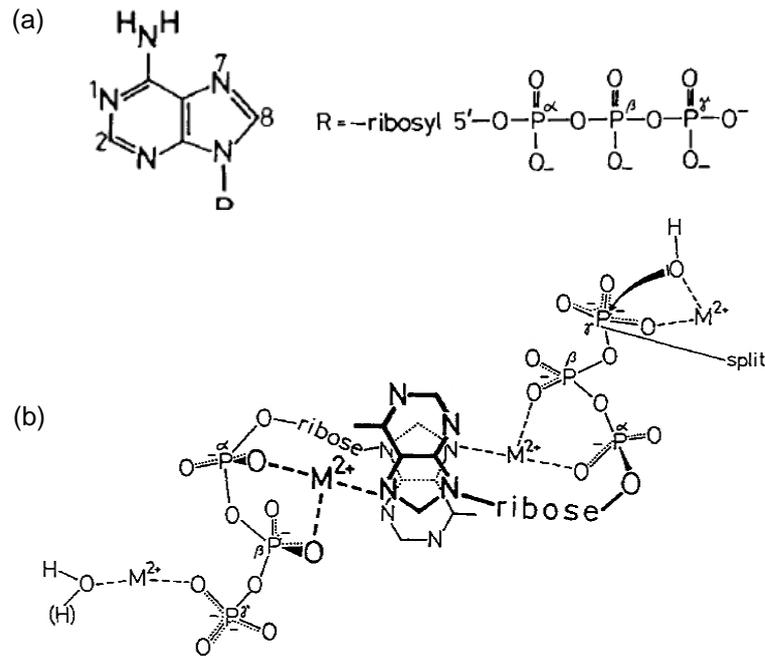


Figure IV-3. (a) Structure chimique de la molécule ATP avec la numération des atomes d'azote et la dénomination des groupements phosphate, et (b) structure probable du dimère $[M_2(ATP)]_2(OH)^-$ qui permet la déphosphorylation de l'ATP. Une attaque nucléophile du groupement OH^- sur le phosphate γ est représentée sur le côté droit [9].

Sigel et Tribolet (1990) [10] indiquent que la formation du dimère est facilitée par des interactions entre les cations M^{2+} et l'azote N⁷ de la base adénine d'une première molécule d'ATP, et les oxygène des groupements phosphate α et β de la seconde molécule d'ATP (Figure IV-3(b)). Ces interactions confèrent une réactivité importante au complexe dans lequel la molécule d'ATP joue elle-même le rôle d'« enzyme hydrolytique ».

Notons par ailleurs que la capacité de coordination de l'adénine provient principalement des sites basiques de Lewis qu'elle possède [4, 11]. C'est pour cette raison qu'elle est utilisée par exemple comme ligand pour la formation de solides de type MOF.

D'autres constatations importantes faites par Siegel *et al.* (1990, 1998) [8, 10] concernant l'influence de la nature des cations métalliques sur la déphosphorylation de l'ATP sont résumées ci-dessous :

- Une molécule d'ATP va toujours interagir avec au moins deux cations métalliques trivalents. Sur cette base, dans nos synthèses, nous avons gardé des compositions molaires similaires de Zn^{2+} et Al^{3+} de façon indépendante à son nombre d'oxydation.

- La présence de cations di- ou trivalents a une influence sur le taux de déphosphorylation de l'ATP. L'utilisation de certains cations trivalents (La^{3+} , Y^{3+}) peut amener à des taux de déphosphorylation supérieurs par rapport à l'emploi d'ions divalents (Mg^{2+} , Zn^{2+} , ..) malgré la formation de précipité (Tableau IV-1).
- L'ajout de cations monovalents tels que Na^+ semblerait favoriser le taux de déphosphorylation de l'ATP par un effet synergique capable de créer un état hautement réactif suite à un positionnement correct des cations métalliques sur la chaîne triphosphatée de l'ATP. Par exemple, dans un système $\text{Zn}^{2+}/\text{ATP}/\text{Na}^+$, Na^+ jouerait le rôle de deuxième ion métallique pour la formation de l'espèce réactive $[\text{Zn}(\text{ATP})\text{Na}]_2^{2-}$. Un incrément dans la quantité d'ions Na^+ favorise la déphosphorylation (Tableau IV-2).

Tableau IV-1. Comparaison du taux initial de déphosphorylation v_0^a ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$) des systèmes 2 $\text{M}^{n+}/1$ ATP en utilisant une solution d'ATP 10^{-3} M à $\text{pH}_0 = 5,5$ et $7,5$ (I (force ionique) = $0,1$ M, NaClO_4 ; 50 °C) [8].

| NTP (conc.) | M^{n+} | pH_0 5.5 | | pH_0 7.5 | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | | $v_0 \times 10^8$ | PF ^b | $v_0 \times 10^8$ | PF ^b |
| ATP (10^{-3} M) | None | 0.11 | 1 | 0.032 | 1 |
| | Mg^{2+} | 0.11 | 1 | 0.050 | 1.6 |
| | Mn^{2+} | 0.2 | 1.8 | 0.15 | 4.7 |
| | Ni^{2+} | 0.1 | 0.9 | 0.14 | 4.4 |
| | Cu^{2+} | 30 | 270 | 7.5 | 230 |
| | Zn^{2+} | 0.5 | 4.5 | 1.2 | 38 |
| | Cd^{2+} | 0.7 | 6.4 | 3.2 | 100 |
| | $(\text{tn})_2\text{Co}^{3+}$ | 130 ^c | 1200 | ~ 80 ^c | ~ 2500 |
| | Y^{3+} | ~ 8 ^c | ~ 70 | ~ 70 ^c | ~ 2200 |
| | La^{3+} | ~ 7 ^c | ~ 65 | 70 | 2200 |

^a : $v_0 = d[\text{PO}_4] / dt$ ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$). Les valeurs de v_0 proviennent de la référence [12].

^b : PF : « Promotion Factor » basé sur un taux de déphosphorylation correspondant à l'ATP seule. Par exemple, pour Mn^{2+} à $\text{pH}_0 = 5,5$, $\text{PF} = 0,2/0,11 = 1,8$. Ce facteur permet de comparer les effets des cations.

^c : mesuré malgré l'apparition d'un précipité [12].

Tableau IV-2. Influence de la force ionique, par incrément de la concentration d'ions Na^+ , sur le taux initial de déphosphorylation v_0 ($\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$) des systèmes ATP et de $1 \text{M}^{2+}/1 \text{ATP}$ en utilisant une solution d'ATP 10^{-3}M à $\text{pH} = 7,5$ et à 50°C [10].

| System | Concentration of NaClO_4 : | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| | 0.1 M | | 0.5 M | | 1.0 M | |
| | $v_0 \times 10^8$ | <i>RPF</i> ^a | $v_0 \times 10^8$ | <i>RPF</i> ^a | $v_0 \times 10^8$ | <i>RPF</i> ^a |
| ATP | 0.032 | 1 | 0.050 | 1.6 | 0.050 | 1.6 |
| $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ | 0.045 | 1 | 0.055 | 1.2 | 0.061 | 1.4 |
| $\text{Zn}^{2+}/\text{ATP}$ | 0.25 | 1 | 0.60 | 2.4 | 0.68 | 2.7 |

^a: *RPF* : « *Relative Promotion Factor* » basé sur le taux de déphosphorylation en prenant comme référence le système associé à une concentration en NaClO_4 de 0,1 M. Par exemple pour l'ATP seule et pour l'utilisation d'une solution à 0,5 M NaClO_4 : $\text{RPF} = 0,050/0,032 = 1,6$.

IV.3. Propriétés physico-chimiques de l'AMP et de l'ATP

Quelques caractéristiques physico-chimiques importantes de ces deux biomolécules sont regroupées dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3. Principales caractéristiques physico-chimiques de l'AMP et l'ATP [13-16].

| Caractéristique | AMP | ATP |
|------------------|--|---|
| Apparence | poudre blanche | |
| Solubilité | H_2O (10 g. L^{-1} à 20°C) et solution alcaline (1 M NH_4OH : 50 g. L^{-1}) | H_2O (50 g. L^{-1} à 20°C) et solution alcaline (concentration non spécifiée) |
| pKa ^a | 6,2 (phosphate), 3,8 (adénine), 0,9 (phosphate) | 6,5 (phosphate terminal γ), 4,0 (adénine), 1,7 (phosphate γ); 1,0 (phosphate β); 1,0 (phosphate α) |
| Conservation | au congélateur -15 à -20°C | |

^a : les espèces chimiques associées sont représentées dans les annexes IV-1 et IV-2. Les valeurs de pKa des phosphates sont associées à la protonation de leurs atomes d'oxygène.

Propriété d'auto-association des nucléotides AMP, ADP et ATP

Les nucléotides possèdent la capacité de s'auto-associer *via* des forces intermoléculaires dipolaires conduisant à la formation de dimères et de polymères dans des solutions aqueuses [15]. Plusieurs études indiquent que les nucléotides présentant une base nucléique de purine (adénine, guanine, ...) s'auto-associent par un empilement des cycles aromatiques et forment des dimères ainsi que des oligomères [15, 17]. À titre d'illustration la Figure IV-4 montre les géométries d'empilement *cis* et *trans* que peut adopter l'AMP dans une solution aqueuse [18] avec une préférence pour l'orientation *cis* dans laquelle les groupements riboses des molécules d'AMP se trouvent adjacents et stabilisés par des forces électrostatiques. Dans un arrangement *trans* les riboses sont séparés.

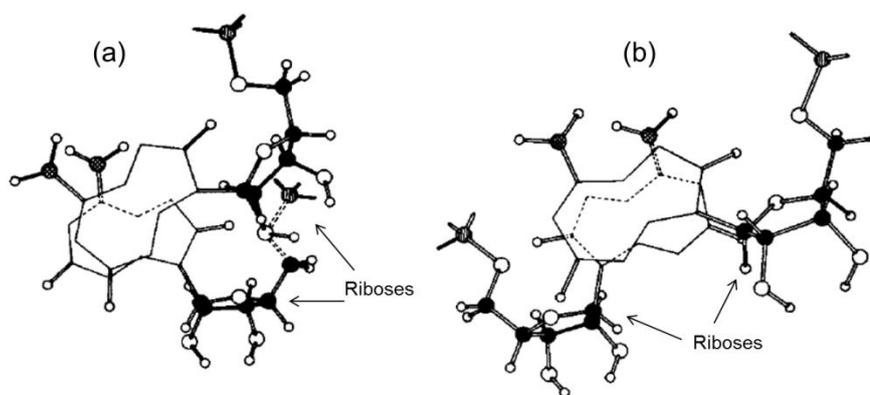


Figure IV-4. Géométries d'empilement (a) *cis* et (b) *trans* entre deux molécules d'AMP *via* les bases adénines représentées en traits fins. Les interactions électrostatiques entre les atomes de O et H des groupements riboses de l'AMP sont importantes en position *cis*. La référence [18] ne mentionne pas la nature des atomes (sphères) montrées.

Par ailleurs, l'affinité pour l'auto-association des nucléotides diminue avec la longueur de la chaîne phosphorée. C'est le cas des adénosines mono-, di- et triphosphates où l'auto-association diminue selon l'ordre suivant : adénosine > AMP²⁻ > ADP³⁻ > ATP⁴⁻. Cette diminution est attribuée à l'effet de l'augmentation de la charge négative des groupements phosphate et aux forces de répulsion électrostatiques [17]. Une façon d'induire leur auto-association est d'utiliser des cations métalliques qui permettront de neutraliser la charge négative des groupements phosphate.

IV.4. Solubilité de l'AMP et de l'ATP dans une solution aqueuse de soude

La solubilité des nucléotides AMP et ATP utilisés dans nos synthèses a été d'abord évaluée dans une solution aqueuse ajustée à différents pH par variation de la concentration de soude (NaOH). Ces tests ont été nécessaires car, comme dans le cas de la caséine, la synthèse des métallophosphates est réalisée dans un milieu réactionnel qui contient de la soude. Cette condition pourrait aider à la déphosphorylation des nucléotides sachant qu'elle se fait par intervention d'une attaque nucléophile, de préférence avec OH⁻ (voir Figure IV-3(b)).

Différentes solutions aqueuses d'AMP et d'ATP ont été séparément préparées à température ambiante à partir du mélange de 0,1 g de nucléotide avec 10 mL d'une solution aqueuse de soude. Le Tableau IV-4 regroupe les concentrations de soude utilisées, le pH des mélanges préparés ainsi que certaines observations visuelles faites sur le niveau de la dissolution des nucléotides.

Nous constatons que les nucléotides AMP et ATP présentent des solubilités différentes dans des conditions de pH et de quantité de soude similaires. Par ailleurs :

- Il apparaît que les nucléotides acidifient les solutions/mélanges résultants et plus précisément lorsque les concentrations de soude sont inférieures à 1,0 M ($\text{pH}_{\text{NaOH}} < 13$).
- L'AMP (Tableau IV-4(i)) est soluble dans des solutions concentrées en soude (0,05 M–1,00 M) associées à un intervalle de $\text{pH}_{\text{NaOH/AMP}}$ compris entre 6,0 et 14,0. Cependant au fur et à mesure que le mélange NaOH/AMP s'acidifie et pour une valeur de pH comprise entre 3,5 et 4,0, le nucléotide précipite. Cela peut être attribué à la diminution de la charge globale de l'AMP (Annexe IV-1).
- D'autre part, l'ATP (Tableau IV-4(ii)) semble être soluble dans toute la gamme de pH à la différence de l'AMP. Sa bonne solubilité semble liée aux possibilités d'auto-association entre pH 2,8 et 8,7 et principalement à $\text{pH} < 5$ suite à la protonation de l'adénine et la présence majoritaire de molécules $\text{H}_2(\text{ATP})^{2-}$ [19] (Annexe IV-2). L'auto-association des molécules ATP est gouvernée par des interactions électrostatiques entre l'azote n°1 de l'adénine chargé positivement et le « groupement phosphate γ » chargé négativement. La Figure IV-5 montre la structure du dimère $[\text{H}_2(\text{ATP})]_2^{4-}$ qui se forme lors de l'empilement de deux molécules $\text{H}_2(\text{ATP})^{2-}$.

Tableau IV-4. Résultats des tests de dissolution des nucléotides AMP et ATP dans des solutions aqueuses de soude de différentes concentrations. Les pH_{NaOH} , $\text{pH}_{\text{NaOH/AMP}}$ et $\text{pH}_{\text{NaOH/ATP}}$ correspondent aux pH de la solution de soude, des mélanges soude/AMP et soude/ATP respectivement.

| (i) | | AMP ^a | | |
|----------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|---|
| [NaOH] M | $\text{pH}_{\text{NaOH}}^b$ | $\text{pH}_{\text{NaOH/AMP}}^b$ | Dissolution | Aspect du mélange |
| 1,00 | 14,0 | 14,0 | complète | une phase liquide incolore |
| 0,10 | 13,0 | 12,5 | “ | “ |
| 0,05 | 12,5 | 6,0 | “ ^c | “ |
| 0,01 | 12,0 | 4,0 | partiellement soluble | deux phases (précipité blanc, liquide incolore) |
| 0,003 | 10,5 | 3,5 | “ | “ |
| (ii) | | ATP ^a | | |
| [NaOH] M | $\text{pH}_{\text{NaOH}}^b$ | $\text{pH}_{\text{NaOH/ATP}}^b$ | Dissolution | Aspect du mélange |
| 1,00 | 14,0 | 14,0 | complète | une phase liquide incolore |
| 0,10 | 13,0 | 9,0 | “ | “ |
| 0,05 | 12,5 | 8,0 | “ | “ |
| 0,003 | 10,5 | 4,0 | “ | “ |

^a : sel de disodium.

^b : précision de pH ($\pm 0,5$) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

^c : dissolution complète mais moins rapidement que lorsque le $\text{pH}_{\text{NaOH/ATP}} = 12,5-14,0$.

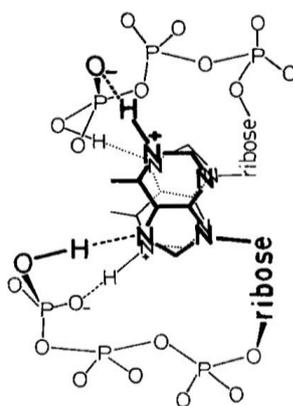


Figure IV-5. Exemple de la structure du dimère $[\text{H}_2(\text{ATP})]_2^{4-}$ formé par interactions électrostatiques (liaisons hydrogène représentées en pointillés) [19].

IV.5. Démarche expérimentale

Les synthèses ont été réalisées en suivant le protocole expérimental utilisé pour la synthèse hydrothermale de zinco- et aluminophosphates à partir de caséine qui a été précisé dans le paragraphe II.2.

Plusieurs paramètres de synthèse ont été étudiés :

- La nature du nucléotide et donc le nombre de groupements phosphate qu'il possède (AMP = 1 atome P, ATP = 3 atomes P) ainsi que sa forme (hydrate ou sel (AMP = monohydrate et sel de disodium), ATP = sel de disodium).
- La température de synthèse (100 °C et 160 °C).
- La proportion molaire (Zn, Al)/P.

La composition molaire du milieu réactionnel a été fixée en tenant compte :

- i. Des tests de solubilité des nucléotides dans des solutions aqueuses de soude. Les synthèses ont ainsi été effectuées à partir de l'ATP et l'AMP dissous dans une solution de NaOH 0,003 M et 0,1 M respectivement. Ce choix a été fait afin que les nucléotides soient solubles rapidement avec des concentrations de soude basses comme utilisées dans la synthèse des métallophosphates avec la caséine.
- ii. De l'utilisation d'une même masse de nucléotide, 0,1 g pour environ 12 mL de gel préparé dans toutes les synthèses. Nous avons fait varier les rapports molaires M/P (M = Zn ou Al) en fonction de la nature du métal, M/P= 0,5; 2,0 et 5,3. Ce dernier rapport correspond à celui utilisé pour l'obtention du zincophosphate « hopéite » à partir de la caséine.

Les synthèses ont été réalisées dans les systèmes suivants :

- AMP : x (ZnO ou Al₂O₃) : 0,25 P₂O₅ : 0,910 Na₂O : 1233 H₂O
- ATP : y (ZnO ou Al₂O₃) : 0,50 P₂O₅ : 0,029 Na₂O : 1233 H₂O

Les sources de zinc et d'aluminium ont été des solutions aqueuses de nitrate de Zn(II) et Al(III).

IV.6. Résultats expérimentaux

Un récapitulatif des principaux résultats obtenus concernant les essais de synthèse de zinco- et d'aluminophosphates avec les nucléotides AMP et ATP sont reportés dans ce paragraphe. Il est important de préciser que dans certains cas nous ne sommes pas arrivés à

réaliser le traitement thermique des échantillons par calcination à cause de la faible quantité de produit obtenue.

IV.6.1. Synthèse de zincophosphates

Les Tableaux IV-5 et IV-6 regroupent les conditions de synthèse et les résultats des analyses effectuées par DRX sur les produits obtenus.

IV.6.1-1. Utilisation de l'AMP

Quelle que soit la source d'AMP (formes monohydrate ou sel de disodium), seul l'oxyde de zinc cristallise à 100 °C (Tableau IV-5). Une élévation de température à 160 °C induit en plus de la formation de ZnO la cristallisation de sels dans le système « Na-Zn-P ». Il s'agit des composés NaZnPO_4 (PDF n°00-009-7621) et $\text{Na}_2\text{Zn}_5(\text{PO}_4)_4$ (PDF n°00-060-0861) (Figure IV-6). Les pH des milieux réactionnels avant traitement hydrothermal sont plutôt basiques ($6 \leq \text{pH} \leq 12,5$) ce qui peut expliquer la formation de ZnO.

La(es) phase(s) amorphe(s) détectée(s) (diffractogrammes non montrés) ne correspond(ent) pas à de l'AMP mais pourrai(en)t être associée(s) à des complexes formés entre résidus organiques et espèces minérales contenant du zinc, du phosphore et/ou du sodium.

Une calcination à 750 °C induit dans tous les cas la cristallisation de zincophosphates qui co-existent avec ZnO (Figures IV-7 et IV-8). Ces zincophosphates sont $\text{Na}_2\text{Zn}_5(\text{PO}_4)_4$ et $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (PDF n°00-029-1390) et leur formation confirme l'hypothèse faite au-dessus sur la composition de la phase amorphe. Le composé NaZnPO_4 ne semble pas affecté par la calcination sauf dans le cas de l'échantillon Q-1.

Tableau IV-5. Principaux résultats de DRX des produits bruts de synthèse et calcinés correspondant à des systèmes zincophosphates préparés à partir d'AMP (hydrate et sel de disodium). Durée de synthèse : 6 jours.

| AMP | | (0,25–2,68) ZnO : 0,25 P ₂ O ₅ ^a : 0,91 Na ₂ O : 1233 H ₂ O | | | | |
|-------------|----------------|--|-----------------|--------|---|---|
| Échantillon | Zn/P* (gel) | AMP | pH ^b | T (°C) | Produit brut de synthèse | Produit calciné (750 °C) |
| O | 0,5 | | 12,0 | | ZnO | x |
| O-1 | 2,0 | monohydrate | 6,0 | 100 | amorphe ^c + traces ZnO | <u>Na₂Zn₅(PO₄)₄</u> + <u>α-Zn₃(PO₄)₂</u> + ZnO |
| O-2 | 5,3 | | 6,0 | | amorphe ^c + traces ZnO | <u>Na₂Zn₅(PO₄)₄</u> + <u>α-Zn₃(PO₄)₂</u> + ZnO |
| P | 0,5 | | 12,5 | | ZnO | x |
| P-1 | 2,0 | sel de disodium | 10,0 | 100 | <u>ZnO</u> + amorphe ^c | <u>ZnO</u> + α-Zn ₃ (PO ₄) ₂ |
| P-2 | 5,3 | | 6,5 | | <u>ZnO</u> + amorphe ^c | <u>ZnO</u> + α-Zn ₃ (PO ₄) ₂ |
| Q | 0,5 | | 12,0 | | <u>NaZnPO₄</u> + ZnO + Na ₂ Zn ₅ (PO ₄) ₄ (à 18,2° (2θ)) | <u>NaZnPO₄</u> + ZnO (à 47,6° (2θ)) |
| Q-1 | 2,0 | monohydrate | 6,0 | 160 | <u>NaZnPO₄</u> + ZnO + Na ₂ Zn ₅ (PO ₄) ₄ (à 10,6 ; 14,1° et 18,2° (2θ)) | <u>Na₂Zn₅(PO₄)₄</u> + α-Zn ₃ (PO ₄) ₂ + ZnO |
| Q-2 | 5,3 | | 6,0 | | ZnO + amorphe ^c | <u>α-Zn₃(PO₄)₂</u> + ZnO |
| R | 0,5 | | 12,5 | | x | x |
| R-1 | 2,0 | sel de disodium | 9,0 | 160 | <u>NaZnPO₄</u> + ZnO | <u>NaZnPO₄</u> + ZnO + Na ₂ Zn ₅ (PO ₄) ₄ (à 10,6° (2θ)) |
| R-2 | 5,3 | | 6,0 | | ZnO | x |

^a : P issu de l'AMP (1 mol AMP = 1 mol P). ^b : précision de pH (± 0,5) mesuré avec des bandelettes de papier pH. ^c : ne correspond pas à de l'AMP.

x : non analysé, __ : phase majoritaire. * : rapport molaire.

Tableau IV-6. Principaux résultats de DRX des produits bruts de synthèse et calcinés correspondant à des systèmes zincophosphates préparés à partir d'ATP (sel de disodium). Durée de synthèse : 6 jours.

| ATP | | (0,49 – 5,34) ZnO : 0,50 P ₂ O ₅ ^a : 0,029 Na ₂ O : 1233 H ₂ O | | | | |
|-------------|----------------|---|-----------------|--------|--|---|
| Échantillon | Zn/P* (gel) | ATP | pH ^b | T (°C) | Produit brut de synthèse | Produit calciné (750 °C) |
| S | 0,5 | | 3,0 | | x | x |
| S-1 | 2,0 | | 3,0 | 100 | n.i | x |
| S-2 | 5,3 | | 3,0 | | amorphe ^c | x |
| T | 0,5 | sel de disodium | 3,0 | | <u>Zn₃(PO₄)₂.4H₂O</u> + Zn ₃ (PO ₄) ₂ .2H ₂ O | <u>α-Zn₃(PO₄)₂</u> |
| T-1 | 2,0 | | 3,0 | 160 | <u>Zn₃(PO₄)₂.1H₂O</u> + Zn ₃ (PO ₄) ₂ .2H ₂ O + Zn ₃ (PO ₄) ₂ .4H ₂ O | <u>α-Zn₃(PO₄)₂</u> + ZnO |
| T-2 | 5,3 | | 3,0 | | <u>Zn₃(PO₄)₂.4H₂O</u> + Zn ₃ (PO ₄) ₂ .2H ₂ O | <u>α-Zn₃(PO₄)₂</u> + ZnO |

^a : P issu de l'ATP (1 mol ATP = 3 moles P).

^b : précision de pH (± 0,5) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

^c : signal du à la plaque de verre utilisée (Annexe IV-3).

x : non analysé, : phase majoritaire, n.i : non identifié. * : rapport molaire.

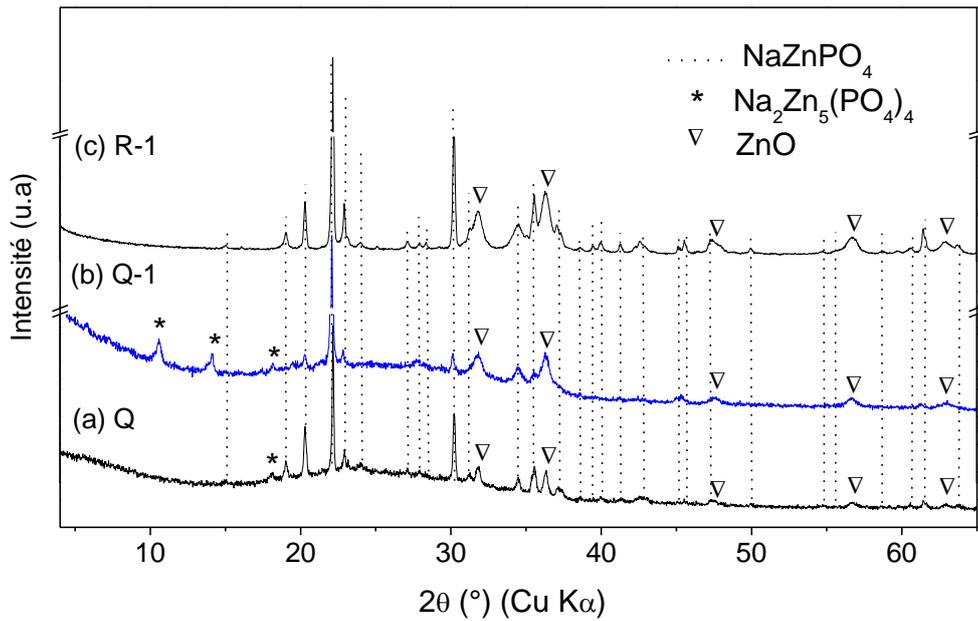


Figure IV-6. Diffractogrammes de rayons X des produits bruts de synthèse obtenus avec l'AMP dans des systèmes zincophosphates à 160 °C pendant un durée de 6 jours (Tableau IV-5): échantillons (a) Q, (b) Q-1 et (c) R-1.

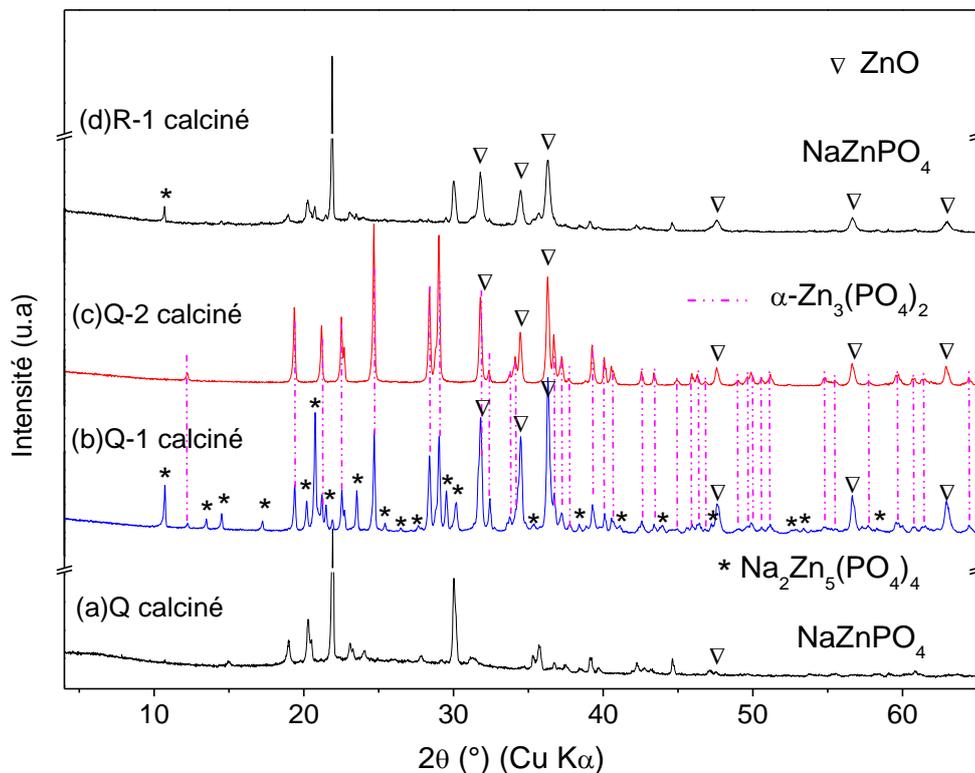


Figure IV-7. Diffractogrammes de rayons X des produits calcinés à 750 °C qui sont associés aux synthèses faites avec l'AMP dans des systèmes zincophosphates effectués à 160 °C (Tableau IV-5) : échantillons (a) Q, (b) Q-1 (c) Q-2 et (d) R-1 calcinés.

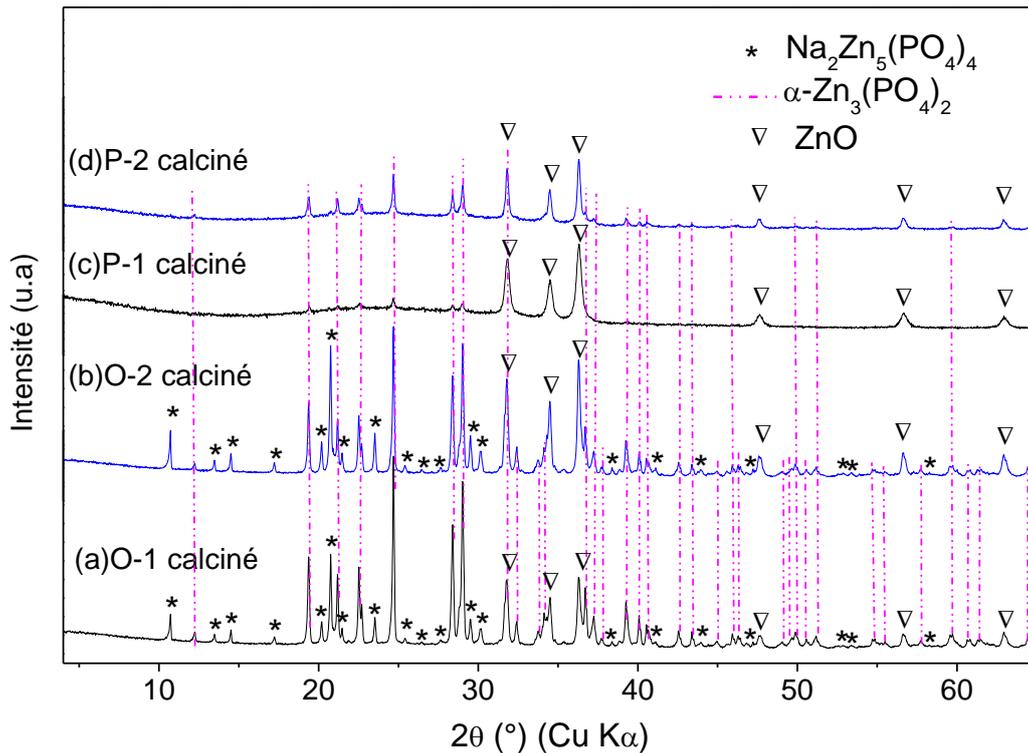


Figure IV-8. Diffractogrammes de rayons X des produits calcinés à 750 °C qui sont associés aux synthèses faites avec l'AMP dans des systèmes zincophosphates. T = 100 °C (Tableau IV-5) : échantillons (a) O-1, (b) O-2, (c) P-1 et (d) P-2 calcinés.

IV.6.1-2. Utilisation de l'ATP

Les synthèses effectuées avec l'ATP conduisent à des milieux de synthèse plus acides (pH = 3, Tableau IV-6). Cela peut s'expliquer par la libération de plus de H_3O^+ lors de la déphosphorylation, la molécule d'ATP contenant plus de phosphore que l'AMP.

Une température de synthèse élevée (160 °C) est nécessaire afin d'induire la cristallisation de zincophosphates. Ceux-ci correspondent aux composés $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (PDF n°01-077-5374), $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PDF n°00-010-0333) et $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (PDF n°00-026-1397) (Figure IV-9). Il est intéressant de rappeler que des traces d'hopéite ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ont été obtenues à partir de la caséine dans des conditions similaires de synthèse (Tableau III-7, pH = 4,5, T = 100 °C, durée de synthèse = 6 jours).

Par ailleurs, à l'issue des synthèses réalisées à 100 °C, pas ou peu de produit solide a été récupéré. Nous n'avons alors pas pu réaliser de calcination. Par contre, la calcination à 750 °C des formes brutes de synthèse obtenues après synthèse à 160 °C a été effectuée et a conduit à la cristallisation principalement de la phase $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figure IV-10).

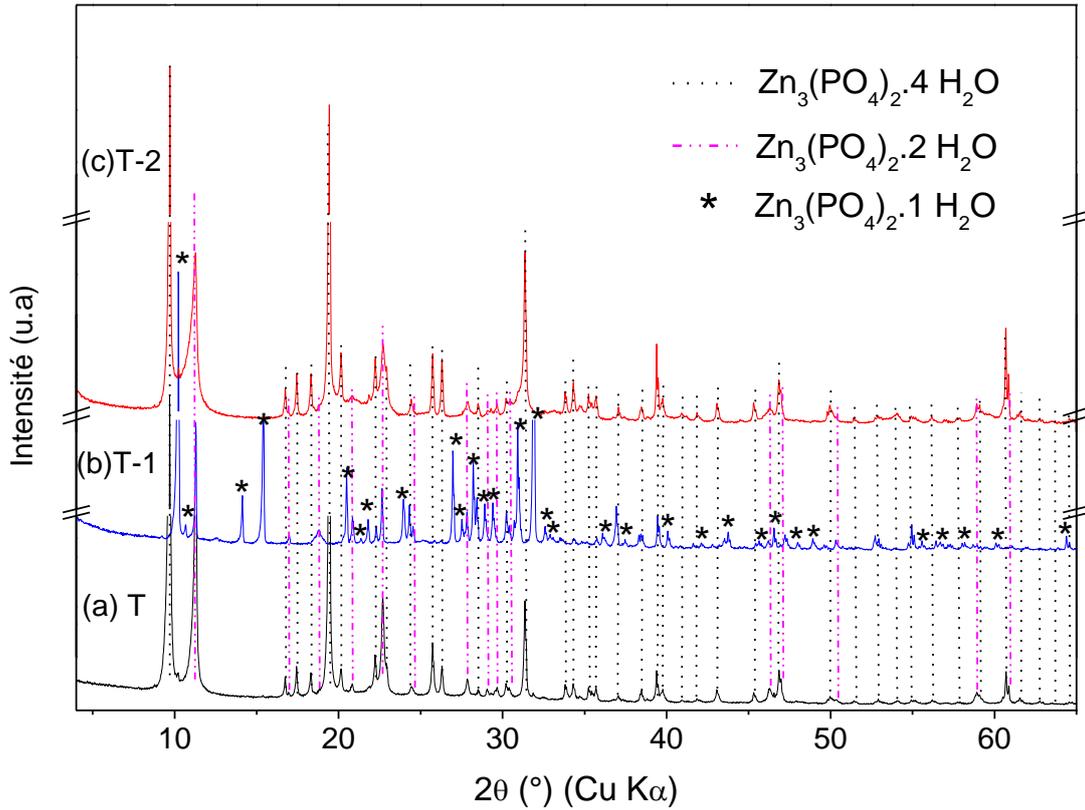


Figure IV-9. Diffractogrammes de rayons X des produits bruts de synthèse obtenus avec l'ATP dans le système zincophosphate. Traitement hydrothermal réalisé à 160 °C pendant une durée de 6 jours (Tableau IV-6) : échantillons (a) T, (b) T-1 et (c) T-2.

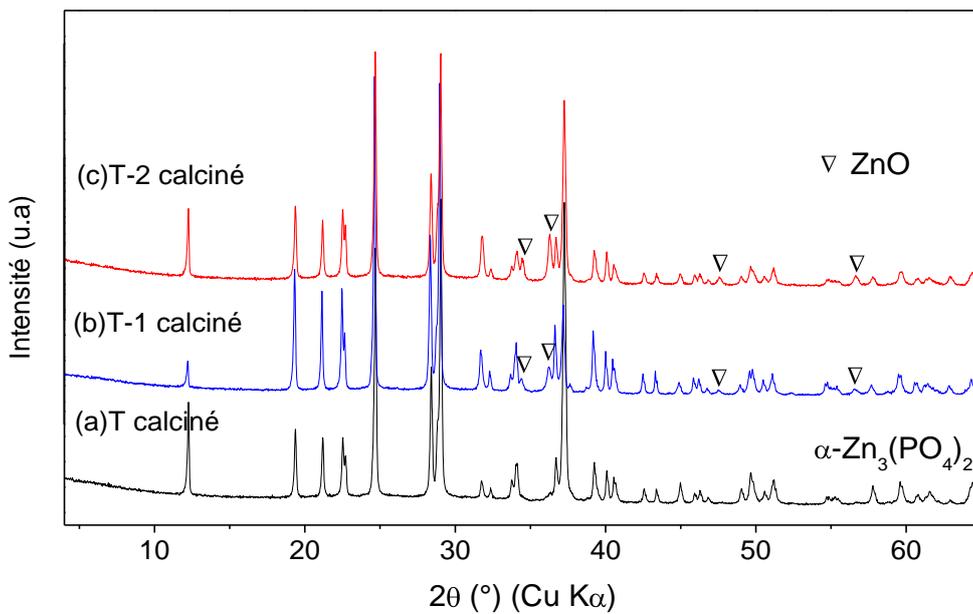


Figure IV-10. Diffractogrammes de rayons X des produits calcinés à 750 °C associés aux synthèses faites avec l'ATP dans des systèmes zincophosphates effectués à 160 °C (Tableau IV-6) : échantillons (a) T, (b) T-1 et (c) T-2 calcinés.

IV.6.1-3. Caractérisation par MEB

À titre d'exemple, la Figure IV-11 regroupe les clichés de microscopie électronique à balayage de certains produits bruts de synthèse et calcinés. Ils correspondent aux échantillons O-1 et Q-1 préparés avec l'AMP à 100 °C et 160 °C respectivement, et à l'échantillon T obtenu avec l'ATP à 160 °C (Tableaux IV-5 et IV-6).

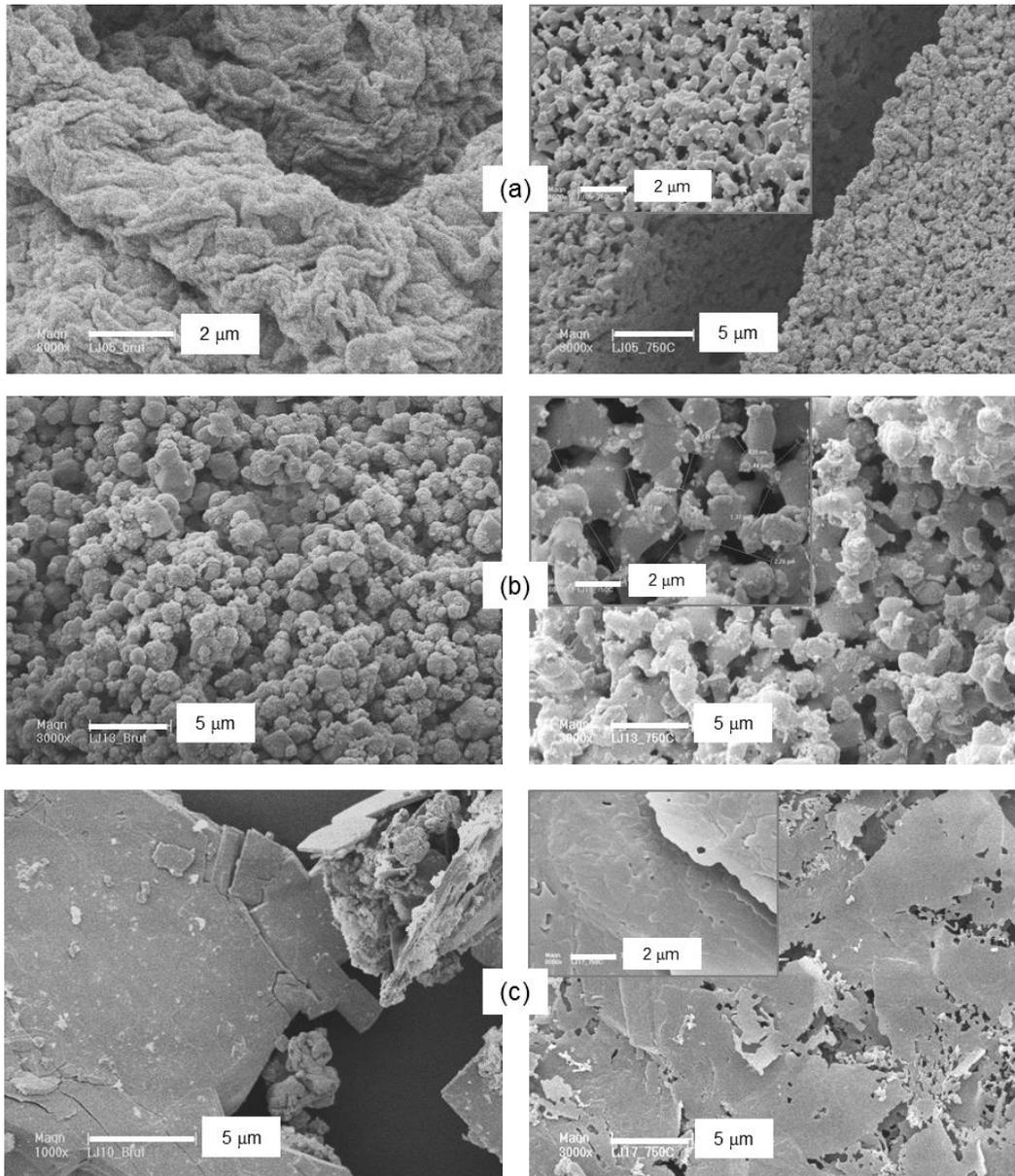


Figure IV-11. Clichés de microscopie électronique à balayage d'exemples de solides obtenus à partir de l'AMP (a et b) et de l'ATP (c) dans des systèmes zincophosphates (Tableaux IV-5 et IV-6). À gauche sont représentés les produits bruts de synthèse et à droite les formes calcinées : échantillons (a) O-1, (b) Q-1 et (c) T.

Les clichés MEB montrent que l'échantillon Q-1 dans sa forme brute de synthèse (Figure IV-11b à gauche) associé au mélange $\text{NaZnPO}_4 + \text{Na}_2\text{Zn}_5(\text{PO}_4)_4$ se présente sous la forme d'agrégats de cristaux de géométrie quasi sphérique avec des diamètres compris entre 1,0 et 2,5 μm . Le produit brut O-1 (Figure IV-11a à gauche) associé au mélange phase amorphe + ZnO a un aspect rugueux pouvant laisser apparaître des filaments. Par contre, les formes calcinées associées (Figure IV-11(a-b) à droite), toutes les deux constituées d'un même mélange de phases zincophosphates et d'oxyde de zinc ($\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Na}_2\text{Zn}_5(\text{PO}_4)_4 + \text{ZnO}$), montrent la présence d'une importante macroporosité relativement régulière. D'après les clichés, les pores ont un diamètre légèrement inférieur à 1,0 μm pour l'échantillon O-1 alors que l'échantillon Q-1 calciné possède des pores de diamètre un peu plus élevé compris entre 1,0 et 3,0 μm . Cette macroporosité s'est donc formée au cours de la calcination grâce probablement à la décomposition des résidus organiques qui occupaient initialement les macropores.

Les clichés des produits calcinés font également apparaître des petites particules déposées en surface. Elles sont caractéristiques d'une des phases cristallisées mais nous ne pouvons déterminer laquelle.

Le cliché MEB du mélange de phases de zincophosphates $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (majoritaire) et $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ correspondant à l'échantillon T brut de synthèse (Figure IV-11c à gauche) révèle un produit non macroporeux. Après calcination le produit correspondant à la phase pure $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figure IV-11c à droite) se présente sous forme de plaquettes dentelées irrégulières, ne faisant pas apparaître de macroporosité en leur centre.

IV.6.2. Synthèse d'aluminophosphates

Les Tableaux IV-7 et IV-8 regroupent les conditions de synthèse ainsi que les résultats des analyses effectuées par DRX sur les poudres obtenues.

IV.6.2-1. Utilisation de l'AMP

Dans le cadre des synthèses effectuées à 100 °C, trois produits semblent pouvoir se distinguer sur les diffractogrammes (Figure IV-12) :

- De possibles traces d'aluminophosphates $\text{AlPO}_4\text{-H4}$ (PDF n°00-048-0035) qui est un matériau non poreux [20].
- Un composé appelé phase A, majoritairement détecté dans nos poudres, isostructural à $\text{C}_5\text{H}_{17}\text{AlMn}_2\text{O}_9\text{S} \cdot 2,7\text{H}_2\text{O}$ (PDF n°00-055-1677) qui présente une structure lamellaire

[21]. Ce composé correspondrait, dans notre cas, à un « complexe » impliquant des résidus organiques de l'AMP avec des espèces minérales contenant Al et/ou P.

- Un produit non identifié caractérisé par deux pics situés à $16,1^\circ$ et $18,8^\circ$ (2θ) sur les diffractogrammes.

Après calcination à 750°C , les structures identifiées sont détruites. Dans tous les cas, un produit amorphe est alors récupéré. Il est caractérisé par une large bande centrée à 23° (2θ).

Dans le cadre des synthèses effectuées à 160°C , deux phases peuvent être identifiées :

- La phase A préalablement rencontrée qui semble pure dans l'échantillon X-1.
- Un hydroxyde de phosphate d'aluminium $\text{Na}_4\text{Al}(\text{PO}_4)_2\text{OH}$ (PDF n°04-011-1785) de structure similaire à celle du minéral tancoite (non poreux) [22] (échantillon X) (Figure IV-13). Il est obtenu pur pour un pH de milieu réactionnel basique ($\text{pH} = 12,5$).

Nous constatons également que la calcination n'a pas favorisé la cristallisation de phases aluminophosphates contrairement à ce qui a été observé dans le cas des zincophosphates. Les produits calcinés présentent une phase amorphe qui est représentée par un pic large de diffraction centré vers 23° (2θ) (diffractogrammes non montrés) qui ne correspond pas à la plaque de verre utilisée pour les analyses de DRX.

Tableau IV-7. Résultats de DRX des produits bruts de synthèse et calcinés correspondant à des systèmes aluminophosphates préparés à partir d'AMP (hydrate et sel de disodium). Durée de synthèse : 6 jours.

| AMP | | (0.13–1.34) Al ₂ O ₃ : 0.25 P ₂ O ₅ ^a : 0.91 Na ₂ O : 1233 H ₂ O | | | | |
|-------------|----------------|---|-----------------|-------|--|-----------------------------|
| Échantillon | Al/P* (gel) | AMP | pH ^b | T(°C) | Produit brut de synthèse | Produit calciné (750 °C) |
| U | 0,5 | | 9,5 | | amorphe | x |
| U-1 | 2,0 | monohydrate | 4,0 | 100 | traces phase A + n.i (à 18,8° (2θ)) | amorphe (centré à 23° (2θ)) |
| U-2 | 5,3 | | 4,0 | | <u>phase A</u> + AlPO ₄ -H ₄ + n.i (à 16,1° et 18,8° (2θ)) | ‘ |
| V | 0,5 | | 12,5 | | x | x |
| V-1 | 2,0 | sel de disodium | 4,0 | 100 | <u>phase A</u> + n.i (à 18,8 °2θ) | amorphe (centré à 23° (2θ)) |
| V-2 | 5,3 | | 4,0 | | <u>phase A</u> + AlPO ₄ -H ₄ + n.i (à 16,1° et 18,8° (2θ)) | ‘ |
| W | 0,5 | | 9,5 | | phase A | x |
| W-1 | 2,0 | monohydrate | 4,0 | 160 | traces phase A | amorphe (centré à 23° (2θ)) |
| W-2 | 5,3 | | 4,0 | | n.i + traces Na ₄ Al(PO ₄) ₂ OH | ‘ |
| X | 0,5 | | 12,5 | | Na ₄ Al(PO ₄) ₂ OH | x |
| X-1 | 2,0 | sel de disodium | 4,0 | 160 | phase A | amorphe ^c |
| X-2 | 5,3 | | 4,0 | | <u>phase A</u> + traces Na ₄ Al(PO ₄) ₂ OH | ‘ |

^a : P issu de l'AMP (1 mol AMP = 1 moles P).

^b : précision de pH (± 0,5) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

^c : signal du à la plaque de verre utilisé (Annexe IV-3).

x : non analysé, ___ : phase majoritaire, n.i : non identifié. * : rapport molaire.

Tableau IV-8. Résultats de DRX des produits bruts de synthèse et calcinés correspondant à des systèmes aluminophosphates synthétisés à partir d'ATP (sel de disodium). Durée de synthèse : 6 jours.

| ATP (0,25–2,67) Al ₂ O ₃ : 0,50 P ₂ O ₅ ^a : 0,029 Na ₂ O : 1233 H ₂ O | | | | | | |
|--|----------------|-----------------|-----------------|--------|---|---------------------------------|
| Échantillon | Al/P* (gel) | ATP | pH ^b | T (°C) | Produit brut de synthèse | Produit calciné (750 °C) |
| Y | 0,5 | | 2,0 | | amorphe ^c | x |
| Y-1 | 2,0 | | 2,0 | 100 | x | x |
| Y-2 | 5,3 | | 2,0 | | x | x |
| Z | 0,5 | sel de disodium | 2,0 | | <u>AlPO₄.H₂O-H4</u> + AlPO ₄ - cristobalite | AlPO ₄ -cristobalite |
| Z-1 | 2,0 | | 2,0 | 160 | amorphe (centré à 28° (2θ)) | amorphe (centré à 23° (2θ)) |
| Z-2 | 5,3 | | 2,0 | | ' | ' |

^a : P issus de l'ATP (1 mol ATP = 3 mol P).

^b : précision de pH (± 0,5) mesuré avec des bandelettes de papier pH.

^c : signal du à la plaque de verre utilisé (Annexe IV-3).

x : non analysé, ___ : phase majoritaire.* : rapport molaire.

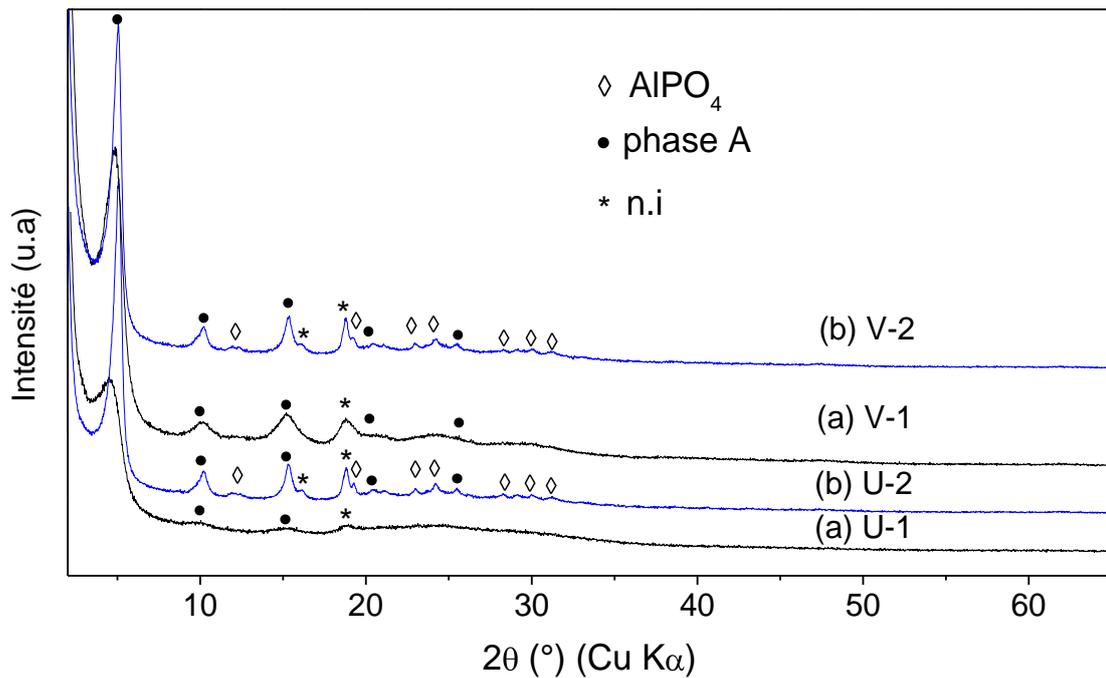


Figure IV-12. Diffractogrammes de rayons X des produits bruts de synthèse obtenus avec l'AMP dans des systèmes aluminophosphates à 100 °C pendant une durée de 6 jours (Tableau IV-7) : échantillons (a) U-1, (b) U-2, (c) V-1 et (d) V-2.

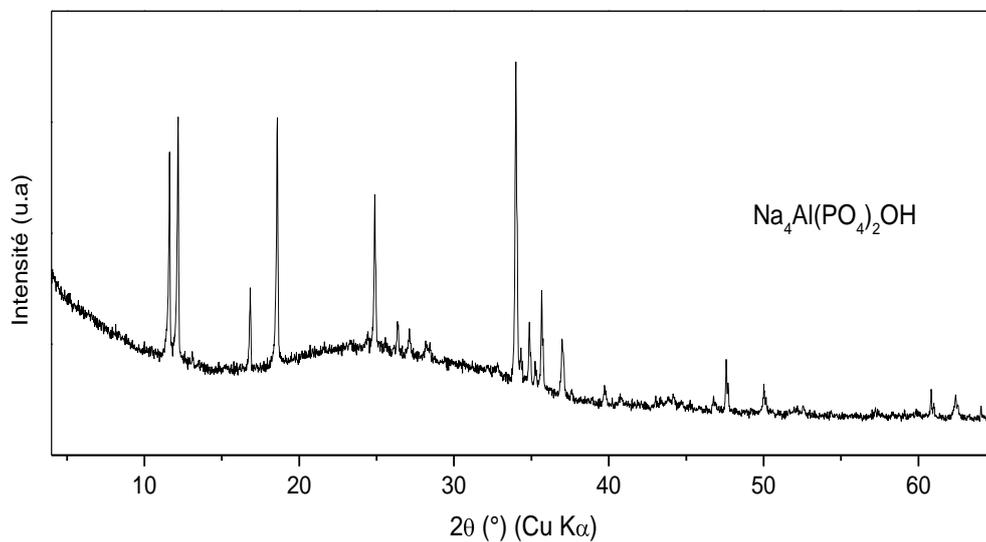


Figure IV-13. Diffractogramme de rayons X de l'échantillon X associé à la phase pure Na₄Al(PO₄)₂OH. Le pic très large centré vers 24° (2θ) correspond à la plaque de verre utilisée pour les analyses de DRX (Annexe IV-3).

IV.6.2-2. Utilisation de l'ATP

Pour les synthèses faites avec l'ATP (Tableau IV-8), la cristallisation de phases aluminophosphates a été plus difficile qu'avec l'AMP, les conditions de pH étant très acides (pH = 2,0). Les produits de synthèse obtenus à 100 °C et 160 °C, et calcinés à 750 °C, consistent en une phase amorphe représentée par un pic large de diffraction situé entre 23° et 28° (2θ) (diffractogrammes non montrés). Par contre, l'échantillon Z qui a été préparé avec un faible rapport molaire Al/P = 0,5 (à 160 °C) fait apparaître une phase cristallisée (Figure IV-14(a)). Il s'agit d'un aluminophosphate $\text{AlPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_4$ (PDF n°04-015-0737) (phase dense), dont la structure a été déterminée par Poojary *et al.* (1994) [20]. L'échantillon Z calciné à 750 °C consiste en une phase cristalline d' AlPO_4 de structure cristobalite (PDF n°04-015-7505) (Figure IV-14(b)). La formation de cet aluminophosphate après calcination a été aussi observée en utilisant la caséine comme source de phosphore dans des conditions de pH également acides (pH = 4,5–5,0) à 100 °C (Tableau III-9).

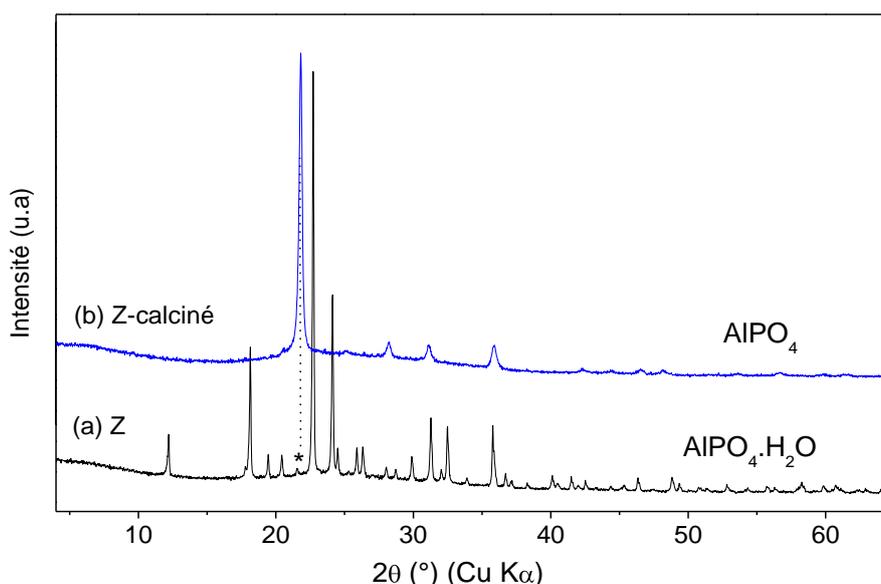


Figure IV-14. Diffractogrammes de rayons X de l'échantillon Z : (a) produit brut de synthèse, et (b) produit calciné à 750 °C.

IV.6.2-3. Caractérisation par MEB

Les Figures IV-15 et IV-16 reportent les clichés de microscopie électronique à balayage réalisés sur les échantillons W et Z préparés avec l'AMP et l'ATP respectivement à 160 °C (Tableaux IV-7 et IV-8). Les clichés MEB montrent que l'échantillon W (Figure IV-15)

associé à la phase A présente un aspect homogène en surface avec une macroporosité visible au moins en surface.

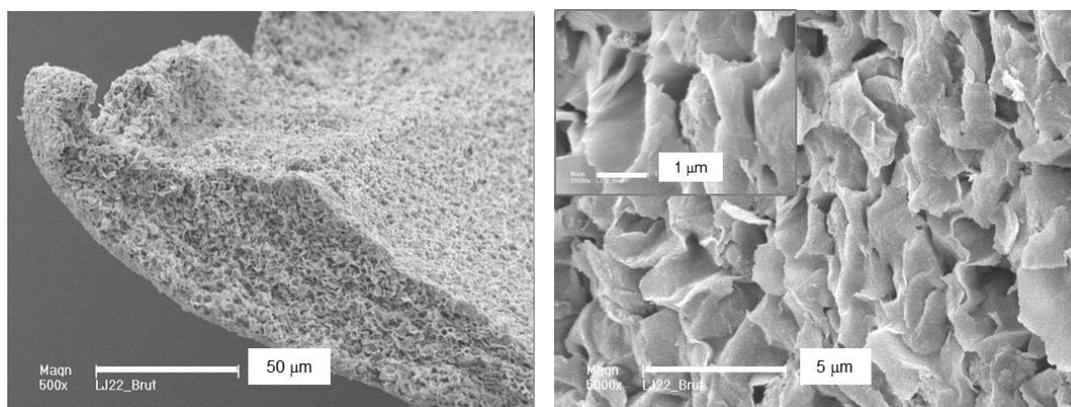


Figure IV-15. Clichés de microscopie électronique à balayage de l'échantillon W forme brute de synthèse (Tableau IV-7).

D'autre part, les clichés MEB des solides associés à la synthèse Z montrent que les phases $\text{AlPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_4$ (Figure IV-16(a)) et AlPO_4 (structure cristobalite) (Figure IV-16(b)) associées aux produits brut de synthèse et calcinés respectivement, se présentent sous forme de billes avec un diamètre compris entre 20 et 70 µm dans le cas du brut de synthèse, et un diamètre un peu plus petit (entre 25 et 40 µm) pour le produit calciné.

Il apparait que la surface des billes correspondant à la phase $\text{AlPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_4$ est assez régulière. Par contre, après calcination, la surface est composée de cristaux prismatiques agglomérés de 1,0 à 2,5 µm de longueur associés à la phase AlPO_4 -cristobalite. Il serait intéressant de briser ces billes pour visualiser l'intérieur ainsi que de les caractériser par manométrie d'adsorption gazeuse (N_2) pour mettre en évidence une présence éventuelle de micro- ou mésoporosité. Il faut noter que des travaux précédents ont déjà montré l'obtention de nano- et microsphères poreuses de phosphates de calcium à partir du nucléotide ATP [1, 6].

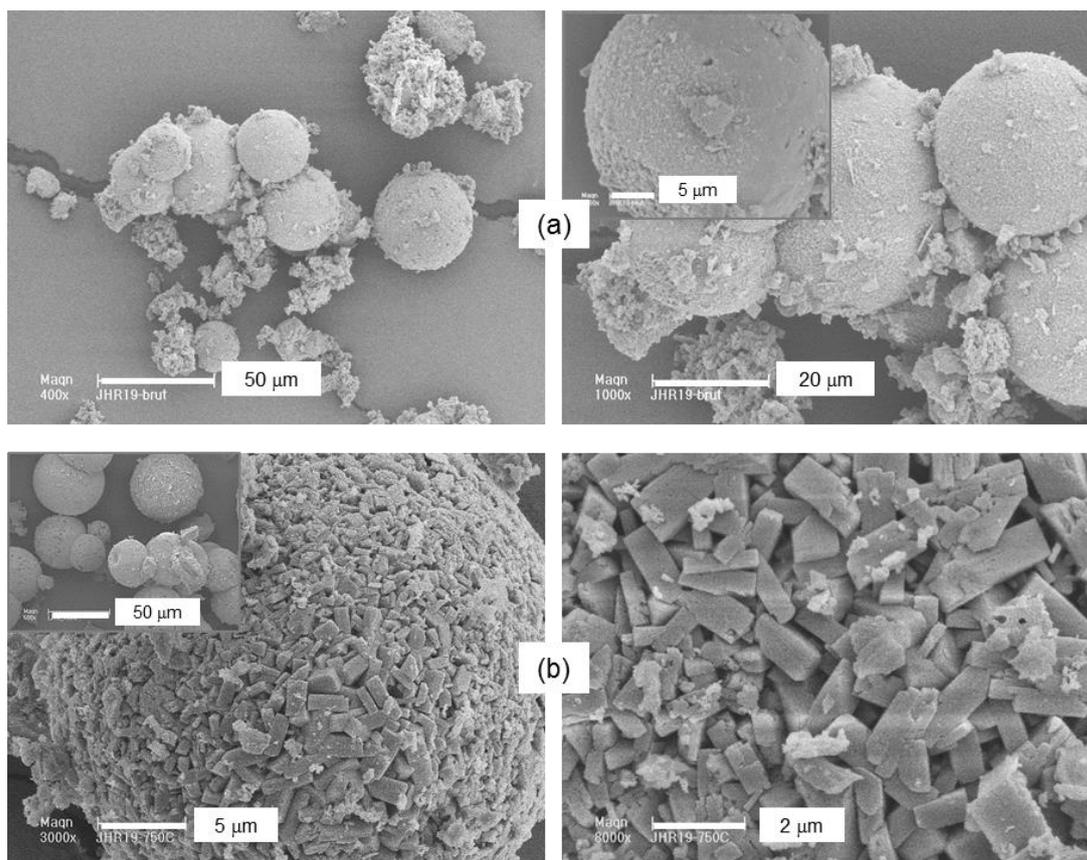


Figure IV-16. Clichés de microscopie électronique à balayage des solides associés à la synthèse Z (Tableau IV-8) : (a) produit brut de synthèse et (b) produit calciné à 750 °C.

IV.7. Conclusion

Les résultats préliminaires obtenus sur la synthèse hydrothermale de zinco- et aluminophosphates à partir de l'AMP et de l'ATP montrent que les deux nucléotides jouent le rôle attendu de source de phosphore.

L'influence du rapport molaire M/P, avec $M = \text{Zn}$ ou Al , sur la cristallisation des métallophosphates n'est pas évidente car certains essais de synthèse n'ont pas conduit à l'obtention de solide ou alors à une très faible quantité. Les analyses DRX n'ont alors pas pu être réalisées.

L'augmentation de la température de synthèse de 100 °C à 160 °C semble favoriser la cristallisation des zinco- et aluminophosphates.

L'emploi de l'ATP conduit à un pH de milieu réactionnel plus acide qu'avec l'AMP en raison probablement de la libération de plus de H_3O^+ lors de la déphosphorylation.

Les phases zincophosphates identifiées dans les produits bruts de synthèse sont NaZnPO_4 , $\text{Na}_2\text{Zn}_5(\text{PO}_4)_4$, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 1, 2$ et 4), et dans les produits calcinés à 750°C $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ et $\text{Na}_2\text{Zn}_5(\text{PO}_4)_4$, NaZnPO_4 .

Dans le cas des aluminophosphates, nous avons pu identifier les phases $\text{AlPO}_4\text{-H}_4$, $\text{Na}_4\text{Al}(\text{PO}_4)_2\text{OH}$ ainsi qu'une phase A qui semble de structure lamellaire.

Les différentes phases identifiées ne sont pas poreuses mais la décomposition des résidus organiques provenant des nucléotides lors d'une calcination à 750°C induit la libération de macropores dans certains cas (diamètre ca. entre $1\ \mu\text{m}$ et $3\ \mu\text{m}$).

Enfin, il semblerait que l'utilisation de l'AMP facilite la formation de phases zincophosphates macroporeuses par comparaison avec l'ATP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) C. Qi; Y. J. Zhu; X. Y. Zhao; B.Q. Lu; Q. L. Tang, J. Zhao, F. Chen. *Eur. J. Chem.* 19, 2013, 981–987.
- (2) R. Tribolet, H. Sigel. *Biophys. Chem.* 27, 1987, 119–130.
- (3) A. Ensafi, M. M. Abarghoui, B. Rezaei. *Sens. Actuators, B.* 204, 2014, 528–535.
- (4) J. An, S. J. Geib, N. L. Rosi. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2010, 38–39.
- (5) J. T. Gipson, G. Beobide; O. Castillo, J. Cepeda, A. Luque, S. Perez-Ynez, A. T. Aguayo, P. Roma. *CrystEngComm.* 13, 2011, 3301–3305.
- (6) G. J. Ding, Y.J. Zhu, G.F. Cheng, Y.J. Ruan, C. Qi, T.W. Sun, J. Wu, F. Chen. *Mater. Lett.* 160, 2015, 242–245.
- (7) C. Qi, Q.-Li. Tang, Y.J. Zhu, X-Y. Zhao, F. Chen. *Mater. Lett.* 85, 2012, 71–73.
- (8) H. Sigel. *Coord. Chem. Rev.* 100, 1990, 453–539.
- (9) H. Sigel. *Pure Appl. Chem.* 70, 1998, 969–976.
- (10) H. Sigel, R. Tribolet. *J. Inorg. Biochem.* 40, 1990, 163–179.
- (11) B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* 200, 2000, 487–516.
- (12) R. M. Milburn, M. G. Basak, R. Tribolet, H. Sigel. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 1985, 3315–3321.
- (13) Fiche technique de l'adénosine 5'-monophosphate (AMP) monohydrate <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2252?lang=fr®ion=FR> (consulté le 30/09/2016)
- (14) Fiche technique de l'adénosine 5'-monophosphate (ATP) sel de disodium http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2383pis.pdf (consulté le 30/09/2016)
- (15) F. Peral, E. Gallego, *Biophys. Chem.* 85, 2000, 79–92.
- (16) E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, Vol. 2. ; 1974-1989.
- (17) H. Sigel, R. Griesser. *Chem. Soc. Rev.* 34, 2005, 875–900.
- (18) F. E. Evans, R. H. Sarxia. *Biopolymers.* 13, 1974, 2117–2132.
- (19) R. Tribolet, H. Sigel. *Eur. J. Biochem.* 170, 1988, 617–626.

- (20) D. M. Poojary, K. J. Balkus, S. J. Riley, B. E. Gnade, A. Clearfield. *Microporous Materials*. 2, 1994, 245–250.
- (21) R. Allmann, H. Jepsen. *Neues Jahrb. Miner. Monatsh.* 12, 1969, 544–451.
- (22) M. P. Attfield, R. E. Morris, I. Burshtein, C. F. Campana, A. K. Cheetham. *J. Solid State Chem.* 118, 1995, 412–416.

CHAPITRE V

**Évaluation des propriétés antibactériennes
de nouveaux zincophosphates poreux
biosourcés enrichis d'argent préparés à partir
de caséine**

V.1. Introduction

Dans le domaine de l'environnement, les phosphates sont reconnus pour leur utilisation dans le traitement de l'eau. Ils permettent de réduire la concentration en molécules toxiques (métaux lourds, colorants, pesticides, etc.) présentes dans l'eau et de prévenir ou retarder la formation d'écailles (à cause des ions Ca^{2+}) dans les canalisations *via* la complexation de ces molécules. Ils préviennent aussi la corrosion dans les réseaux de distribution d'eau potable par formation d'un revêtement protecteur de phosphate métallique sur la surface des tuyaux [1, 2].

Différents produits chimiques à base d'orthophosphates et de polyphosphates sont disponibles au niveau commercial sous forme liquide ou solide pour le traitement de l'eau. Par ailleurs, l'hydroxyapatite (un phosphate de calcium) en plus d'être non-toxique, possède des propriétés physico-chimiques remarquables, telles que la capacité d'adsorption et d'échange ionique [3-5]. La forme macroporeuse qu'elle peut présenter permet aussi son utilisation en tant que filtre pour le traitement de l'eau, grâce à la rétention des bactéries par les pores du solide [6].

En ce qui concerne les zincophosphates poreux, leur application dans le domaine environnemental ne semble pas encore avoir fait l'objet d'étude. Pourtant, ils contiennent du zinc, un élément peu toxique pour l'homme et son environnement en comparaison des autres métaux entrant dans la composition des métallophosphates [7]. Ils sont également peu solubles dans l'eau et présentent des propriétés intéressantes dans la prévention de la corrosion [8, 9]. Cela représente trois atouts pour une utilisation dans les domaines du biomédical et du traitement de l'eau. En microbiologie, diverses études ont mis en évidence l'action antibactérienne des zincophosphates (phases non poreuses) grâce à la présence du zinc, par exemple sur la souche bactérienne *S. mutans*, lorsqu'ils sont utilisés en tant que ciments dentaires [10-12]. L'incorporation de nanoparticules d'argent, réservoirs d'ions argent (Ag^+) reconnus pour leur action bactéricide [13], dans de tels solides pourrait être une voie prometteuse pour attribuer de nouvelles propriétés antibactériennes aux zincophosphates. La présence éventuelle d'une porosité au sein du matériau pourrait alors apporter une valeur ajoutée aux solides pour la rétention des bactéries.

À cet effet, ce chapitre fait une description du procédé d'élaboration et des caractérisations de nouveaux zincophosphates poreux biosourcés enrichis d'argent synthétisés par voie hydrothermale à partir de caséine. Cette étude est une continuation des travaux présentés dans

le chapitre III sur la synthèse de zincophosphates poreux à partir de caséine. L'originalité de ce travail consiste en :

- La préparation *in situ* de nanoparticules d'argent *via* un procédé plus respectueux de l'environnement à partir de caséine, cette dernière étant aussi utilisée comme source de phosphore et comme template pour la synthèse des zincophosphates macroporeux. Les nanoparticules d'argent étant retenues dans nos matériaux sont des réservoirs potentiels d'agents antibactériens Ag^+ . Cette méthode de synthèse représente d'autre part une stratégie intéressante de réduction des risques environnementaux associés au relargage direct des nanoparticules d'argent.
- L'évaluation des propriétés antibactériennes des zincophosphates ainsi préparés a été réalisé sur *E. coli* qui est un indicateur classique de la pollution de l'eau potable connue pour causer des maladies telles que diarrhée, infections urinaires et insuffisance rénale [14, 15]. Sont présentés dans ce travail : i) l'étude de la colonisation bactérienne à la surface des zincophosphates, ii) l'influence des ions Ag^+ libérés sur la croissance et la prolifération bactérienne sur les surfaces de zincophosphates et iii) l'influence des ions Ag^+ libérés sur la croissance et la prolifération bactérienne dans les zones environnantes les solides.

Ce chapitre comprend un article qui va être soumis. En préambule, sont présentés plus en détails, certains points qui concernent la synthèse des matériaux et les travaux de microbiologie, l'objectif étant de faciliter la compréhension des résultats présentés dans l'article.

V.2. Synthèse hydrothermale d'un nouveau zincophosphate biosourcé ZnPO/CN/Ag par formation *in situ* de nanoparticules d'Ag

La synthèse d'un nouveau zincophosphate biosourcé enrichi de nanoparticules d'argent et de caséine nommé ZnPO/CN/Ag (ZnPO = hopéite $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, CN = caséine) a pu être réalisée par adaptation du protocole expérimental de base que nous avons établi pour la synthèse hydrothermale de zincophosphates biosourcés à partir de caséine. Ce protocole a été décrit de manière générale dans le chapitre II (Figure II-1).

La Figure V-1 schématise le protocole spécifique utilisé pour la préparation de ce nouveau matériau *via* la formation *in situ* des nanoparticules d'argent. Il fait apparaître une étape qui consiste en l'incorporation de la source d'argent (nitrate d'argent, AgNO_3) introduite dans une

solution aqueuse de NaOH contenant la caséine, afin de favoriser la complexation des ions Ag^+ par les molécules de caséine.

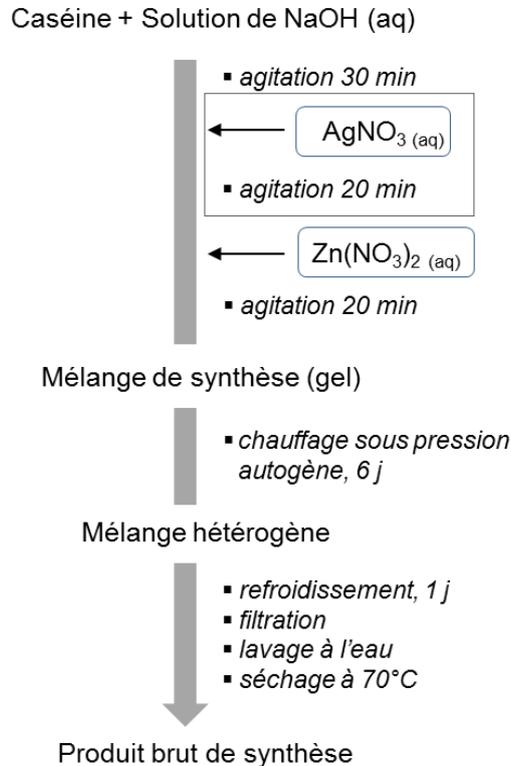


Figure V-1. Représentation schématique du protocole de synthèse hydrothermale du zincophosphate biosourcé ZnPO/CN/Ag contenant des nanoparticules d'argent.

Nous nous sommes appuyés sur les travaux réalisés par Ghodake *et al.* (2013) [16] et Ashraf *et al.* (2013) [17] qui ont étudié la synthèse de nanoparticules d'Ag à partir de la caséine dans un milieu aqueux basique. D'après ces auteurs, la caséine joue le rôle d'agent réducteur des ions Ag^+ et de protecteur des nanoparticules formées, en les stabilisant et évitant leur agrégation. La réduction des ions Ag^+ en nanoparticules est nettement contrôlée par le rapport molaire NaOH/caséine. Par ailleurs, la propriété d'agent réducteur de la caséine est probablement contrôlée par les groupements carboxyliques et amines en présence d'additif alcalin (NaOH). En particulier, la réduction incomplète des ions Ag^+ à de faibles concentrations en NaOH suggère que la caséine seule semble incapable d'interagir avec les ions Ag^+ et de les transformer en nanoparticules d'argent (Ag). Par contre, les ions Ag^+ en présence d'une concentration élevée en NaOH se transforment immédiatement en nanoparticules *via* un procédé chimique par voie humide [16].

La vitesse de formation des nanoparticules augmente avec la concentration de NaOH à concentrations de caséine et Ag^+ fixes. La forme déprotonée des groupements hydroxyle et carboxyle présents dans la caséine facilite la complexation des ions Ag^+ . Par conséquent, ces ions Ag^+ oxydent les groupes hydroxyle en carbonyle en étant réduits simultanément en nanoparticules d'argent. La soude garantit que les acides aminés de la protéine soient déprotonés dans la solution. Ainsi la forme mono-anion de la protéine devient un agent complexant plus fort qui oriente la croissance cristalline et qui augmente la quantité d'argent formée [18].

La Figure V-2 illustre la formation des nanoparticules d'argent (Ag) à partir de la caséine en présence de NaOH. Ces nanoparticules formées sont stabilisées par les caséines probablement grâce à des forces électrostatiques entre les acides aminés aromatiques (non spécifiés) des caséines et la surface des nanoparticules [16].

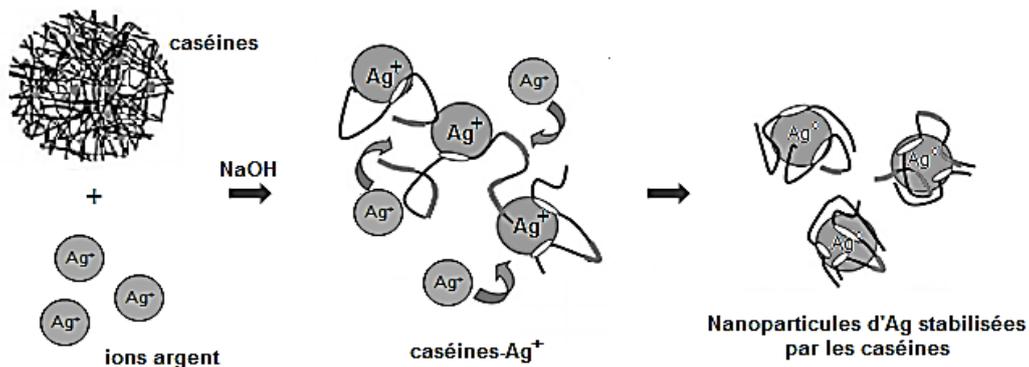


Figure V-2. Schéma du mécanisme hypothétique de formation des nanoparticules d'Ag à partir de caséine en présence de NaOH. Figure modifiée à partir de [19].

Par ailleurs, la nature globulaire de la caséine devient prédominante quand la valeur du pH approche de celle de son point isoélectrique (4,6). La solubilité de la protéine diminue alors en milieu aqueux et elle précipite. Ainsi, les nanoparticules d'Ag restent en suspension pour des $\text{pH} \geq 8$. L'agglomération des nanoparticules commence à $\text{pH} = 7$, devient plus intense à $\text{pH} = 5,7$ et ce jusqu'à $\text{pH} 2$. Cette agglomération est probablement liée, selon Ashraf *et al.* (2013) [17], aux liaisons hydrogène et aux interactions cation-électron π et hydrophobes entre les molécules de caséine.

Tenant compte des informations trouvées dans la littérature, il nous est alors apparu opportun d'essayer de préparer un zincophosphate poreux biosourcé à partir de caséine et

enrichi en nanoparticules d'Ag par voie directe. Cela permettrait la formation *in situ* des nanoparticules dans la matrice zincophosphate ZnPO(hopéite)/caséine : la préparation de cette dernière a déjà été réalisée et est décrite dans le chapitre III.

Ainsi (travaux décrits dans la publication), de nouveaux solides zincophosphates poreux enrichis d'argent sous la forme de nanoparticules et, selon les cas, de phosphates doubles de zinc et d'argent ont pu être obtenus après calcination du solide ZnPO/CN/Ag et élimination de la caséine entre 250 °C et 750 °C. Ces solides ont été nommés ZnPOs/Ag-250, ..., ZnPOs/Ag-750 (ZnPOs = mélange de phases zincophosphates cristallisées) en fonction de la température à laquelle ils ont été calcinés. Les résultats des caractérisations structurale, chimique et morphologique de l'ensemble de ces solides sont détaillés dans la publication reportée au paragraphe V-4.

V.3. Évaluation des propriétés antibactériennes des zincophosphates biosourcés enrichis d'argent préparés à partir de caséine sur *E. coli* K12 SCC1

V.3.1. Autofluorescence de la souche *E. coli* K12 SCC1

L'évaluation des propriétés antibactériennes de nos matériaux a été menée avec la souche *E. coli* K12 SCC1. Cette souche bactérienne présente une propriété d'autofluorescence grâce à la modification du génome de l'*E. coli* K12 MG1655 par insertion du chromosome PA1/04/03-gfpmut3 qui permet d'exprimer la GFP (*Green Fluorescent Protein*) [20].

La GFP est une protéine issue de la méduse *Aequorea jellyfish* et consiste en une longue chaîne de 238 acides aminés (Figure V-3(a)) [21]. À l'intérieur de sa structure, la séquence d'acides aminés Ser-Tyr-Gly correspondant aux positions 65–67 forment un chromophore 4-(p-hydroxybenzylidène)imidazolidin-5-one qui possède la propriété d'absorber la lumière bleue et UV, et d'émettre de la fluorescence en vert. La Figure V-3(b) montre le spectre adsorption et d'émission de la GFP non modifiée. Le spectre d'absorption est constitué de deux maxima d'excitation avec un pic principal à 396 nm (lumière UV) et un autre secondaire à 476 nm (lumière bleue), tandis que le spectre d'émission présente un maxima d'émission à 508 nm et un épaulement autour de 540 nm [22].

C'est grâce à l'autofluorescence de la GFP présente dans la souche *E. coli* K12 SCC1 qu'il est possible de visualiser les bactéries viables par microscopie à fluorescence (Figure V-3(c)) (voir chapitre II). De même, le gène de la GFP, généralement non-toxique pour les

organismes, a pu être aussi exprimé dans différents autres organismes modèles en biologie (*Caenorhabditis elegans* (un petit ver non-parasitaire) [23], *Saccharomyces cerevisiae* (une levure) [24], *Drosophila melanogaster* (une espèce de mouche) [25]) afin de les rendre fluorescents sans modifier leur physiologie, et pouvoir étudier *in vivo* les événements cellulaires se produisant dans leurs organismes pour une meilleure compréhension des mécanismes biologiques.

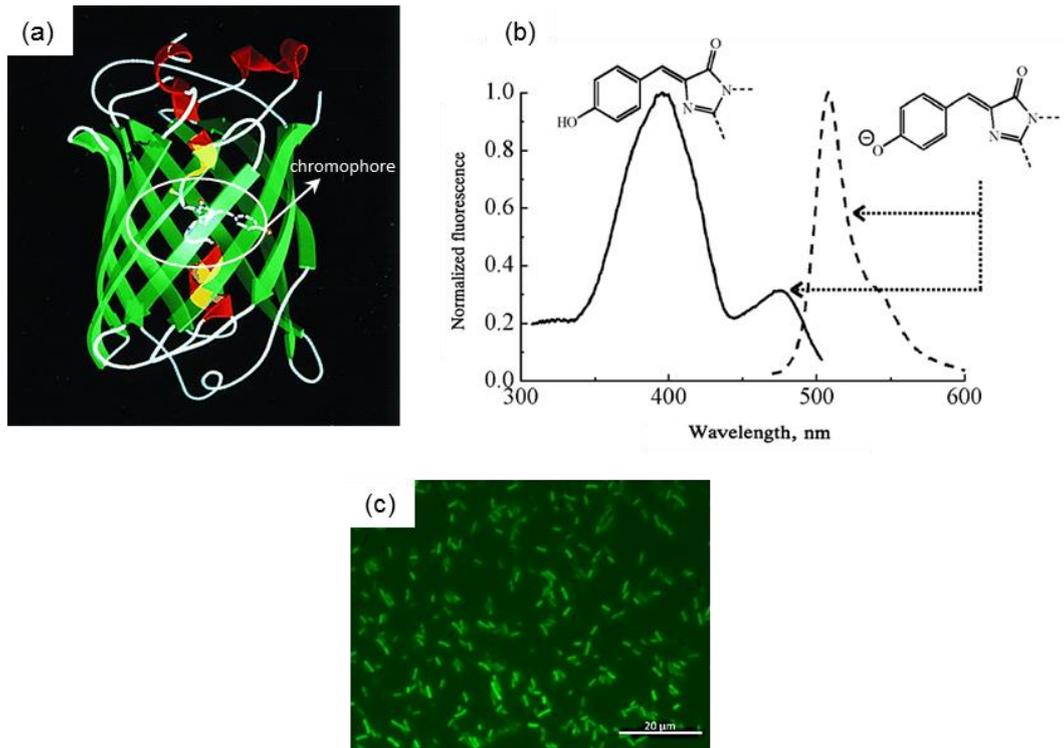


Figure V-3. (a) Structure tertiaire de la GFP présentant la forme cylindrique qui contient le chromophore au centre. [21]. (b) Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence (ligne continue et pointillée respectivement) pour la protéine GFP. Les structures du chromophore responsables des spectres sont également montrées [26]. (c) Exemple d'image de la bactérie *E. coli* K 12 SCC1 acquise par microscope à fluorescence.

Dans le travail présenté dans ce chapitre, les bactéries *E. coli* K12 sont cultivées dans un milieu nutritif minéral M63G. Ce milieu riche en sels (KH_2PO_4 0,1M, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 20 wt.%, FeSO_4 0,1 wt.%, MgSO_4 20 wt.%, KOH 6 M, vitamine B1 0,05 wt.% and glucose 10 wt.%) [27] fournit les éléments essentiels que la bactérie requiert pour sa croissance et sa prolifération. Il s'agit principalement de l'azote, du phosphore et de différents ions métalliques (Fe^{2+} , Mg^{2+} , K^+). Le milieu de culture est supplémenté en glucose en tant que

source principale d'énergie en carbone. L'ajout de la vitamine B1 (thiamine) permet également la stimulation de la croissance cellulaire.

V.3.2. Zincophosphates (poudres) préparés pour les tests en microbiologie

Afin d'éviter la contamination microbienne des solides (poudres) par des microorganismes provenant de l'environnement, nous avons préparé les zincophosphates dans des conditions les plus stériles possibles, pour éviter d'utiliser des procédés additionnels de stérilisation qui pourraient avoir une influence sur les propriétés physico-chimiques des matériaux finaux. Cela concerne principalement les échantillons qui contiennent de la caséine, qui seraient dégradés par des températures élevées (typiquement entre 120 °C et 180 °C) telles qu'utilisées dans les procédés de stérilisation habituels (chaleur sèche et autoclave) [28]. Comme nous l'avons déjà précisé, la caséine peut effectivement s'hydrolyser et se décomposer à hautes températures (> 100 °C) [29]. Les étapes stérilisantes de chaque protocole sont les suivantes :

V.3.2-1. ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag « produits bruts de synthèse »

Nous avons considéré que les conditions hydrothermales sous lesquelles ces solides ont été synthétisés (6 jours à 100 °C sous pression autogène) dans des récipients hermétiquement fermés ont permis leur stérilisation. De plus, lors de la récupération des solides par filtration et lavage, de l'eau distillée stérilisée par autoclave a été uniquement utilisée (Varioklav 400 H + P, 20 min à 121 °C et 100 KPa). Ils ont ensuite été stockés et séchés à 70 °C dans des boîtes de Pétri en verre stériles. Il est important de noter que le matériel utilisé (entonnoir Büchner, boîtes de Pétri en verre, pinces et spatules métalliques) ont tous été stérilisés par chaleur sèche en étuve pendant 1 h à 180 °C.

V.3.2-2. Zincophosphates calcinés (ZnPOs-750 et ZnPOs/Ag-750)

Les solides ont été stérilisés lors de leur calcination en four à moufle pendant 4 h à haute température (750 °C). Après leur traitement thermique, ils ont été conservés dans des boîtes de Pétri stériles fermées à l'aide de bandelettes paraffinées.

V.3.3. Propriétés d'hydratation et d'autofluorescence des zincophosphates contenant de la caséine

Les propriétés physico-chimiques d'hydratation et d'autofluorescence de l'échantillon ZnPO/CN (sans Ag) ont été identifiées dans un premier temps au microscope à épifluorescence classique Olympus BX51 (voir chapitre II), l'échantillon ayant été préalablement inoculé avec *E. coli* K12 SCC1 puis placé à incubation pendant 3 h à 30 °C.

V.3.3-1. Hydratation

Des observations sur le microscope en lumière blanche (Figure V-4) ont mis en évidence le gonflement de l'échantillon ZnPO/CN après son exposition à la suspension bactérienne liquide en raison probablement de l'affinité de la caséine pour l'eau [30, 31]. Ce comportement peut être assimilé à un caractère hydrogel de la caséine présente dans le solide [32] après contact avec le milieu aqueux. Il faut noter que, la formation d'une surface très accidentée, présentant des bosses qui sont dues au gonflement de la caséine, a rendu difficile l'acquisition d'images nettes au microscope à épifluorescence.

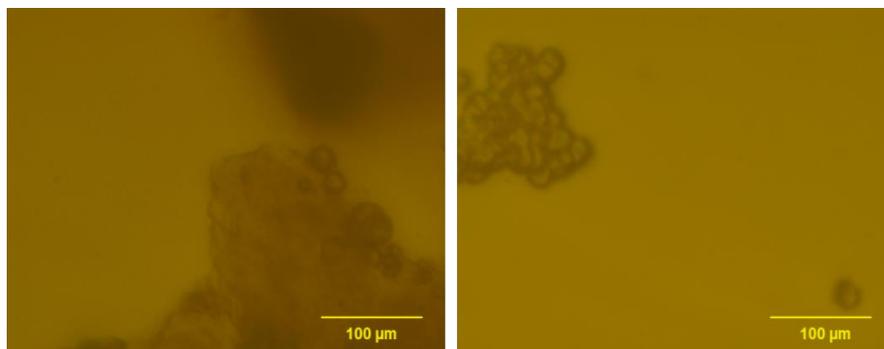


Figure V-4. Images de microscopie à épifluorescence en lumière blanche de l'échantillon ZnPO/CN préalablement inoculé avec des bactéries *E. coli* K12 SCC1. Images acquises avec un objectif 50X à l'air pendant 4 s de durée d'exposition.

V.3.3-2. Autofluorescence

L'autofluorescence de l'échantillon ZnPO/CN a été également constatée. L'image présentée sur la Figure V-5(a) suggère que la fluorescence de l'échantillon est d'intensité au moins équivalente à celle d'*E. coli* K12 SCC1 (2 s de durée d'exposition). Ceci a rendu très difficile l'identification des bactéries adhérentes à la surface du matériau. Notons que

l'autofluorescence du matériau ZnPO/CN était attendue suite aux analyses par spectrofluorimétrie réalisées à l'état solide (Hinostroza *et al.* (2016), chapitre III). L'échantillon a en effet été montré comme émettant une fluorescence verte correspondant à une longueur d'onde d'émission maximum autour de 505 nm, très proche de celle émise par la GFP d'*E. coli* K12 SCC1 (émission à 508 nm). D'après la publication du chapitre III, l'autofluorescence du matériau peut être attribuée à la présence de la caséine dans l'échantillon.

Des tests d'adhésion de bactéries *E. coli* K12 SCC1 sur wafer de silicium (Figure V-5(b)) ayant confirmé que la fluorescence de la bactérie est perceptible sur un matériau non ou peu fluorescent, même pour 1s de temps d'exposition, les études ont été menées avec un microscope confocal à balayage laser (Carl ZEISS LSM700) qui permet d'éviter la diffusion de la fluorescence provenant des zones voisines.

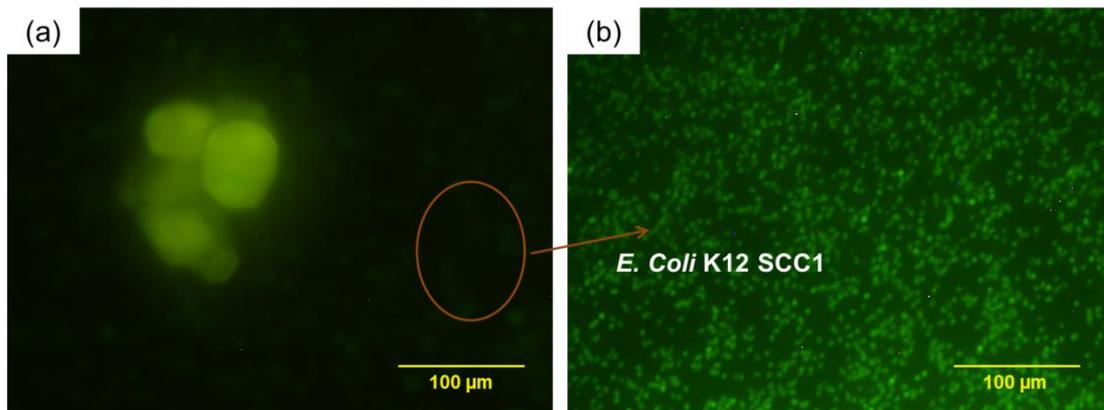


Figure V-5. Observations au microscope à épifluorescence des échantillons (a) ZnPO/CN et (b) wafer de silicium préalablement inoculés avec *E. coli* K12 SCC1. Images acquises avec un objectif 50X à air pendant 2 s et 1 s de durée d'exposition respectivement.

Comme le montre un exemple d'image acquise du solide ZnPO/CN au microscope confocal après son exposition aux bactéries *E. coli* K12 SCC1 (Figure V-6), une amélioration significative de la qualité de l'image en résolution et contraste est ainsi obtenue en comparaison des images acquises au microscope à épifluorescence classique (Figure V-5). La fluorescence du solide a en effet été atténuée par rapport à celle des bactéries attachées à sa surface.

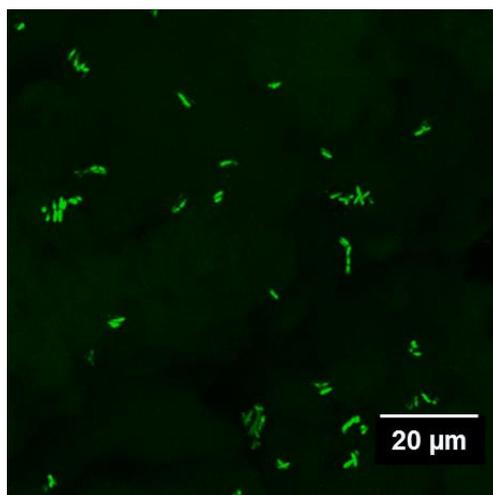


Figure V-6. Observation au microscope confocal à balayage laser. Projection 2D selon l'axe z d'une image 3D de l'échantillon ZnPO/CN présentant des bactéries *E. coli* K12 SCC1 adhérentes à sa surface.

V.4. Publication

Les résultats concernant la synthèse des zincophosphates enrichis en argent et l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes sur la bactérie *E. coli* K12 SCC1 sont présentés dans la publication ci-après qui va être bientôt soumise.

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF BIOSOURCED POROUS ZINC PHOSPHATES LOADED WITH AG NANOPARTICLES PREPARED FROM CASEIN PHOSPHOPROTEIN BY HYDROTHERMAL SYNTHESIS

Jessica Hinostroza Ramos, Karine Anselme, Angélique Simon-Masseron
and Lydie Ploux

Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), UMR 7361, CNRS /
Université de Strasbourg (UDS) / Université de Haute Alsace (UHA),
ENSCMu, 3 bis rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse Cedex, France,
15 rue Jean Starcky BP2488, 68057 Mulhouse cedex, France.

Abstract

An original biosourced synthesis route of zinc phosphates loaded with Ag nanoparticles is reported. Hopeite ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) enriched in casein and Ag nanoparticles (0.5 wt.%) (named ZnPO/CN/Ag) was prepared under hydrothermal conditions at 100 °C and pH 4.2 from the mixture of casein, zinc (II) and Ag (I) nitrate solutions. Ag nanoparticles were *in situ* formed and co-crystallized with hopeite. A casein-free material enriched in zinc phosphates phases and Ag nanoparticles (6.4 wt.%) (named ZnPOs/Ag-750) was obtained after calcination of the as-synthesized sample and complete casein combustion at 750 °C. Morphology, porosity and crystallinity of both materials were characterized. Their antibacterial properties were investigated with an *Escherichia coli* K12 strain under fluorescence microscopy. Aside from weak bacterial retention on zinc phosphates, bacterial proliferation measurement between 2 and 3 hours of material exposition to bacteria revealed a significant bactericidal effect of ZnPOs/Ag-750, while ZnPO/CN/Ag tend to inhibit bacterial proliferation. This is attributed to release of Ag^+ ions into culture medium in bactericidal (10^{-5} M) and bacteriostatic ($< 5 \times 10^{-6}$ M) concentrations. The antibacterial properties offered by ZnPOs/Ag-750 are of interest for applications in the field of water decontamination.

1. Introduction

Metal phosphates have received great attention because of their versatile applications, mainly as catalysts, molecular sieves, optical materials and anticorrosive pigments [1-3]. Among these materials, zinc phosphates (amorphous phases, hopeite) have also shown to be interesting materials in dentistry applications as luting cements due to their good adhesion, biocompatibility and low solubility in water–biological environments [4, 5]. In this context, antibacterial properties of freshly prepared zinc phosphate cements have been shown on *Streptococcus mutans* bacteria. They were attributed to zinc release and were strongly reduced after cement hardening [6-8]. Moreover, materials based on zinc–calcium phosphates have shown to promote bone regeneration for medical applications thanks to the essential function of zinc in bone tissue development [9-11].

Development of silver-based compounds including metal phosphates is of constant interest for biomedical and environmental applications due to the antimicrobial activity of Ag^+ ions on different Gram-positive and Gram-negative strains of bacteria, associated to their low toxicity for human cells compared to other heavy metals [12, 13]. Bactericidal activity of Ag^+ ions is attributed to the combination of different biocide actions leading to death of the bacterium. The most frequently reported ones are degradation of bacterial cell wall by interaction of Ag^+ ions with the membrane, and inactivation of protein synthesis and DNA replication by formation of Ag-S bounds with the thiol groups of enzymes [12, 14, 15]. With this purpose, incorporation of Ag nanoparticles into materials is an efficient route for providing antibacterial properties in aqueous medium by allowing release of Ag^+ ions from Ag nanoparticles.

Furthermore, the use of inorganic matrices as supports of Ag nanoparticles attracts interest because of their advantages in stability, heat resistance and safety when compared to organic compounds. Studies have shown that inorganic structures such as zeolites, zinc oxide, titanium dioxide, phosphates, ceramics and glass are good carriers for Ag^+ ions releasing [16-19]. In this context, several studies about synthesis of metal phosphate materials loaded with Ag nanoparticles, mainly focused on hydroxyapatite (calcium phosphate) are reported. The incorporation of Ag nanoparticles into hydroxyapatite coatings has shown good results in the prevention of implant-associated bacterial infections, which is attractive in medical applications due to biocompatible properties of hydroxyapatite [20, 21]. Environmental application of hydroxyapatite has also been reported. An example of this application is the

development of a filter material composed of porous hydroxyapatite loaded with Ag nanoparticles [22] as a substitute to the typical zeolite/Ag, sand/Ag, fiberglass/Ag and resin/Ag filters used in water disinfection application [23-26]. To our knowledge, however, synthesis of zinc phosphates with Ag nanoparticles has never been reported, despite potential as an antimicrobial material for dental and environmental applications. On the other hand, biosourced synthesis currently gets important attention since the substitution of reagents from fossil resources by raw materials with living origin represents one of the major challenges in the synthesis of new materials. However, few studies on biosourced metal phosphates synthesis are available in the literature, except for calcium phosphate synthesis (hydroxyapatite) [27-29]. Biosourced zinc phosphates were reported for the first time in a recent work published by our group [30].

We report in this paper the first biosourced synthesis and properties of original porous antibacterial zinc phosphates loaded with Ag nanoparticles. Casein phosphoprotein from bovine milk is used as a substitute of the common inorganic phosphorus sources (i.e., H_3PO_4) typically employed in the hydrothermal synthesis of zinc phosphates [31, 32]. It is composed of four principal types of caseins (i.e., α_{s1} -, α_{s2} -, β - and κ -casein) in which phosphorus is present as colloidal calcium phosphate (CCP) (inorganic phosphorus) and phosphoserine residues (-SerP-) (organic phosphorus) [32]. The second role of casein in this reported new process is to permit *in situ* synthesis of Ag nanoparticles without the use of any additional reducing agents such as the commonly used hydrazine and sodium borohydride [33, 34]. We especially studied the influence of calcination conditions on the composition of so-produced zinc phosphate crystal phases, size of Ag nanoparticles and textural properties. Solids were characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy, thermal analysis, nitrogen adsorption and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy.

Antibacterial properties of the zinc phosphates loaded or not with Ag nanoparticles were investigated. An *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 strain was chosen as a model microorganism for its common use as an indicator of microbial water contamination [35]. *E. coli* are also frequently involved in common bacterial infections related to water such as traveler's diarrhea [36]. Short-term colonization and proliferation on zinc phosphate material surfaces was analyzed by using fluorescence microscopy. They were related to the concentrations of Ag^+ and Zn^{2+} ions released from material samples, which were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy.

2. Experimental Section

2.1. Hydrothermal synthesis of zinc phosphate materials

The synthesis of zinc phosphates material with Ag nanoparticles was performed in two parts. In the first one, casein dispersion was prepared by adding 9.50 g (0.71 wt.% of P) of casein powder from bovine milk (Sigma-Aldrich, technical grade) to 190 mL of aqueous solution of hydroxide sodium 3.0 mmol. L⁻¹ (pH 11.5) (NaOH pellets, Sigma-Aldrich, ≥ 97%) under magnetic stirring for 30 min. A silver nitrate aqueous solution 0.12 mol. L⁻¹ (AgNO₃, Sigma Aldrich, ≥ 99%) was then added to casein dispersion under stirring for 20 min at room temperature. In the second part of the procedure, 32 mL of zinc nitrate aqueous solution 0.35 mol. L⁻¹ (Zn(NO₃)₂.6H₂O, Alfa Aesar, ≥ 99%) were added to the prepared casein/silver ion dispersion and finally the total reaction mixture was maintained under magnetic stirring for 20 min at room temperature. The resulting solution was transferred to a 500 mL polypropylene flask, and stored at 100 °C. After 6 days of heating, the product was filtered off, washed with distilled water and dried at 70 °C overnight. All chemicals reagents were used as received without further purification.

As-synthesized sample is named ZnPO/CN/Ag (ZnPO = zinc phosphate, CN = casein, Ag = silver). Additionally, a reference sample named ZnPO/CN was prepared by the same procedure without addition of silver ions. The molar composition of the starting mixtures is reported in Table 1.

Table 1. Molar composition of the starting mixtures heated at 100 °C for 6 days.

| Sample | ZnO | P ₂ O ₅ ^a | Na ₂ O | H ₂ O | Ag ⁺ | pH |
|------------|-------|--|-------------------|------------------|-----------------|-----|
| | (mol) | | | | | |
| ZnPO/CN/Ag | 1 | 0.093 | 0.027 | 1085 | 0.021 | 4.0 |
| ZnPO/CN | | | | | 0 | 4.5 |

^a P from casein protein (0.71 wt.% of P).

2.2. Influence of the calcination conditions

The as-synthesized samples were calcined in a muffle furnace at different temperatures from 250 °C to 750 °C using a heating rate of 5 °C. min⁻¹. They were cooled down to room temperature (20 ± 5 °C) before analyses. Samples were named : ZnPOs/Ag-250, ZnPOs/Ag-500, ZnPOs/Ag-600 and ZnPOs/Ag-750 for the calcined ones, which contain silver, and

ZnPOs-250, ZnPOs-500, ZnPOs-600 and ZnPOs-750 for the calcined samples without silver (reference samples).

2.3. Characterization of the zinc phosphate materials

Crystallinity of samples was characterized by X-ray powder diffraction (XRD). XRD patterns of the as-synthesized sample and calcined samples were recorded on a PANalytical X'Pert and a STOE-STADI-P diffractometer respectively. They were operating with a Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) for $2\theta = 3^\circ\text{--}70^\circ$ with steps of 0.02 or $0.28^\circ \cdot \text{s}^{-1}$ at room temperature. X'Pert HighScore software was used to identify the crystalline phases present in the samples by comparison of experimental diffraction patterns to reference patterns offered by the International Center for Diffraction Data (ICDD) (i.e., PDF-4+ powder diffraction files) [37]. Composition of samples was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

Morphology of samples was determined by Scanning Electron Microscopy (SEM) using a Philips XL30 microscope under vacuum of 10^{-5} mBar. Samples were dispersed on a support covered with a graphite conductive tab and then coated with a thin film of gold (10 nm to 20 nm deposited by using a BAL-TEC SCD 004 Sputter Coater equipment). Micrographs were obtained with accelerating voltage of 7 kV and at several magnifications.

Size of silver nanoparticles was evaluated by Transmission Electron Microscopy (TEM) with JEOL ARM200 equipment working at 200kV. TEM images were exploited using ImageJ[®] 1.50b software [38] to calculate average silver nanoparticles size and standard deviation from 10 images taken on each sample. EDX mapping were recorded using Centurio JED 2300 1sr detector coupled to TEM microscope.

Thermogravimetric (TGA) and differential thermal (DTA) analyses were performed on Setaram Labsys thermoanalyser. About 10 mg of sample contained in alumina crucible were placed into heating chamber. Measurements were recorded under air stream with heating rate of $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ up to $900 \text{ }^\circ\text{C}$.

Presence of micro- and mesopores in calcined samples was determined by nitrogen adsorption analysis at the liquid nitrogen boiling point on Micromeritics ASAP 2020 equipment. Samples were previously degassed at $150 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 h in vacuum. Specific surface area (S_{BET}) was determined by the BET (Brunauer, Emmett and Teller) multipoint method in the relative pressure range (p/p_0) of 0.05 to 0.30.

2.4. Antibacterial properties of the zinc phosphates

2.4.1. Bacterial strain and culture medium

Experiments were performed with *E. coli* K12 SCC1 strain [39], which emits fluorescence at 508 nm under adequate excitation (396 nm) thanks to chromosomal GFP (Green Fluorescent Protein) insertion [40]. Bacteria were stored in freezer at -80 °C. Nutritive M63G medium [41] (KH₂PO₄ 0.1M, (NH₄)SO₄ 20 wt.%, FeSO₄ 0.1 wt.%, MgSO₄ 20 wt.%, KOH 6 M, vitamin B1 0.05 wt.% and glucose 10 wt.%) adjusted to pH 6.8 was sterilized by autoclaving for 20 min at 121 °C and 100KPa before to be used for the culture of bacterial cells.

2.4.2. Microbial cell culture

Bacteria from frozen stock were inoculated on lysogeny broth (LB) agar plate (15 g. L⁻¹ in water) and incubated overnight at 30 °C. A first pre-culture was prepared from one colony of the so-cultivated bacteria in 10 mL of fresh M63G medium and incubated at 30 °C for 14 h. A second pre-culture was prepared with the first one (10 vol.% dilution) in 10 mL of fresh M63G medium and cultivated at 30 °C for 4 h. Bacterial suspension was centrifuged for 30 min at 30 000 rpm and pellet was re-suspended in 4 mL of fresh M63G medium. Absorbance of bacterial suspension, measured at 600 nm (Abs_{600nm}) was adjusted to 0.05, containing about 5x10⁶ bacteria/mL. This final bacterial suspension was used to perform the bacterial colonization experiments on zinc phosphate materials.

2.4.3. Zinc phosphate materials used for microbiological assays

Antibacterial activity of zinc phosphates materials was evaluated in their as-synthesized form (ZnPO/CN and ZnPO/CN/Ag) and after calcination at 750 °C (ZnPOs-750 and ZnPOs/Ag-750). Polished silicon wafer (SW) disk cut in squares (about 10 mm x 10 mm) was used as a control in the bacterial colonization assays. Zinc phosphates in powder form (m = 80–100 mg) were introduced into small sterile glass containers (diameter of 10 mm and height of 3 mm) until they were almost completely filled. Glass containers with zinc phosphate were then placed into Petri dishes (diameter of 35 mm and height of 10 mm). Since as-synthesized material samples were prepared under high temperature for a long enough period of synthesis (100 °C and 6 days), material sample was used without any additional sterilization treatments to prevent casein degradation. Furthermore, calcined material samples were sterilized during the thermal treatment at 750 °C for 4 h. It's important to note that all further manipulations of

material samples in microbiological assays were performed under sterile conditions. Silicon wafer samples were sterilized by dry heating at 180 °C for 1 h.

2.4.4. Bacterial colonization of zinc phosphates

Material samples were inoculated with 4 mL of bacterial suspension at Ab_{600nm} of 0.05. They were incubated for periods of 2 h and 3 h at 30 °C. Samples were then carefully rinsed with fresh NaCl solution (9 g. L⁻¹ in water) to eliminate non-adherent bacteria from material surface. For that purpose, 1 mL of liquid was removed by putting the pipette tip onto the wall of Petri dish without touching the material surface and was replaced by 1 mL of fresh NaCl solution. This rinsing process was repeated 8 times. It is important to note that material samples were kept immersed in the liquid during rinsing to avoid any detachment of adherent bacteria by creating material-air interface.

Colonization by bacteria of material samples was *in situ* analyzed in the last rinsing medium under confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss LSM700) equipped with 63X water-immersion objective (working distance of 2.4 mm) [42]. Fluorescence and reflection images were taken at the same time on 6 different locations of each material sample. Excitation sources at 488 nm and 405 nm respectively, and a 490–555 nm bandpass emission filter for the fluorescence data capture were used. At each location, stacks of 2D x,y images (interval of 1 µm in z-direction) were acquired. For each experiment, one sample of each material type was used. Experiment was repeated 6 times.

2.4.5. Effect of Ag⁺ ions released on bacterial viability

Effect of silver ions released from Ag nanoparticles on the viability of adherent bacteria was evaluated by staining with red-fluorescent propidium iodide (IP) (1 g. L⁻¹, ≥ 94% Sigma Aldrich), which penetrates bacteria with damaged membrane [43]. As the last rinsing step, material samples were rinsed with a solution of IP in NaCl at 4 mg. L⁻¹. They were then incubated for 15 min at 30 °C. Material samples were analyzed by confocal laser scanning microscopy according to the procedure described above (section 2.4.4) with emission fluorescence collected in the 600–700 nm range and excitation at 555 nm.

Quantification of Ag⁺ ions released in liquid was determined by ICP-AES in specific experiments. Then, samples were exposed to 4 mL of M63G medium free of bacteria during 3 h at 30 °C.

2.4.6. Image processing and statistical treatment

Adherent bacteria to material surfaces were quantified from fluorescence micrographs by using ImageJ[®] 1.50b software and plugins [38]. A total of 36 images were analyzed for each sample leading to calculation of the mean value and standard deviation associated to each material type. Significance of differences between the so-determined results was evaluated after using statistical Student's *t*-test with 95 % confidence interval.

2.4.7. Bacterial growth in zinc phosphate surroundings

Antibacterial effect of zinc phosphate materials and casein powder on bacteria growing without direct contact with materials was evaluated by on plate diffusion assay. Agar plates of LB medium containing 5 spaced wells (diameter of 5 mm and height of 4 mm) were fabricated by using previously sterilized cylindrical templates of Teflon[®]. 100 μ L of fresh bacterial suspension (Abs_{600nm} of 0.50, prepared from one colony of bacteria in 10 mL of M63G medium and cultivated for 14 h at 30 °C) was carefully spread on LB agar plate. Wells were filled out with samples of zinc phosphates and casein reagent as used for zinc phosphate preparation and incubated overnight at 30 °C. Bacterial growth around samples was observed in order to identify the potential presence of growth inhibition zone (expressed in cm^2). Experiment was conducted in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Preparation and characterization of zinc phosphates loaded with Ag nanoparticles

XRD patterns of the as-synthesized ZnPO/CN/Ag and ZnPO/CN (reference sample) are reported in Figure 1. Two compounds are identified in each samples : (i) a major amorphous phase characterized by two broad peaks centered at i.e., 9° and 19°(2 θ) which are ascribed to amorphous casein (Figure 1c) and (ii) a crystalline zinc phosphate phase named hopeite ($Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$, PDFn°00-037-0465). ZnPO/CN/Ag sample contains an additional Ag phase characterized by three peaks observed at i.e., 38.1°, 44.2° and 64.4° (2 θ) (Figure 1a) corresponding to the (1 1 1), (2 0 0) and (2 2 0) diffraction planes of the face-centered cubic (fcc) silver, respectively (PDFn°00-004-0783). No diffraction peaks of silver oxide or other impurities were detected. XRD results reveal that Ag crystallization is not hampered by the co-crystallization of hopeite. Using the XRD Scherrer method, an average Ag crystal size of 27 nm is obtained.

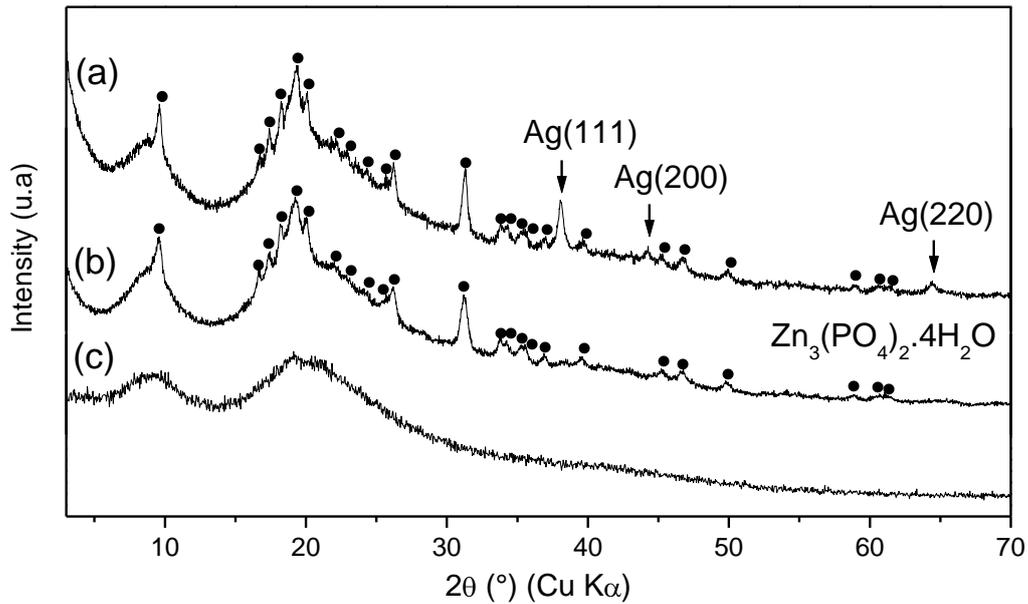


Figure 1. XRD patterns of as-synthesized products obtained by hydrothermal procedure at 100 °C for 6 days (a) ZnPO/CN/Ag (b) ZnPO/CN and (c) casein powder.

TEM images and particle size distribution histogram of the ZnPO/CN/Ag sample are reported in Figure 2. TEM observations reveal the existence of spherical Ag nanoparticles fairly well distributed in the solid. Their distribution particle size shows that they have an average particle size of 26.6 ± 10.4 nm with some aggregates of about 40 nm to 60 nm. These results are in agreement with the value obtained from Scherrer's method.

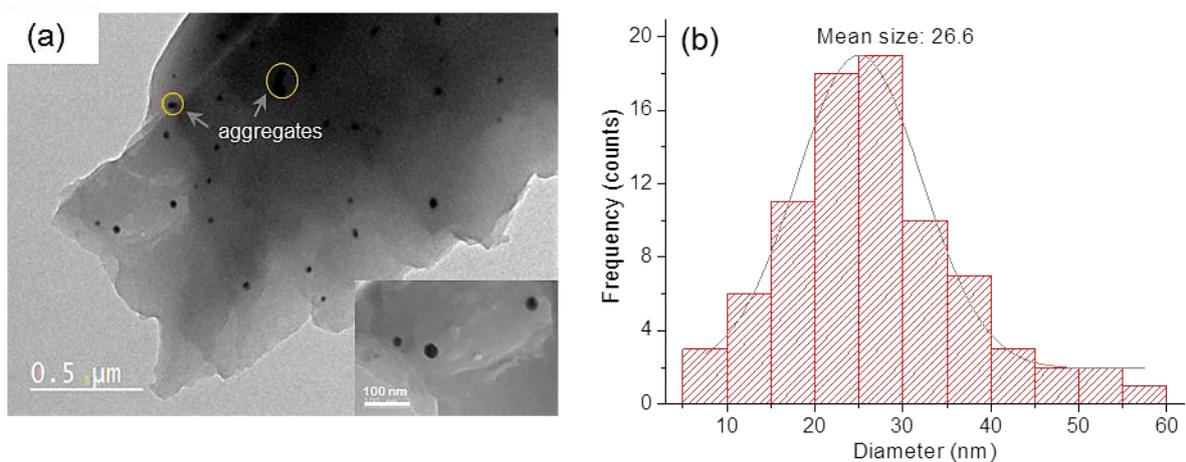


Figure 2. (a) TEM images of the as-synthesized ZnPO/CN/Ag with an inset, a zoom of Ag nanoparticles, and (b) Ag particle size distribution in sample.

The formation of these Ag nanoparticles is first due to the incorporation of a silver nitrate solution to dispersion of casein micelles in alkaline medium (pH ~ 5), which involves the formation of casein-Ag⁺ ion complexes thanks to electrostatic interactions between Ag⁺ ions and functional groups of amino acids present in casein molecules such as amine (-NH₂), thiol (-SH) and carboxyl (-COOH) groups [33, 34]. At this step, no evident color change was observed between the casein/Ag⁺ ions dispersion and casein dispersion (reference) suggesting that Ag particles are not immediately formed at least at room temperature. The concentration of NaOH (i.e., 3.0 mmol. L⁻¹) may have been low to promote the reducing capacity of casein protein leading to an incomplete reduction of Ag ions [34]. In the second part of the procedure, the final mixture obtained by incorporation of a zinc nitrate solution in the casein/Ag⁺ ions dispersion and leading to pH 4.2 involves the solubilization of colloidal calcium phosphate (CCP) (inorganic phosphorus) present in casein molecules [44]. Released phosphate ions react with Zn²⁺ ions in order to form the hopeite. Moreover, the dark-brown color of the product obtained during the synthesis at 100 °C suggests the formation of Ag particles in the solid when compared to the brown product obtained without utilization of silver in the synthesis (reference sample). It suggests that casein-Ag⁺ ion complexes previously formed react *in situ* to produce Ag particles which are probably stabilized by casein as previously observed by Ashraf *et al.* [33]

3.2. Influence of thermal treatment

As-synthesized ZnPO/CN/Ag sample was calcined at different temperatures from 250 °C to 750 °C to study thermal influence on the crystallization process (Figure 3, Table 2). XRD results for samples heated at 250 °C show a broad band centered at about 20° (2θ) (casein) and few small not identified peaks (Figure 3d). This indicates transformation of hopeite with thermal treatment. Absence of detection of crystallized silver suggests possible thermal instability of the Ag nanoparticles in presence of casein associated to a low sensitivity of the diffractometer used for calcined samples. The amorphous solid recrystallizes then at 500 °C (Figure 3c) mainly into zinc orthophosphate α-Zn₃(PO₄)₂ (PDFn°00-029-1390). For higher calcination temperatures from 600 °C to 750 °C (Figure 3a,b), crystallization of α-Zn₂P₂O₇ (PDFn°00-008-038) probably induced by phosphate groups of the phosphoserine residues released during the casein combustion occurs. In addition, better crystallization of Ag⁰ is observed at 600 °C as indicated by the sharpening and the higher intensity of the Ag peaks at 38.1°, 44.2° and 64.4° (2θ). Another compound, probably silver zinc orthophosphate of

$\text{Ag}_3\text{Zn}_6(\text{PO}_4)_5$ type (PDFn°00-038-0302) crystallizes from 600 °C. This suggests that either part of Ag nanoparticles are oxidized by PO_4^{3-} species present in sample,^{45,46} as indicated by decreases of Ag peaks intensity at 750 °C, or silver atoms not implicated in Ag^0 crystallization at temperature lower than 600 °C participate in crystallization of this new compound. Furthermore, in the absence of Ag in the starting mixture, the same zinc phosphate phases crystallize (i.e., $\alpha\text{-Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, $\gamma\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$ and $\alpha\text{-Zn}_2\text{P}_2\text{O}_7$, hopeite).³⁰

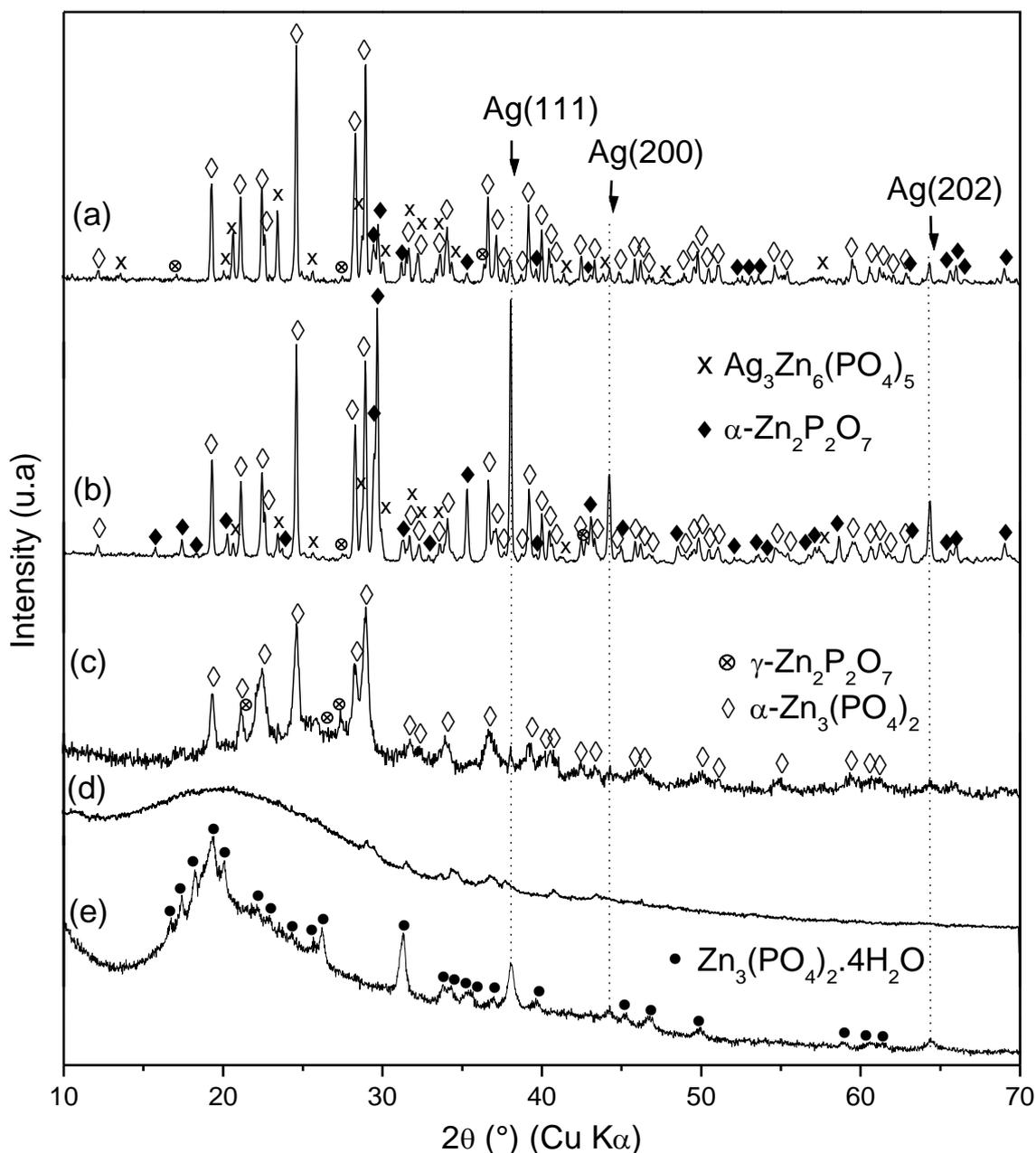


Figure 3. XRD patterns of as-synthesized ZnPO/CN/Ag calcined at temperatures between 250 °C and 750 °C for 4 h with heating rate of 5 °C. min⁻¹: (a) ZnPO/Ag-750; (b) ZnPO/Ag-600; (c) ZnPO/Ag-500; (d) ZnPO/Ag-250; (e) ZnPO/CN/Ag.

Table 2. XRD analyses of sample ZnPO/CN/Ag calcined at different temperatures.

| Sample | Temperature (°C) | Result (XRD) |
|--------------|------------------|---|
| ZnPO/CN/Ag | RT | casein ^a + hopeite ^b + Ag |
| ZnPOs/Ag-250 | 250 | a.p ^c + n.id (traces) |
| ZnPOs/Ag-500 | 500 | α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ ^a + γ -Zn ₂ P ₂ O ₇ (traces) + a.p ^c , Ag (traces) |
| ZnPOs/Ag-600 | 600 | Ag + α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ + α -Zn ₂ P ₂ O ₇ + γ -Zn ₂ P ₂ O ₇ (traces) + Ag ₃ Zn ₆ (PO ₄) ₅ (traces) |
| ZnPOs/Ag-750 | 750 | α -Zn ₃ (PO ₄) ₂ ^a + α -Zn ₂ P ₂ O ₇ + Ag + γ -Zn ₂ P ₂ O ₇ (traces) + Ag ₃ Zn ₆ (PO ₄) ₅ |

^a Major phase. ^b Zn₃(PO₄)₂.4H₂O. ^c a.p : amorphous phase. RT : room temperature (sample before calcination). n.id : not identified.

According to the chemical analyses (Table 3), Ag, Zn and P weight percentages in ZnPO/CN/Ag are lower than in ZnPOs/Ag-750, as expected due to the predominance of casein in sample before calcination. As calcium cations are undetectable in as-synthesized samples but measurable in casein (i.e., 0.15 wt.%), colloidal calcium may have been almost completely solubilized with Ca²⁺ ions eliminated in the filtrate of as-synthesized sample, while phosphate ions may have been used for the synthesis of hopeite. The presence of calcium in calcined samples could suggest that Ca²⁺ ions residues from casein protein in as-synthesized samples made electrostatic interactions with zinc phosphates during the calcination, probably by compensation of some negative charges formed in calcined sample at 750 °C.

Table 3. Chemical analyses (weight %) of casein, as-synthesized and calcined (at 750 °C) samples.

| Sample | Ag (%) | Ca (%) | P (%) | Zn (%) |
|--------------|-----------|----------------|---------------|---------------|
| ZnPO/CN | - | < 0.003 | 0.84 (±0.03) | 2.41 (±0.06) |
| ZnPO/CN/Ag | 0.57±0.01 | < 0.003 | 1.04 (±0.41) | 3.09 (±0.06) |
| ZnPOs-750 | - | 0.063(±0.002) | 15.60 (±0.54) | 45.64 (±1.40) |
| ZnPOs/Ag-750 | 6.39±0.26 | 0.105(±0,003) | 14.07 (±0.48) | 46.75 (±1.89) |
| Casein | - | 0.145 (±0.004) | 0.77 (±0.03) | - |

Simultaneous TG and DT analyses were performed with as-synthesized ZnPO/CN/Ag and ZnPO/CN samples. As expected, TGA and DTA curves shown in Figure 4 have similar profiles to those of casein because of the significant presence of casein in samples as revealed by XRD (Figure 1). A first weight loss between room temperature and 200 °C on the TGA curves is related to physisorbed water. It is associated to the small endothermic peak centered at about 100 °C on the DTA curves. Three main weight losses ascribed to the decomposition of casein are observed between 200 °C and 780 °C, which are represented by the exothermic broad bands in the DTA curves with a maximum at about 520 °C. The higher values of exothermic enthalpy observed with ZnPO/CN/Ag when compared to ZnPO/CN sample suggest that the presence of Ag nanoparticles protected by casein leads to increase the energy required to the casein decomposition. Weight losses obtained from TGA curves of as-synthesized ZnPO/CN/Ag and ZnPO/CN samples are summarized in Table 4. They indicate that samples have a similar content of casein.

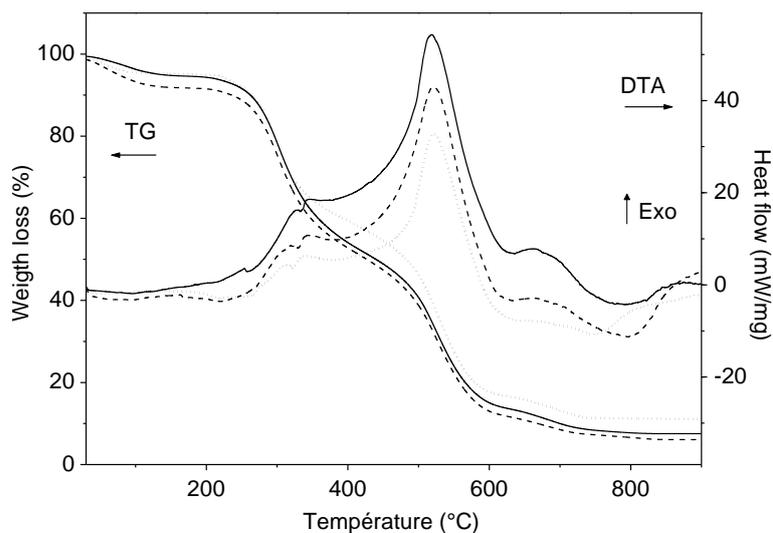


Figure 4. TGA and DTA results obtained under air for ZnPO/CN/Ag (black curves), ZnPO/CN (dash black curves) and casein powder (dot black curves).

Table 4. Weight loss percentages of the as-synthesized ZnPO/CN/Ag and ZnPO/CN determined on the TGA curves.

| Sample | Until 200 °C (wt.%) | From 200 °C to 780°C (wt.%) |
|------------|------------------------|--------------------------------|
| ZnPO/CN/Ag | 5.7 | 86.4 |
| ZnPO/CN | 8.5 | 84.6 |

Furthermore, influence of calcination temperature on the particle size of silver nanoparticles was investigated by TEM (Figure 5). The elemental (Ag) mapping led to highlight silver nanoparticles/aggregates (bigger pink spots). Nanoparticles size is of $9 (\pm 2)$ nm, $25 (\pm 7)$ nm and $6 (\pm 3)$ nm for samples calcined at 500, 600 and 750 °C respectively. The formation of aggregates of Ag nanoparticles with size around 80 nm is more important at 600 and 750 °C. Such big aggregates that were not observed in the as-synthesized sample may be formed through the combustion of casein. This last one which stabilizes silver nanoparticles in the as-synthesized sample brings them closer during its decomposition leading formation of bigger aggregates.

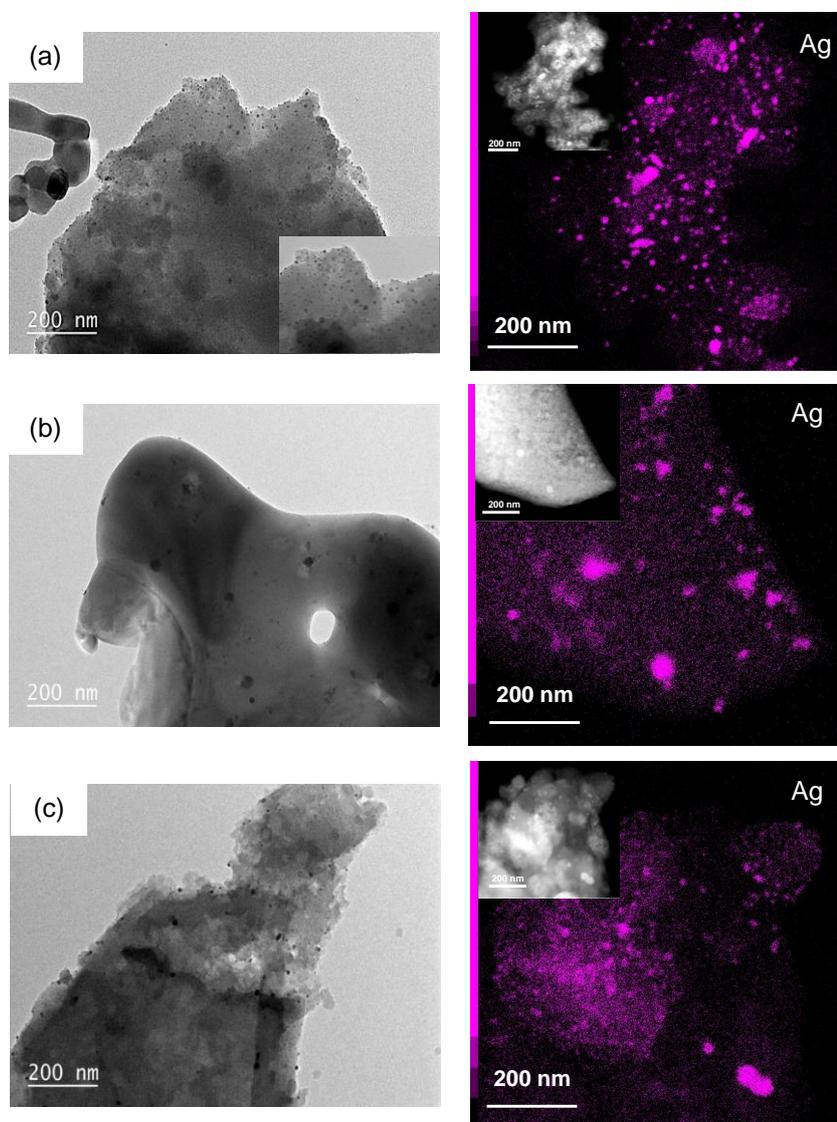


Figure 5. TEM images and their elemental (Ag) mapping images (right) of : a) ZnPOs/Ag-750, b) ZnPOs/Ag-600 and c) ZnPOs/Ag-500.

SEM analyses of as-synthesized ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-500, -600 and -750 samples reported in Figure 6 show a surface composed of large irregular particles with undefined shape and rough surface for the as-synthesized sample (Figure 6a).

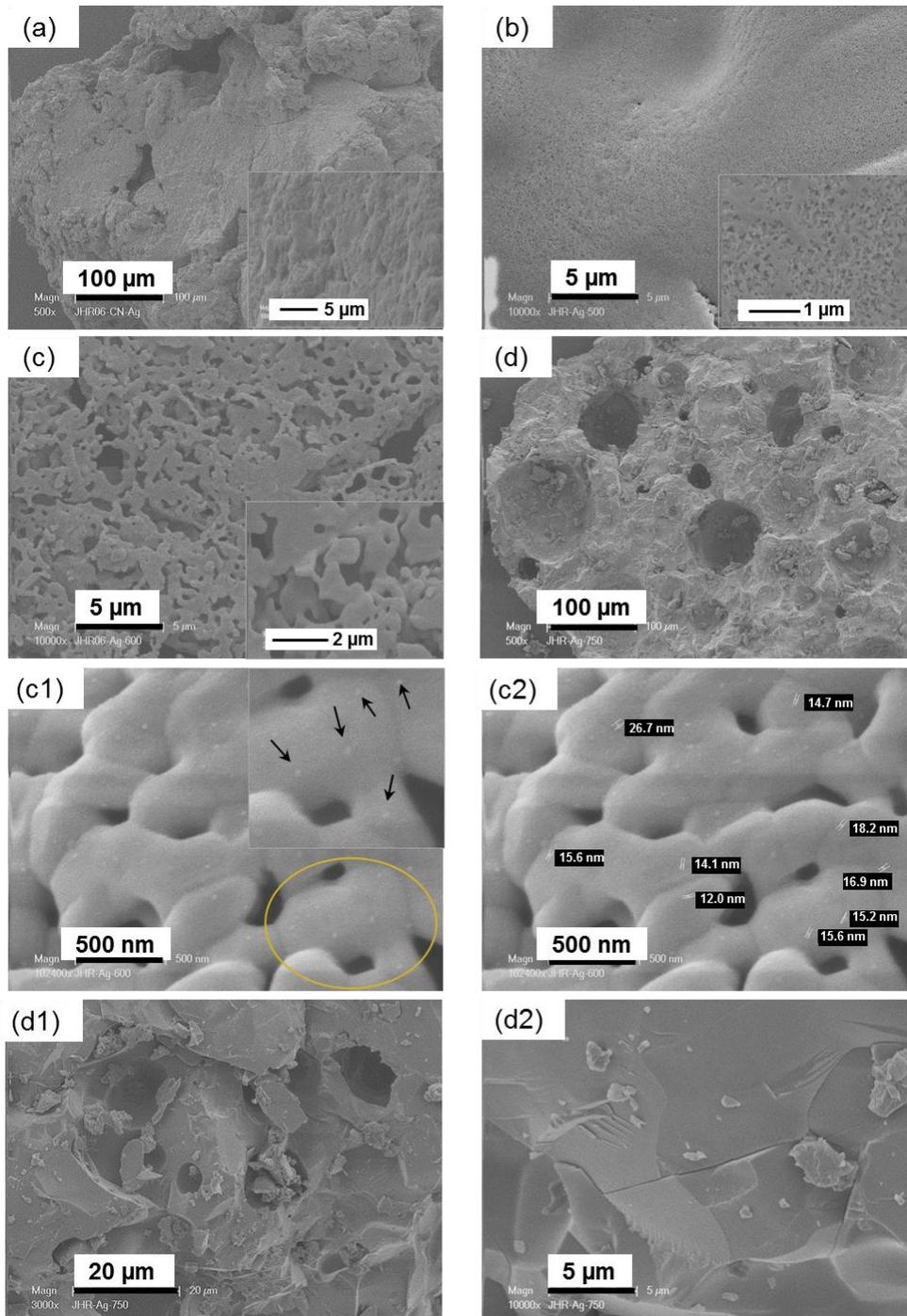


Figure 6. SEM images of (a) ZnPO/CN/Ag, (b) ZnPOs/Ag-500, (c, c1–2) ZnPOs/Ag-600. Inset in Figure c1 displays a zoom of the area enclosed showing Ag nanoparticles with particle size from 14 nm to 27 nm also observed in Figure c2, and (d, d1–2) ZnPOs/Ag-750.

At 500 °C, pores are formed (diameter : 0.05–0.2 µm). Macroporosity increased at 600 °C with heterogeneous pore size distribution (between i.e., 0.10–1.7 µm) and not well-defined pore shape. This macroporosity disappeared at 750 °C (sintering phenomenon) and crystals have a rough surface with presence of some large quasi-spherical pores with heterogeneous pore diameter (17 µm to 100 µm) (Figure 6(d, d1 et d2)). In the case of sample calcined at 600 °C, silver nanoparticles and aggregates are observed as white particles (Figures 6(c1, c2)).

In addition, nitrogen adsorption measurements revealed that calcined samples have very low specific surface area, $S_{\text{BET}} < 3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and they do not contain micro- or mesopores.

3.3. Antibacterial activity of zinc phosphates

3.3.1. Effect on bacterial growth of compounds potentially released from zinc phosphates in material surroundings

Bacterial growth in near surroundings of material samples was investigated by depositing samples on nutritive agar plates inoculated with bacterial suspension, allowing diffusion of compounds from material samples. Assays revealed the presence of a zone of bacterial growth's inhibition clearly defined around ZnPOs/Ag-750 sample ($0.79 \pm 0.23 \text{ cm}^2$) compared to the other samples (Figure 7). This is ascribed to the antibacterial activity of Ag^+ ions released by the oxidation of Ag nanoparticles contained in the material in contact with liquid [12, 47], and diffused through the agar gel. In contrast, such inhibition zone was not observed for ZnPO/CN/Ag samples, probably due to the lower silver content (Table 3). In addition, results indicate that Ag-free ZnPO/CN and ZnPOs-750 samples did not release in a sufficient quantity any substance able to inhibit *E. coli* growth. Moreover, casein powder was shown to provide a weak antibacterial effect ($0.25 \pm 0.16 \text{ cm}^2$) after overnight incubation (Figure 7) as already reported in literature [48]. These results indicate that ZnPO/CN did not release any sufficient quantity of casein to provide any noticeable antibacterial effect.

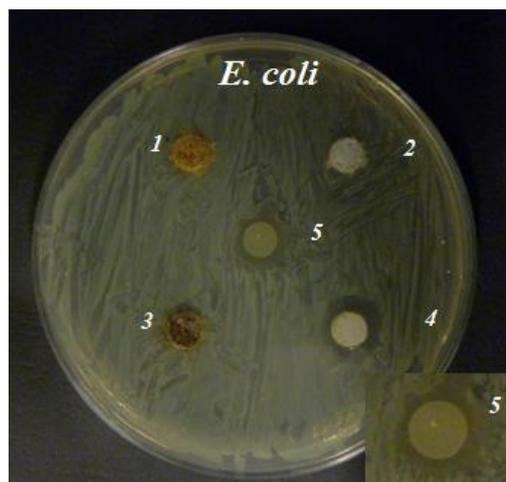


Figure 7. Antibacterial activity on *E. coli* by zone of growth inhibition assay after overnight incubation (Inset a zoom of sample 5). (1) ZnPO/CN, (2) ZnPOs-750, (3) ZnPO/CN/Ag, (4) ZnPOs/Ag-750 and (5) casein samples on *E. coli* K12.

3.3.2. *Escherichia coli* colonization of ZnPO/CN and ZnPOs-750 materials

Bacterial colonization was investigated on zinc phosphate materials using *E. coli* K12 *SCC1* strain. Figure 8a(1-3) shows typical examples of micrographs acquired by fluorescence microscopy after 3 h of incubation. It can be noted that : a) bacteria are randomly distributed on ZnPO/CN material surface with slightly preferential location in surface cavities such as surface irregularities that could have been formed by swelling of casein (Figure 8(a2)), b) a weak autofluorescence level of material surface is observed on ZnPO/CN material which is ascribed to casein content [30], more specifically to β -casein component [49], in accordance to the fluorescence attenuation observed after casein's elimination by material calcination (Figure 8(a3)), c) the presence of macroporosity in ZnPOs-750 sample (pore diameter between 350 and 1000 nm) [30] may also have contributed to bacteria's retention in ZnPOs-750 macropores compared to ZnPO/CN.

Quantitative results are displayed in Figure 8b that shows the number of fluorescent adherent bacteria per cm^2 determined on ZnPO/CN and ZnPOs-750 surfaces after 2 h and 3 h of incubation. Statistical evaluation reveals that these surfaces are significantly unfavorable to bacteria colonization when compared to SW control. Results also show a significant difference in the amount of adherent bacteria on ZnPO/CN and ZnPOs-750 surfaces with a notably lower adherent population observed on ZnPO/CN surface for both 2 h and 3 h of incubation (Figure insert in 8b). This pronounced antibacterial effect of ZnPO/CN material is

ascribed to the important casein content (~ 85%), which has been suspected to possess antibacterial properties [48, 50] and displays as reported before (section 3.3.1) a weak antibacterial effect able to inhibit *E. coli* growth. On the other hand, casein is also known to reveal hydrogel character (high hydration and swelling when immersed in liquid) [51, 52]. As demonstrated elsewhere [53], this may be associated to soft mechanical properties likely to prevent bacterial adhesion and colonization.

Bacterial proliferation was also evaluated, based on the comparison between zinc phosphate colonization after two different periods of exposure to bacteria. As shown in Figure 8a by the evolution of adherent bacteria number with time, bacterial proliferation was affected by the nature of material sample. ZnPO/CN and ZnPOs-750 materials (Figure 8b) showed a significant increase in the number of adherent bacteria between 2 h and 3 h of incubation (about +57% and +20% respectively), as expected due to normal growing of bacterial population on surfaces. Nevertheless, proliferation on these materials is significantly less than those measured on silicon wafer (SW) control (about of +87%) (Table 5). This is attributed to casein released from ZnPO/CN (as reported above and discussed in section 3.3.3) and to ions such as Zn^{2+} , which could release from all types of zinc phosphate materials (Table 6) and are known to exhibit diverse inhibitory effects on bacteria [54, 55].

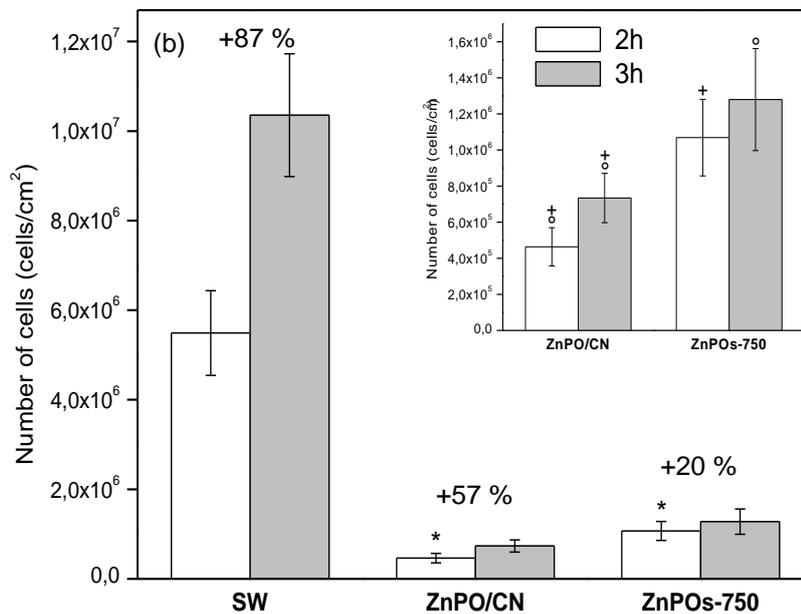
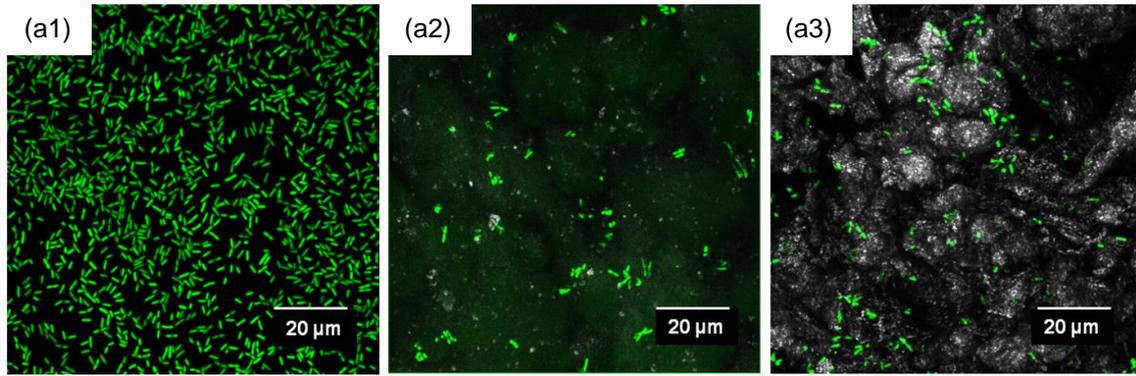


Figure 8. (a) 2D z- projection of confocal 3D images of *E.coli* K12 bacteria adherent on (a1) SW, (a2) ZnPO/CN and (a3) ZnPOs-750 materials after 3 h of incubation. (b) Number of bacteria on ZnPO/CN, ZnPOs-750 materials and a SW control after 2 h and 3 h of incubation. *, ° symbols indicate significant differences compared to SW after 2 h and 3 h of incubation respectively. The inset is a zoom of the histogram showing the number of bacteria on ZnPO/CN and ZnPOs-750 materials. °, + symbols indicate significant differences compared to ZnPOs-750 after 2 h and 3 h of incubation respectively. Significance level: *p-value* < 0.05.

3.3.3. *Escherichia coli* colonization of ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 materials

Antibacterial activity on adherent bacteria related to content of ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 materials in Ag nanoparticles was expected when compared to their equivalent Ag-free materials (ZnPO/CN and ZnPOs-750 respectively). Bacterial colonizations

of Ag-containing and Ag-free materials are reported in Figure 9. Figure 9a(1-3) shows typical examples of micrographs acquired by fluorescence microscopy after 3 h of incubation. Bacteria have heterogeneous distributions on materials with preferential presence in crevices (Figure 9(a2)). Autofluorescence of ZnPO/CN/Ag material, which is attributed to casein, was attenuated for ZnPOs/Ag-750 thanks to elimination of casein through calcination as also noted for materials without Ag (Figure 8(a3)). After 2 h of incubation, a significant difference was observed between numbers of adherent bacteria on Ag-based (ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750) and Ag-free materials (ZnPO/CN and ZnPOs-750 respectively) (Figure 9b). The significant reduction of bacterial population on ZnPOs/Ag-750 sample compared to ZnPOs-750 reveals an antibacterial effect of ZnPOs/Ag-750 ascribed to the bactericidal effect of Ag content in sample. Accordingly, Ag^+ concentration in culture medium was of about 10^{-5} M (see the values of Ag^+ ions concentration after 3 h of incubation, Table 6), i.e. high enough to induce death of bacteria and subsequent reduction of the bacterial population [56, 57]. In contrast, the detection of slightly greater amount of adherent bacteria on ZnPO/CN/Ag surface compared to ZnPO/CN (Figure 9b) may be the result of a possible sub-inhibitory effect of the low Ag^+ concentration released in the culture medium (lower than 4.8×10^{-6} M). Indeed, several studies have reported that sub-inhibitory concentrations of antibacterial agents are able to induce changes in the ability of bacteria to form biofilms or to adhere to host cells [58-61]. In particular, notable enhancement of bacterial biofilm formation was highlighted by Hoffmann *et al.* for glucosamine antibiotics [62]. However, no similar phenomenon through exposure to sub-inhibitory concentrations of Ag ions has been reported so far.

On the other hand, no significant differences were observed in the number of bacteria adhered on ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 samples after 2 h of incubation, although materials have different silver contents (Figure 9b, Table 3). This is ascribed to the preventive effect on bacterial adhesion of the hydrogel character of casein contained in ZnPO/CN/Ag material (as discussed in section 3.3.2), which is high enough to reach a population reduction similar to those obtained through the bactericidal effect provided by Ag^+ released from ZnPOs/Ag-750 samples.

Influence of Ag content of materials on bacterial proliferation on their surface was also investigated (Figure 9c). A significant reduction of adherent bacteria number on ZnPOs/Ag-750 was observed between 2 h and 3 h of incubation ($\sim -19\%$, Figure 9c and Table 5) in agreement with the expected efficiency of the Ag^+ concentration released in the medium

($\sim 10^{-5}$ M). On the other hand, ZnPO/CN/Ag sample showed an increase of about +22% in the bacterial population, in accordance with the small quantity of Ag^+ ions released from oxidized Ag nanoparticles at 3 h of incubation (concentration lower than 4.8×10^{-6} M). As specified above, this concentration is not high enough to completely block bacterial proliferation or kill bacterial cells, even if it can significantly inhibit bacterial growth in comparison with the corresponding Ag-free material ($\sim +57\%$ for ZnPO/CN) and with SW control ($\sim +87\%$) (Table 6). These results highlight the difference of intensity between the Ag^+ -related antibacterial effects acting on the two different types of Ag-containing materials, from slightly inhibitory to bactericidal effects observed on ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 materials respectively. This is attributed to the large difference of Ag content between materials (about 10 times more Ag amount in ZnPOs/Ag-750 material compared to ZnPOs/CN/Ag one, as reported in Table 3). In addition, the presence of Ag nanoparticles of smaller size in ZnPOs/Ag-750 material compared to ZnPOs/CN/Ag one (~ 6.4 nm and ~ 27.0 nm respectively) may have favored the release of Ag^+ ions from ZnPOs/Ag-750 material in agreement with studies that reported improvement of Ag^+ release if particle size is reduced [63].

Finally, results for bacterial colonization at 2 h of incubation as well as for growth of the sessile population are both in agreement with the measurements of Ag^+ amount released in M63G medium (Table 6), which clearly demonstrate that ZnPOs/Ag-750 material releases significantly more Ag^+ ions than ZnPOs/CN/Ag material ($(10.0 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ M and $< 4.8 \times 10^{-6}$ M respectively). Minimum inhibitory concentration values of Ag^+ (AgNO_3) reported in the literature for *E. coli* strains (i.e., 0.6×10^{-6} M [57], 0.4 – 2.0×10^{-6} M [64]) generally support these microbiological results, even though bactericidal effects for concentrations of about 10^{-5} M were often reported to be higher. Furthermore, bacterial staining by IP used as a marker of damaged *E. coli* K12 bacteria showed that bacteria adhered on ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 materials after 3 h of incubation displayed an intact membrane, which confirms that the quantity of Ag^+ ions available for antibacterial action was here too low to affect the whole population of adherent bacteria. Nevertheless, studies vary a lot in terms of bacterial strain, culture medium and temperature in particular, all parameters known to affect the bacterial sensitivity to antibacterial agents [65, 66]. In relation to culture medium especially, some studies reported in the literature [67, 68] and results obtained with the same culture medium

as used in the present study have shown that interactions of Ag^+ ions with different medium's compounds reduce the amount of Ag^+ available for antibacterial action (data not shown).

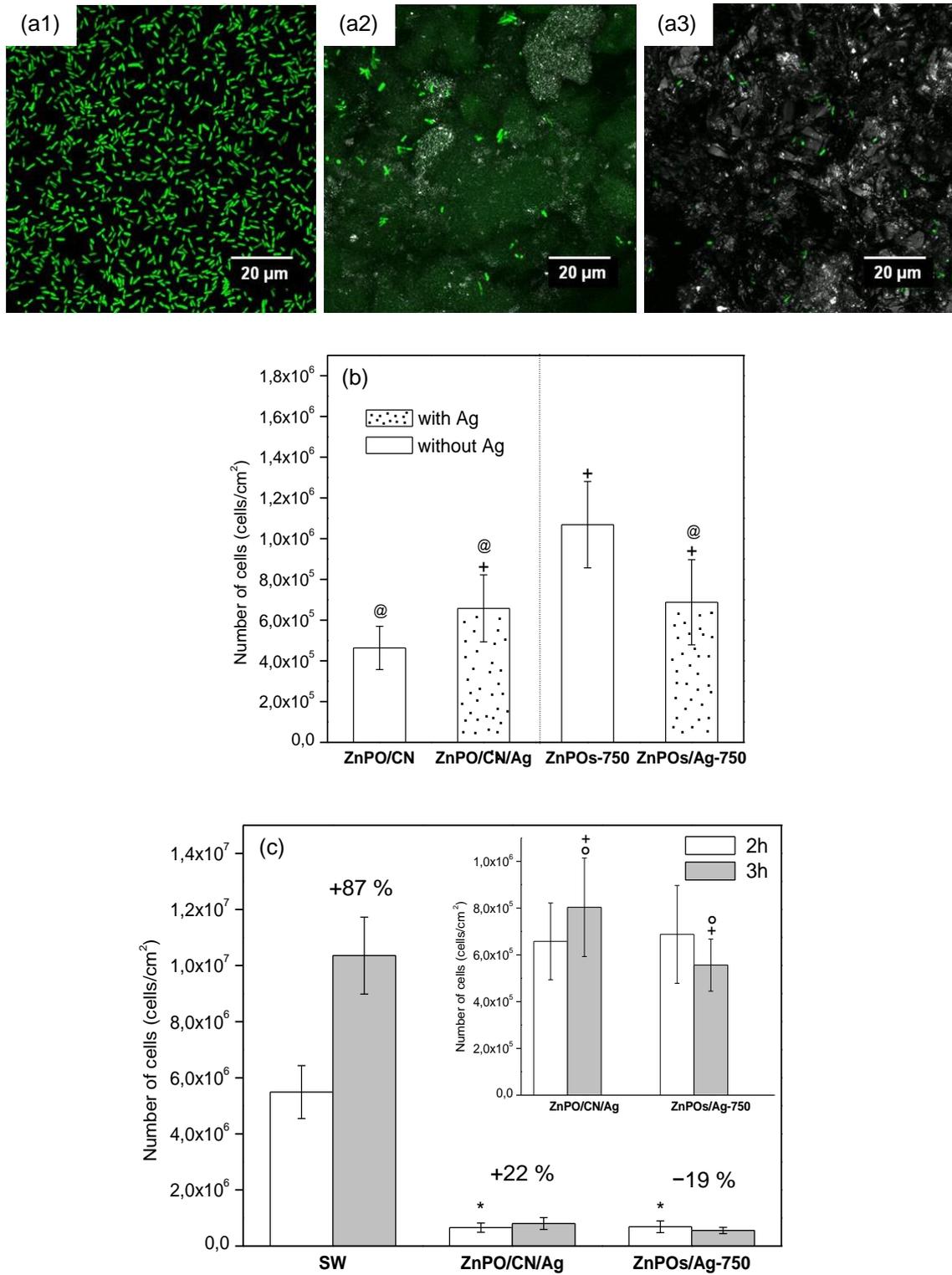


Figure 9. (a) 2D z-projection of confocal 3D images of *E.coli* K12 bacteria adherent to (a1) SW, (a2) ZnPO/CN/Ag and (a3) ZnPOs/Ag-750 materials after 3 h of incubation. Number of

bacteria on: (b) ZnPO/CN, ZnPO/CN/Ag, ZnPOs-750 and ZnPOs/Ag-750 materials after 2 h of incubation. ⁺ and @ symbols indicate significant differences compared to ZnPO/CN and ZnPOs-750, respectively, and (c) ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 materials and SW control after 2 h and 3 h of incubation. *, • symbols indicate significant differences compared to SW control after 2 h and 3 h of incubation, respectively. The inset displays a zoom of histogram showing the number of bacteria on ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 materials. ○ and + symbols indicate significant differences compared to ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 after 2 h of incubation, respectively. Significance level is considered for *p-value* < 0.05.

Moreover, zinc species have been reported to affect bacterial growth, mainly through inhibitory or bactericidal effect [69, 70]. However, according to the results of bacterial proliferation measured on both materials without Ag content (57 % and 20 % of proliferation, and 11.9×10^{-5} M and 6.2×10^{-5} M of released Zn^{2+} concentration for ZnPO/CN and ZnPOs-750 respectively) (Tables 5 and 6), concentrations of Zn^{2+} ions here released appear not to be in capacity to provide any antibacterial effect on *E. coli* K12. On the contrary, the higher Zn^{2+} amount released from ZnPO/CN compared to ZnPOs-750 was associated to higher bacterial proliferation between 2 h and 3 h of incubation (Table 5). This may be related to the role of growth stimulation that zinc can play as an essential micronutrient for Zn^{2+} ions concentrations as low as 8×10^{-5} M [69].

Table 5. Bacterial proliferation calculated from bacteria's numbers measured on zinc phosphate at 2 h and 3 h of incubation.

| Sample | % bacterial proliferation (2 h to 3 h) |
|--------------|--|
| SW | +87% |
| ZnPO/CN | +57% |
| ZnPO/CN/Ag | +22% |
| ZnPOs-750 | +20% |
| ZnPOs/Ag-750 | -19% |

Table 6. Ag⁺ and Zn²⁺ ions contents in M63G medium after 3 h of exposition of solids to medium at 30 °C.

| Sample | [Ag ⁺] M | [Zn ²⁺] M |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|
| ZnPO/CN | | (11.9±0.1)x10 ⁻⁵ |
| ZnPOs-750 | | (6.2±0.1)x10 ⁻⁵ |
| ZnPO/CN/Ag | < 4.8x10 ⁻⁶ | (10.6±0.1)x10 ⁻⁵ |
| ZnPOs/Ag-750 | (10.0±0.2)x10 ⁻⁶ | (7.5±0.1)x10 ⁻⁵ |

Table 7 summarizes the main antimicrobial effects on *E. coli* K12 determined in this study for different types of zinc phosphate materials. Zinc phosphates with Ag content appear to exhibit weak but significant antibacterial properties on *E. coli* K12 surface-related adhesion and proliferation, leading to inhibitory or bactericidal effect on the adhered bacteria's population according to the quantity of Ag nanoparticles included in the material and to the associated released Ag⁺ ions quantity. ZnPOs/Ag-750 especially led to significant growth inhibitory and bactericidal effects. Bacteria present in material surroundings are also affected by Ag contained in the ZnPOs/Ag-750 material and by the casein powder used for the synthesis of materials. Indeed, casein present in materials was not able to provide bactericidal activity but probably prevented bacteria adhesion due to its hydrogel character.

Table 7. Summary of the antibacterial effects observed of zinc phosphate materials on *E. coli* K12.

| Sample | Antimicrobial effect |
|--------------|--|
| SW | Control |
| ZnPO/CN | Unfavorable adhesion |
| ZnPO/CN/Ag | Unfavorable adhesion and inhibition of bacterial proliferation |
| ZnPOs-750 | Unfavorable adhesion |
| ZnPOs/Ag-750 | Bactericidal |

4. Conclusions

In this study, biosourced zinc phosphate (hopeite) loaded with casein and Ag nanoparticles (ZnPO/CN/Ag) was successfully obtained via *in situ* hydrothermal synthesis of Ag nanoparticles. This new route for silver-based metallophosphate synthesis is advantageous because casein acts as a) phosphorous biosource for the preparation of zinc phosphate and b) stabilizer and reducing agent for Ag nanoparticle synthesis. After calcination and elimination of casein, crystallization of zinc phosphate phases and Ag nanoparticles was improved (ZnPOs/Ag-750). Study of the Ag-containing and Ag-free zinc phosphate antibacterial activity on *E. coli* K12 bacteria has demonstrated that zinc phosphates are unfavorable for bacterial retention at short-time of incubation. Antibacterial activity of ZnPO/CN/Ag and ZnPOs/Ag-750 related to the release of Ag⁺ ions from materials was restricted to the inhibition of *E. coli* K12 proliferation on ZnPO/CN/Ag material while ZnPOs/Ag-750 material expressed significant bactericidal properties, even leading to the reduction of the adhered *E. coli* K12 population. Growth inhibitory and bactericidal effects were also observed on bacteria present in the surroundings of ZnPOs/Ag-750 material. To our knowledge, antibacterial activity of zinc phosphates on *E. coli* is here reported for the first time. These results open new perspectives for the use of porous crystallized zinc phosphates loaded with Ag (ZnPOs/Ag-750) for antimicrobial applications, for example in the treatment of cooling water, heating systems and wastewater.

5. References

- [1] Z. L. Ning, W. J. Li, C.Y. Sun, P. Che, Z. D. Chang. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 23 (2013) 718–724.
- [2] J. Gu, B. Yang. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 10 (2008) 405–409.
- [3] M. J. Gimeno, M. Puic, S. Chamorro, J. Molina, R. March, E. Oró, P. Pérez, J. J. Gracenea, J. J. Suay. *Prog. Org. Coat.* 95 (2016) 46–53.
- [4] L. Herschke, I. Lieberwith, G. Wegner. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17 (2006) 95–104.
- [5] L. Herschke, J. Rottstegge, I. Lieberwith, G. Wegner. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17 (2006) 81–94.
- [6] P. Daugela, R. Oziunas, G. Zekonis. *Stomatologija: Baltic Dental and Maxillofacial Journal.* 10 (2008) 16–21.
- [7] R. P. Vokus, G. J. Cisneros, M. Levi. *Pediatr. Dent. J.* 20 (1998) 43–48.
- [8] E. V. Dastjerdie, M. Oskoui, E. Sayanjali, F. S. Tabatabae. *Iran. J. Pharm. Res.* 11 (2012) 77–82.
- [9] J. Chou, J. Hao, S. Kuroda, D. Bishop, B. Ben-Nissan, B. Milthorpe, M. Otsuka. *Mar. Drugs.* 11 (2013) 5148–5158.
- [10] M. Otsuka, S. Marunaka, Y. Matsuda, A. Ito, P. Layrolle, H. Naito, N. Ichinose. *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 819–824.

- [11] Y. Sogo, T. Sakurai, K. Onuma, A. Ito. *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 457–463.
- [12] G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero. *Molecules.* 20 (2015) 8856–8874.
- [13] S. Y. Liao, D. C. Read, W. J. Pugh, J. R. Furr, A. D. Russell. *Lett. Appl. Microbiol.* 25 (1997) 279–83.
- [14] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Jacaman. *Nanotechnology.* 16 (2005) 2346–2353.
- [15] N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, G. Nakazato. *Nanomedicine.* 12 (2016) 789–799.
- [16] D. Jiraroj, S. Tungasmita. *Powder. Technol.* 264 (2014) 418–422.
- [17] Y. Lv, H. Liu, Z. Wang, S. Liu, L. Hao, Y. Sang, D. Liu, J. Wang, R. I. Boughton. *J. Membr. Sci.* 331 (2009) 50–56.
- [18] S. Saengmee-anupharb, T. Srihirin, B. Thaweboon, S. Thaweboon, T. Amornsakchai, S. Dechkunakorn, T. Suddhasthira. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (2013) 47–52.
- [19] Q. Wang, H. Yu, L. Zhong, J. Liu, J. Sun, J. Shen. *Chem. Mater.* 18 (2006) 1988–1994.
- [20] M. Diaz, F. Barba, M. Miranda, F. Guitian, R. Torrecillas, J. S. Moya. *J. Nanomater.* (2009) 498–505.
- [21] J. -K. Liu, X. -H. Yang, X. -G. Tian. *Powder Technol.* 184 (2008) 21–24.
- [22] L. Yang, X. Ning, Q. Xiao, K. Chen, H. Zhou. *J. Biomed. Mater. Res., Part B.* 81 (2007) 50–56.
- [23] G. Nangmenyi, Z. Yue, S. Mehrabi, E. Mintz, J. Economy. *Nanotechnology.* 20 (2009) 495–705.
- [24] H. van der Laan, D. van Halem, P. W. M. H. Smeets, A. I. A. Soppe, J. Kroesbergen, G. Wubbels, J. Nederstigt, I. Gensburger, S. G. J. Heijman. *Water Res.* 51 (2014) 47–54.
- [25] I. De la Rosa-Goméz, M.T. Olgúna, D. Alcántara. *J. Environ. Manage.* 88 (2008) 853–863.
- [26] L. Akhigbe, S. Ouki, D. Saroj. *Chem. Eng. J.* 295 (2016) 92–98.
- [27] C. Qi, Y. -J. Zhu, X. -Y. Zhao, B. -Q. Lu, Q. -L. Tang, J. Zhao, F. Chen. *Eur. J. Chem.* 19 (2013) 981–987.
- [28] Qi, C.; Zhu, Y. J.; Lu, B.Q.; Zhao, X. Y.; Zhao, J.; Chen, F.; Wu, J. *Eur. J. Chem.* 2013, 19, 5332–5341.
- [29] C. Qi, Y. -J. Zhu, F. Chen. *Asian J. Chem.* 8 (2013) 88–94.
- [30] J. Hinostroza-Ramos, L. Ploux, K. Anselme, L. Balan, A. Simon-Masseron. *Cryst. Growth Des.* 16 (2016) 43897–4904.
- [31] J. Patarin, J.-L. Paillaud, H. Kessler. In *Handbook of Porous Solids*; F. Schüth, K. S. W. Sing, J. Weitkamp. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Germany, 2002; Vol. 2, 815–876.
- [32] Y. D. Livney. *Curr. Opin. Colloid In.* 15 (2010) 79–83.
- [33] S. Ashraf, A. Z. Abbasi, C. Pfeiffer, S. Z. Hussain, Z. M. Khalid, P. R. Gil, W. J. Parak, I. Hussain. *Colloids Surf., B.* 102 (2013) 511–518.
- [34] G. Ghodake, S. R. Lim, D. S. Lee. *Colloids Surf., B.* 108 (2013) 147–151.
- [35] *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 4rd Edn. World Health Organization, Geneva, 2003. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/dwq-guidelines-4/en/. (accessed April 2016).
- [36] J. Tobias, E. Kassem, U. Rubinstein, A. Bialik, S.R. Vutukuru, A. Navaro, A. Rokney, L. Valinsky, M. Ephros, D. Cohen, K. Muhsen. *BMC Infect. Dis.* 15 (2015) 79.
- [37] PDF-4+ Technical Bulletin, International Center for Diffraction Data (ICDD). 2016, USA. Available from: http://www.icdd.com/products/technicalbulletins/PDF-4_Technical_Bulletin.pdf (accessed November 2016).
- [38] W. Rasband. *ImageJ*. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 1997.

- [39] H. Miao, S. Ratnasingam, C. S. Pu, M. M. Desai, C. C. Sze, J. Microbiol. Methods. 76 (2009) 109–119.
- [40] R Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 9 (1994) 12501–12504.
- [41] O. Vidal, R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, P. Lejeune. J. Bacteriol. 180 (1998) 2442–2449.
- [42] LSM 700 Operating Manual (M60-1-0036e), Carl Zeiss MicroImaging GmbH, September 2011, Jena, Germany.
- [43] J. Lehtinen, J. Nuutila, E.-M. Lilius. Cytometry, Part A. 60 (2004) 165–172.
- [44] A. Gonzales, P. Thomar, T. Nicolai, J. Dittmer. Food Hydrocolloids. 51 (2015) 88–94.
- [45] M. Quarton, M. T. Oumba, W. Freundlich, A. W. Kolsi, Rev. Chim. Miner. 21 (1984) 311–314.
- [46] D. V. Navolotskaya, H. S. Toh, C. Batchelor–McAuley, R. G. Compton. ChemistryOpen. 4 (2015) 595–599.
- [47] J. Liu, R. H. Hurt. Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 2169–2175.
- [48] H. D. Zucht, M. Raida, K. Adermann, H. J. Mägert, W. G. Forssmann. FEBS Lett. 372 (1995) 185–188.
- [49] K. N. Pearce. Eur. J. Biochem. 58 (1975) 23–29.
- [50] M. Malkoski, S. G. Dashper, N. M. O'Brien-Simpson, G. H. Talbo, M. Macris, K. J. Cross, E. C. Reynolds. Antimicrob. Agents Chemother. 45 (2001) 2309–2315.
- [51] F. Song, L. M. Zhang, C. Yang, L. Yan. Int. J. Pharm. 373 (2009) 41–47.
- [52] F. Song, L. M. Zhang, J. F. Shi, N. N. Li. Colloids Surf., B. 79 (2010) 142–148.
- [53] N. Cottenye, K. Anselme, L. Ploux, C. Vebert-Nardin, Adv. Funct. Mater. 22 (2012) 4891–4898.
- [54] R. V. Oppermann, G. Rølla, J. R. Johansen, S. Assev. Eur. J. Oral Sci. 88 (1980) 389–396.
- [55] T. N. Phan, T. Buckner, J. Sheng, J. D. Baldeck, R. E. Marquis, Oral Microbiol. Immunol. 19 (2004) 31–38.
- [56] W. Ghandour, J. A. Hubbard, J. Deistung, M. N. Hughes, R. K. Poole, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 (1988) 559–565.
- [57] M. A. Radziga, V. A. Nadtochenko, O. A. Koksharova, J. Kiwi, V. A. Lipasova, I. A. Khmel. Colloids Surf., B. 102 (2013) 300–306.
- [58] G. G. Zhanel, D. J. Hoban, G. K. M. Harding, Can J. Infect. Dis. 3 (1992) 193–201.
- [59] G. N. Rolinson. J. Antimicrob. Chemother. 3 (1977) 111–113.
- [60] K. C. Vidya, P. S. Mallya, P. S. Rao, Indian J. Med. Microbiol. 23 (2005) 102–105.
- [61] C. Svanborg-Edén, T. Sandberg, K. Stenqvist, S. Ahlstedt. Infection. 6 (1978) 121–124.
- [62] L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, M. J. MacCoss, Z. Zhang, R. A. Jones, S. I. Miller, Nature. 436 (2005) 1171–1175.
- [63] J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, R. H. Hurt. ACS Nano. 4 (2010) 6903–6913.
- [64] M. A. Radtsig, O. A. Koksharova, I. A. Khmel. Mol. Genet., Mikrobiol. Virusol. 4 (2009) 27–31.
- [65] R. M. Donlan. Emerging Infect. Dis. 8 (2002) 881–890.
- [66] M. R. W. Brown, P. Gilbert. J. Appl. Microbiol. 74 (1993) 87S–97S.
- [67] A. Gupta, M. Maynes, S. Silver. Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 5042–5045.
- [68] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji. Nanoscale. 5 (2013) 7328–7340.
- [69] H. Babich, D.G. Stotzky. Appl. Environ. Microbiol. 36 (1978) 906–914.
- [70] K. Malachová, P. Praus, Z. Rybková, O. Kozák. Appl. Clay Sci. 53 (2011) 642–645.

V.5. Conclusion

Nous avons développé une nouvelle voie de synthèse biosourcée plus respectueuse de l'environnement de zincophosphates macroporeux, enrichis en argent, à partir de caséine. Les applications visées sont celles du domaine environnemental.

Les zincophosphates préparés possèdent des propriétés antibactériennes significatives sur *E. coli*, notamment dans la prévention de l'adhésion bactérienne. La présence de nanoparticules d'Ag dans les zincophosphates a permis de bénéficier d'une activité antibactérienne en termes d'inhibition de la prolifération bactérienne et d'un effet biocide, grâce aux ions Ag^+ libérés dans le milieu de culture. En particulier, le zincophosphate macroporeux nommé ZnPOs/Ag-750 possède des propriétés bactéricides et d'inhibition de la croissance bactérienne sur *E. coli* par contact direct (adhésion à la surface) et sans contact (diffusion des ions Ag^+). Ce matériau pourrait être utile dans le traitement des eaux usées en tant que filtre et en particulier dans des systèmes humides sensibles à la contamination microbienne et au développement de biofilms bactériens (par exemple, systèmes de chauffage, de refroidissement et les réseaux de distribution d'eau potable). De plus, la propriété de prévention de la corrosion associée aux zincophosphates pourrait être un avantage additionnel pour leur utilisation dans ce type de systèmes.

De ce point de vue, les travaux présentés ici constituent des progrès significatifs dans le défi de trouver de nouvelles applications aux zincophosphates poreux dans le domaine environnemental.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) The Use of Phosphates For Potable Water Treatment. The Phosphate Forum of the Americas (PFA). Site web: <http://phosphatesfacts.org/wp-content/uploads/2015/09/The-Use-of-Phosphates-For-Potable-Water-Treatment.pdf> (consulté 4/10/2016)
- (2) B. Wilson, N. Olson. Phosphate Treated Drinking water : Exploring influence on stormwater. Minnesota Pollution, Control Agency (MPCA). Site web : <https://www.pca.state.mn.us/sites/default/files/p-gen3-14h.pdf> (consulté le 4/10/2016)
- (3) N. Lyczko, A. Nzihou, P. Sharrok. *Procedia Eng.* 83, 2014, 423–431.
- (4) A. Nzihou, P. Sharrock. *Waste Biomass Valorization.* 1, 2010,163–174.
- (5) P. Chankachang, S. Chantara, S. Punyanitya, C. Saelee. *Adv. Mater. Res.* 979, 2014, 66–69.
- (6) L. Yang, X. Ning, K. Chen, H. Zhou. *Ceram. Int.* 33, 2007, 483–489.
- (7) Le zinc un matériel durable (Bulletin), International Zinc Association (IZA), 2010. Site web : http://issuu.com/rputnam/docs/zinc_sustainability_report?e=2224628/11169760 (consulté le 4/10/2016)

- (8) M. J. Gimeno, M. Puig, S. Chamorroa, J. Molina, R. March, E. Oró, P. Pérez, J. J. Gracenea, J. J. Suayc. *Prog. Org. Coat.* 95, 2016, 46–53.
- (9) S. Neeraj, S. Natarajan, C. N. R. Rao. *Angew. Chem., Int. Ed.* 38, 1999, 3480–3483.
- (10) L. Herschke, I. Lieberwith, G. Wegner. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17, 2006, 95–104.
- (11) T.N. Phan, T. Buckner, J. Sheng, J. D. Baldeck, R. E. Marquis. *Oral. Microbiol. Immunol.* 2004, 19, 31–38.
- (12) R. P. Vokus, G. J. Cisneros, M. Levi. *Pediatr. Dent. J.* 20, 1998, 43–48.
- (13) W. K. Jung, H. C. Koo, K. -W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, Y. H. Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2008, 2171–2178.
- (14) J. B. Kaper, J. P. Nataro, H. L. T. Mobley. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 2004, 123–140.
- (15) *Escherichia Coli (E. coli)* infections, Infectious Disease Epidemiology Section, Department of Health & Hospitals of Louisiane, 2009. Site web : <http://new.dhh.louisiana.gov/assets/oph/Center-PHCH/Center-CH/infectious-epi/EpiManual/EcoliManual.pdf> (consulté le 07/10/2016)
- (16) G. Ghodake, S. R. Lim, D. S. Lee. *Colloids Surf., B.* 108, 2013, 147–151.
- (17) S. Ashraf, A. Z. Abbasi, C. Pfeiffer, S. Z. Hussain, Z. M. Khalid, P. R. Gil, W. J. Parak, I. Hussain. *Colloids Surf., B.* 102, 2013, 511–518.
- (18) K. K. Caswell, C. M. Bender, C. J. Murphy. *Nano Lett.* 3, 2003, 667–669.
- (19) T. Soejima, S. Oshiro, Y. Nakatsuji, S. Ito. *J. Colloid Interface Sci.* 362, 2011, 325–329.
- (20) H. Miao, S. Ratnasingam, C. S. Pu, M. M. Desai, C. C. Sze, *J. Microbiol. Methods.* 76, 2009, 109–119.
- (21) K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormöl, S. J. Remington. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1997, 2306–2311.
- (22) R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9, 1994, 12501–12504.
- (23) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher. *Science.* 263, 1994, 802–805.
- (24) A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien. *Trends Biochem. Sci.* 20, 1995, 448–455.
- (25) S. Wang, T. Hazelrigg, *Nature*, 369, 1994, 400–403.
- (26) R. Y. Tsien. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 1998, 509–544.
- (27) O. Vidal, R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, P. Lejeune. *J. Bacteriol.* 180, 1998, 2442–2449.
- (28) Methods of sterilization, The International Pharmacopoeia, World Health Organization, Edition N°5, 2015, Suisse. Site web : <http://apps.who.int/phint/pdf/b/Jb.7.5.9.pdf> (consulté le 15/10/2016)
- (29) J. Hinostroza-Ramos, L. Ploux, K. Anselme, L. Balan, A. Simon-Masseron. *Cryst. Growth Des.* 16, 2016, 4897–4904.
- (30) G. A. Morris, T. J. Foster, S. E. Harding, *Biomacromolecules*, 1, 2000, 764–767.
- (31) M. Deseurs. Analyse des caséines industrielles (Fin). Dosage de l'acidité des caséines industrielles. Le lait, INRA Editions, 9, 1929, 263–265.
- (32) C. G. de Kruif, S. G. Anema, C. Zhu, P. Havea, C. Coker. *Food Hydrocolloids.* 44, 2015, 372–379.

CHAPITRE VI

**Évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des
zincophosphates biosourcés préparés à partir
de caséine**

VI.1. Introduction

Le test de cytotoxicité *in vitro* est l'une des principales méthodes biologiques permettant d'évaluer la biocompatibilité des matériaux [1]. L'hydroxyapatite (HA) et les zincophosphates sont deux exemples de matériaux biocompatibles de type métallophosphates reconnus pour leur utilisation dans le domaine biomédical comme implants osseux et ciments dentaires respectivement (voir le paragraphe I.2.5 du chapitre I). Le zinc en particulier a démontré avoir un effet spécifique sur la prolifération des cellules ostéoblastiques du tissu osseux de par son influence dans la synthèse de nombreuses métalloenzymes et des protéines associées dans la formation de l'os [2-5]. Il possède également un effet inhibiteur sur la résorption osseuse, en stimulant la formation de cellules de type ostéoclastique à l'origine de la dégradation du tissu osseux, malgré des mécanismes d'action encore méconnus [6]. Pour ces raisons, plusieurs études s'intéressent à la synthèse de biomatériaux à base de phosphates de calcium enrichis en zinc. Par exemple, l'HA et des composites céramiques à base de phosphates de calcium TCP/HA (TCP/HA = phosphate tricalcique/hydroxyapatite) modifiés par incorporation de Zn^{2+} favorisent le développement des cellules ostéoblastiques et la formation osseuse grâce à la libération des ions zinc par comparaison avec des phosphates de calcium qui ne contiennent pas de zinc. [7-9].

Compte tenu du rôle important du zinc dans le métabolisme *osseux*, les zincophosphates préparés dans ce travail pourraient être d'intérêt dans le domaine biomédical. L'évaluation *in vitro* de la toxicité des solides vis-à-vis des cellules est en conséquence importante car cela nous permettra d'avoir une idée préliminaire sur la biocompatibilité de nos matériaux. En outre, l'évaluation des zincophosphates enrichis en argent pourrait présenter un intérêt en particulier pour la prévention des risques d'infection associés aux bactéries compte tenu du fait que ces matériaux ont démontré avoir des propriétés antibactériennes améliorées par rapport aux zincophosphates sans argent. Toutefois, il est également important d'évaluer l'influence des ions argent libérés sur la toxicité des matériaux vis-à-vis des cellules.

Ce chapitre présente l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des zincophosphates biosourcés préparés à partir de caséine sur des cellules ostéoprogénitrices issues de la moelle osseuse [10]. Nous attendons que ces matériaux puissent démontrer des propriétés non-cytotoxiques afin d'envisager leur utilisation par exemple dans des dispositifs médicaux de type implants (substituts osseux, prothèses, etc.) possédant des propriétés antibactériennes.

VI.2. Démarche expérimentale

VI.2.1. Cellule utilisée

Les expériences ont été réalisées avec des cellules ostéoprogénitrices STRO1A+ fournies par le Dr. Pierre J. Marie (Laboratoire de Biologie et Pathologie des Ostéoblastes/ INSERM U606, Université Paris Diderot, Hôpital Lariboisière, Paris, France). Ce sont des cellules progénitrices d'ostéoblastes humaines dérivées du stroma de la moelle osseuse fœtale et immortalisées [11].

VI.2.2. Matériaux analysés

Les zincophosphates enrichis et non enrichis en argent et la caséine (poudres) ont été utilisés dans les tests de cytotoxicité. Il s'agit des produits bruts de synthèse (ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag) et ceux obtenus après calcination et élimination de la caséine à 750 °C (ZnPOs-750 et ZnPOs/Ag-750), dont les compositions ont été précisées dans les publications présentées dans les chapitres III et V. Les conditions de préparation et de conservation des matériaux sont les mêmes que celles utilisées lors des essais microbiologiques pour éviter une contamination microbienne provenant de l'environnement. Elles ont été détaillées dans la section V.3.2 du chapitre V.

VI.2.3. Test de cytotoxicité *in vitro* par contact indirect (extraits)

Le test de cytotoxicité *in vitro* utilisé dans cette étude est celui par contact indirect (extraits) selon la norme internationale ISO 10993-5(2009) [12]. Il consiste en l'évaluation de la cytotoxicité des composants des matériaux qui pourraient être libérés dans les fluides biologiques. Comme il a été vu dans l'évaluation microbiologique, nos matériaux sont capables de libérer des ions Zn^{2+} , Ag^+ et éventuellement de la caséine dans le milieu de culture cellulaire; c'est pourquoi nous avons considéré indispensable d'évaluer la cytotoxicité des milieux d'extraction préparés à partir de nos matériaux.

La vérification de la viabilité cellulaire a été réalisée avec la méthode MTT car elle présente les caractéristiques d'être simple et d'avoir une sensibilité élevée. C'est une méthode colorimétrique qui consiste en la réduction du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (solution jaunâtre) par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules viables pour former le formazan (Figure VI-1),

un produit de couleur violette qui est solubilisé par addition d'isopropanol acide, un réactif qui permet de désintégrer la membrane cellulaire. La mesure de l'absorbance de cette solution violette par spectrométrie UV-vis à 570 nm donne une estimation de la quantité relative de cellules viables métaboliquement actives [13].

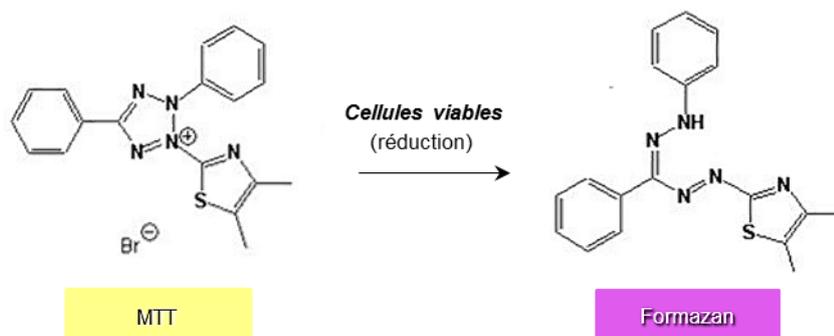


Figure VI-1. Réaction de réduction du MTT en formazan dans les cellules viables métaboliquement actives.

VI.2.3-1. Procédure expérimentale

La procédure expérimentale est la suivante :

- i. Les milieux d'extraction ont été préparés avec un rapport « surface de l'échantillon/ volume de milieu d'extraction » de 5 cm²/mL ou de 100 mg/mL. Pour cela, 100 mg de poudre ont été immergés dans 1 mL de milieu de culture IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, pH = 7,4, Sigma-Aldrich) auquel ont été ajoutés 0,5 wt.% de pénicilline-streptomycine (Sigma-Aldrich, USA) et 1 wt.% de L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA), et incubés pendant 5 jours dans l'incubateur à 37 °C et 5% CO₂. Deux références ont été également mises à incuber à 37°C et 5% CO₂ : le milieu contenant les antibiotiques et la L-glutamine (MV, milieu vieux) ainsi que 4 lamelles de Thermanox[®] (plastique traité pour culture cellulaire) de surface 1,3 cm² chacune immergées dans du milieu sans sérum de veau fœtal (Th). Après incubation, le milieu a été récupéré à l'aide d'une micropipette puis conservé à 4 °C au réfrigérateur.
- ii. Après récupération de tous les extraits, une plaque de culture 96 puits a été inoculée avec 2x10⁴ cellules/puits et mise à l'incubateur à 37°C et 5 % CO₂ pendant 24 h.
- iii. Après incubation, le milieu de culture a été enlevé à l'aide d'une micropipette en faisant attention à ne pas toucher le voile cellulaire puis remplacé par 200 µL des différents milieux d'extraction complétés avec 10 % de sérum de veau fœtal (VWR, UK). Enfin la

plaque a été incubée pendant 1 nuit à 37 °C et 5 % CO₂. Différents milieux contrôles ont été ajoutés sur la plaque 96 puits : i) deux contrôles positifs de cytotoxicité qui consistent en solutions de phénol à 25 v/v% et 50 v/v% préparés à partir d'une solution mère à 6,4 g. L⁻¹ diluée dans le milieu de culture, et ii) trois contrôles négatifs de cytotoxicité, les milieux Th et MV et un milieu de culture cellulaire frais nommée MF qui à la différence des autres contrôles n'a pas été incubé pendant 5 jours.

- iv. La viabilité cellulaire a été évaluée par la méthode MTT après les 24 h d'incubation avec les différents extraits et milieux contrôles. Pour cela l'extrait a été enlevé à l'aide d'une pipette en faisant attention à ne pas toucher le voile cellulaire puis remplacé par 200 µL d'une solution de MTT à 5 g. L⁻¹ (Sigma-Aldrich, USA) diluée 10 fois dans du PBS stérile (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich). La plaque a été incubée pendant 3 h à 37 °C. Enfin, la solution MTT a été remplacée par un même volume de solution d'isopropanol acide (0,1 % de HCl) pour permettre la dissolution des cristaux violets formés. L'absorbance de ces solutions a été mesurée en utilisant le lecteur de microplaque UV-visible (EZ Read 400, Biochrom) à 570 nm. Les mesures d'absorbance ont été réalisées sur trois aliquotes différents pour chaque milieu.

VI.2.3-2. Traitement statistique des données

Pour des raisons de temps les expériences ont été réalisées deux fois, et la valeur moyenne et l'écart-type ont été calculés sur un total de 6 mesures d'absorbance pour chaque milieu d'extraction et de contrôle. Les différences significatives entre les résultats ont été évaluées en utilisant le *t*-test de Student avec un intervalle de confiance de 95 %.

VI.2.3-3. Influence du pH

L'influence du pH sur la cytotoxicité des extraits a été évaluée sur les échantillons qui ont eu tendance à acidifier le pH du milieu de culture jusqu'à pH = 5,0 lors de l'incubation des extraits (5 jours à 37 °C). Les tests de cytotoxicité ont été réalisés à pH = 5,0–5,5 et à pH neutre. Pour l'ajustement de la valeur de pH, une solution de NaOH 1 M stérile a été utilisée. De plus, le changement de la valeur de pH des extraits (avant addition de sérum de veau foetal) a été suivi à différents intervalles de temps pendant l'incubation en utilisant des bandelettes de papier pH de précision ± 0,5.

VI.2.3-4. Influence de la dilution

L'influence de la dilution des extraits sur la cytotoxicité a été aussi évaluée. Des dilutions ont été faites dans le milieu de culture cellulaire IMDM à partir de l'extrait obtenu après les 5 jours d'incubation à 37 °C. Les concentrations en volume utilisées sont comprises entre 50 v/v% et 1 v/v%. Il est important de noter que pour des raisons de temps les tests de cytotoxicité associés à cette partie ont été réalisés avec le réactif PrestoBlue® (Sigma-Aldrich, USA) qui réduit le temps d'incubation à 1 heure pour la détermination de la viabilité cellulaire.

VI.2.4. Analyse des ions Ag⁺ et Zn²⁺ libérés

La quantification des ions Ag⁺ et Zn²⁺ éventuellement libérés de nos échantillons dans le milieu de culture a été déterminée par analyse ICP-AES réalisée par la plateforme Analytique Inorganique du Département des Sciences Analytiques (DSA) de l'Université de Strasbourg. Les extraits qui ont été analysés correspondent à ceux préparés selon l'item 1 du protocole expérimental décrit dans la section VI.2.3 de ce chapitre.

VI.2.5. Analyse de la nature de la caséine libérée

Ces analyses correspondent aux produits bruts de synthèse qui présentent comme principal composant la caséine susceptible de se solubiliser dans le milieu de culture cellulaire. Une analyse protéinique de la caséine ou de ses dérivés libérés de ces échantillons a été réalisée par électrophorèse sur gel, une technique généralement utilisée pour l'analyse des protéines. Les mesures ont été réalisées avec 50 µL de chaque extrait récupéré à différents intervalles de temps d'incubation des échantillons dans le milieu de culture cellulaire (sans sérum de veau foetal) à 37 °C. Les conditions expérimentales de l'analyse par électrophorèse sur gel sont décrites dans le chapitre II.

VI.3. Résultats et discussion

La Figure VI-2 reporte les résultats des tests de cytotoxicité *in vitro* des extraits préparés à partir des différents échantillons de zincophosphates. Les extraits associés aux zincophosphates calcinés enrichis ou non enrichis d'argent (ZnPOs/Ag-750 et ZnPOs-750 respectivement) ont démontré une non-toxicité vis-à-vis des cellules ostéoprogénitrices

STRO1A+ avec une viabilité cellulaire au-delà de 75 % par rapport au contrôle négatif MF (milieu frais). D'après les Figures VI-(2-3) il apparaît que l'extrait ZnPOs/Ag-750 présente une viabilité cellulaire significativement plus élevée (+ 20 %) par rapport à celle du contrôle MF, alors que l'extrait ZnPOs-750 ne montre pas de différences significatives par comparaison au MF (viabilité cellulaire de ~ 85 %). En revanche, les extraits des échantillons ZnPOs/CN et ZnPOs/CN/Ag qui contiennent de la caséine ont révélé une cytotoxicité significative associée à une viabilité cellulaire de ~ 2 % et ~ 6 % respectivement du contrôle MF présentant un effet cytotoxique assez similaire aux contrôles positifs phénol 25 % et 50 %. Ces résultats suggèrent que les matériaux qui consistent seulement en phases zincophosphates et qui contiennent ou pas de l'argent présentent une bonne biocompatibilité cellulaire. Il apparaît que les ions Zn^{2+} et Ag^+ libérés de ZnPOs-750 et ZnPOs/Ag-750 aux concentrations indiquées dans Tableau VI-1 n'ont pas d'effet toxique sur les cellules. Au contraire, un effet positif sur la viabilité cellulaire des ions Zn^{2+} libérés dans l'extrait ZnPOs/Ag-750 à la concentration de $5,2 \times 10^{-4}$ M semble possible si on considère l'incrément de + 20 % de la viabilité cellulaire observé par rapport au MF. En effet, plusieurs travaux reportent la stimulation du Zn^{2+} sur le métabolisme cellulaire des ostéoblastes [3, 5]. En particulier, Yamaguchi *et al.* (1987) [14] ont reporté que le métabolisme osseux dans la culture tissulaire *in vitro* est favorisé en présence de 10^{-6} et 10^{-3} M de Zn^{2+} . D'autre part Popp *et al.* (2007) [15] ont indiqué que la culture des cellules ostéoprogénitrices supplémentée en 10^{-5} et 4×10^{-5} M de Zn^{2+} n'altère pas le développement du tissu osseux *in vitro*. Quant à l'influence des ions Ag^+ libérés sur la cytotoxicité, les résultats signalent que l'extrait ZnPO/CN/Ag qui présente une plus faible concentration d'ions Ag^+ ($< 4,8 \times 10^{-6}$ M) que l'extrait ZnPOs/Ag-750 ($5,2 \times 10^{-6}$ M) pour des concentrations d'ions Zn^{2+} à peu près similaires, est accompagné d'une importante cytotoxicité (6 % de viabilité cellulaire par rapport à MF), un résultat qui indique que ce n'est pas la concentration en Ag^+ libérée qui influe sur la cytotoxicité. En outre, les résultats de cytotoxicité assez similaires obtenus avec les extraits ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag (2 % et 6 % de viabilité cellulaire respectivement) suggèrent que la toxicité sur les cellules des échantillons ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag est liée plus probablement au relargage de la caséine ou ses dérivés contenus dans ces matériaux plutôt qu'à la concentration des ions Ag^+ et Zn^{2+} libérés tenant compte des pourcentages massiques similaires en caséine de ces solides (84 à 86 %).

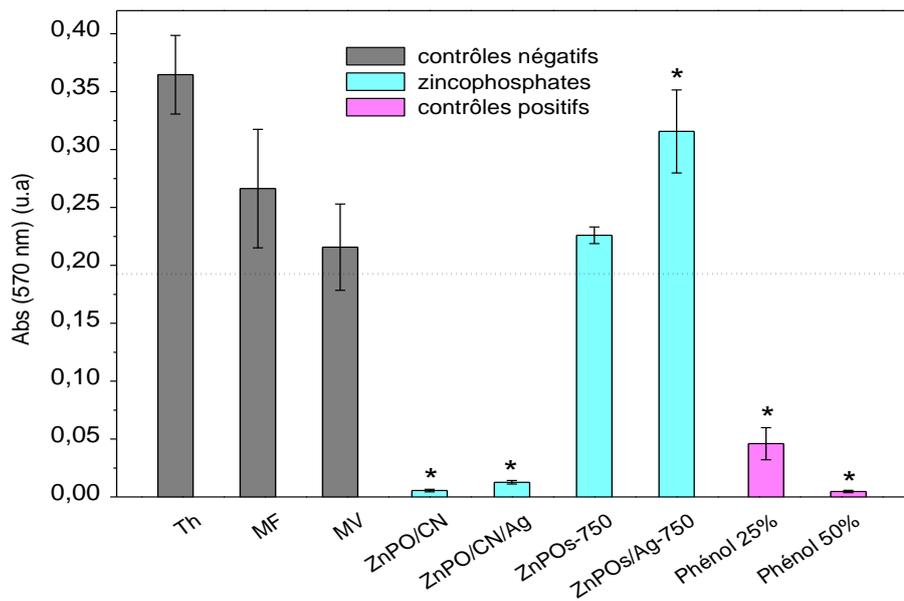


Figure VI-2. Test de cytotoxicité *in vitro* des extraits de zincophosphates sur cellules ostéoprogénitrices STRO1A+. La ligne en pointillés correspond au seuil de cytotoxicité associé à 75 % de la viabilité cellulaire du contrôle négatif MF. Le symbole * indique une différence significative par rapport à MF avec une *p-value* < 0,05.

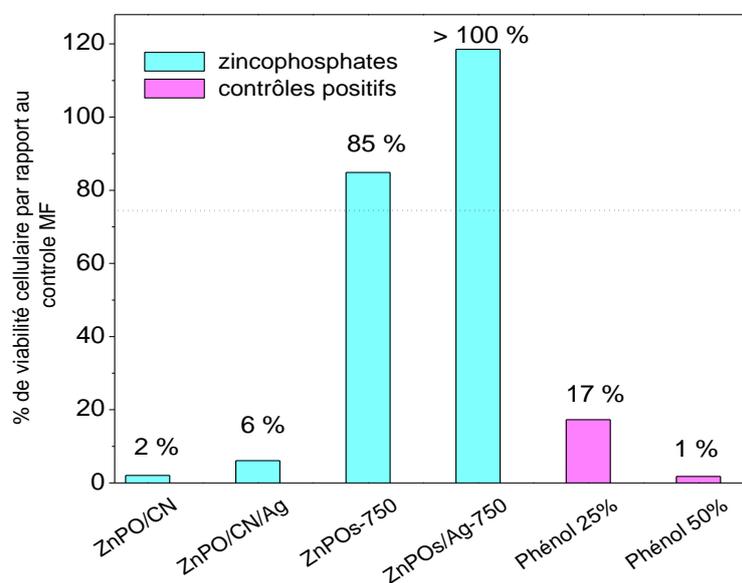


Figure VI-3. Taux de viabilité des cellules STRO1A+ par rapport au contrôle négatif MF. La ligne en pointillé indique le seuil de cytotoxicité de 75 % de la viabilité cellulaire du contrôle MF.

Tableau VI-1. Concentrations des ions Ag^+ et Zn^{2+} libérés dans les extraits des zincophosphates après 5 jours d'incubation à 37 °C.

| Extrait | $[\text{Ag}^+]$ M | $[\text{Zn}^{2+}]$ M |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------|
| ZnPO/CN | - | $(12,1 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ |
| ZnPOs-750 | - | $(3,7 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ |
| ZnPO/CN/Ag | $< 4,8 \times 10^{-6}$ | $(7,2 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ |
| ZnPOs/Ag-750 | $(5,2 \pm 0,3) \times 10^{-6}$ | $(5,2 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ |

Des études préliminaires ont été réalisées ensuite afin d'expliquer l'effet cytotoxique *in vitro* observé avec les extraits des échantillons ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag qui serait *a priori* associé à la caséine ou ses dérivés relargués dans les extraits. Nous attribuons cela à deux causes hypothétiques mentionnées ci-dessous et qui seront étudiées par la suite :

- La nature et la qualité de la caséine (réactif) utilisée pour la synthèse des matériaux.
- La présence de caséine dégradée dans les matériaux après leur synthèse hydrothermale à 100 °C.

VI.3.1. Influence de la nature de la caséine (réactif)

La nature et la qualité de la caséine utilisée sont des facteurs importants à considérer sur les résultats de cytotoxicité obtenus avec les solides ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag compte tenu du fait que la caséine est leur composant majeur : 84 et 86 wt.% dans ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag respectivement. Il est important de rappeler que la caséine en poudre utilisée dans nos synthèses, de qualité technique, a été obtenue par précipitation par l'acide lactique (dû à une fermentation bactérienne naturelle qui transforme le lactose en acide lactique) et qu'elle a été utilisée telle quelle sans traitements chimiques supplémentaires.

C'est pourquoi l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des extraits de la caséine en poudre (CN) et des échantillons ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag a été réalisée en parallèle. De premières constatations ont été faites lors de la préparation des milieux d'extraction. La Figure IV-4 montre que la caséine et les échantillons ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag acidifient le milieu de culture cellulaire IMDM lors de l'incubation à 37 °C. Cela a été aussi observé au travers du changement de la couleur des milieux de culture du rouge au jaune grâce à la présence de l'indicateur rouge de phénol dans le milieu de culture. On observe la diminution de la valeur

du pH de $\text{pH} = \sim 7,0$ à $\text{pH} = \sim 5,5-5,0$ présentant un pH légèrement plus acide avec la caséine qu'avec les zincophosphates ZnPO/CN et ZnPO/CN/Ag. L'obtention de profils de diminution de pH assez similaires suggère que les échantillons libèrent des espèces acides dans le milieu de culture probablement liées à la caséine. À ce sujet Pien *et al.* [16] mentionnent que la présence d'une acidité libre dans la caséine « lactique » peut être associée à l'existence d'impuretés dans la caséine. Un mauvais lavage de la caséine après obtention par précipitation peut conduire à la rétention d'espèces acides. Parmi les impuretés, l'acide lactique libre en excès tient la première place mais des radicaux acides combinés aux protéides (sels de caséine) peuvent aussi être trouvés. Ces arguments suggèrent que la caséine utilisée présente de possibles impuretés acides, qui apparemment sont encore présentes dans la caséine des zincophosphates mais avec un plus faible effet acide.

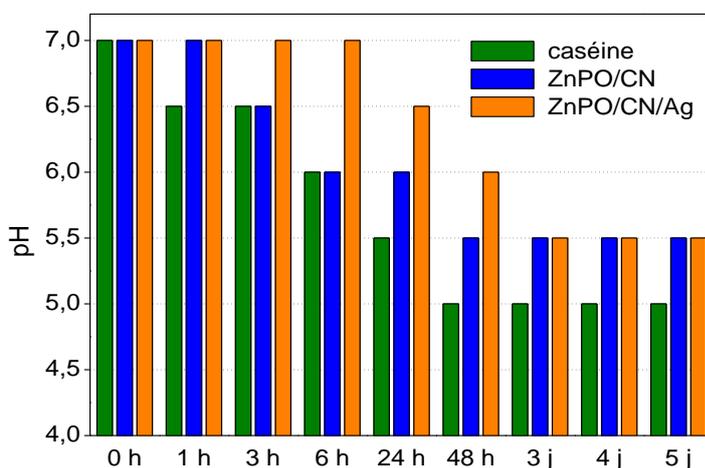


Figure IV-4. Évolution du pH des extraits préparés avec la caséine et les zincophosphates ZnPO/CN, ZnPO/CN/Ag dans le milieu de culture pendant 5 jours d'incubation à 37 °C.

Afin d'évaluer l'influence du pH, des tests de cytotoxicité ont été faits avec et sans neutralisation du pH des milieux d'extraction de la caséine (CN) et des échantillons ZnPO/CN, ZnPO/CN/Ag obtenus après 5 jours d'incubation à 37 °C. Les résultats de ces tests sont regroupés dans la Figure IV-5. Il n'apparaît pas d'influence très claire de l'acidité ($\text{pH} = 5,0-5,5$) des extraits ZnPO/CN/Ag et CN sur la viabilité cellulaire par rapport aux tests réalisés à pH neutre. Par contre, une importante diminution de la viabilité cellulaire s'observe à pH acide 5,5 par rapport au test à pH neutre pour l'extrait ZnPO/CN/Ag. Ces résultats de cytotoxicité préliminaires devront être répétés notamment avec des extraits non neutralisés car les mesures n'ont été faites qu'une seule fois. Malgré cela, ces premiers résultats suggèrent

que le pH acide des extraits n'a pas un effet cytotoxique spécifique puisque même après avoir neutralisé le pH (afin d'assurer une bonne condition pour la croissance cellulaire) les extraits continuent dans tous les cas à être cytotoxiques par rapport aux contrôles négatifs.

La cytotoxicité observée semble donc être liée plutôt à la présence d'impuretés de la caséine lactique qui, une fois libérées, acidifieraient les extraits (Figure IV-4) et dont l'effet cytotoxique persisterait après la neutralisation du pH. Cependant, il est difficile de déterminer de quelles molécules il s'agit, principalement en raison des informations limitées données sur la procédure d'élaboration et la qualité de la caséine par le fournisseur. Il sera intéressant de faire des essais de cytotoxicité avec d'autres types de caséines afin de vérifier nos résultats ou d'isoler la caséine utilisée des impuretés, par exemple, en utilisant des méthodes chromatographiques puis d'évaluer à nouveau sa cytotoxicité.

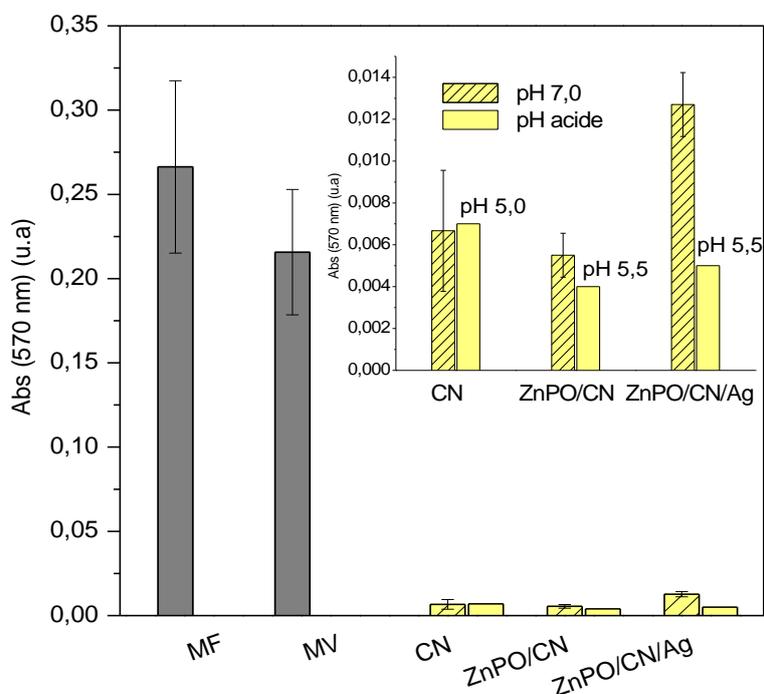


Figure VI-5. Influence du pH sur la cytotoxicité *in vitro* des extraits de caséine (réactif) et des zincophosphates contenant de la caséine par rapport au MF. Les résultats pour des valeurs de pH entre 5,0 et 5,5 n'ont pas d'écart-type car ils sont associés à un seul essai.

VI.3.2. Influence de la dénaturation de la caséine

Un autre facteur important à considérer sur la cytotoxicité observée avec les échantillons ZnPO/CN et ZnPO/Ag/CN est associé aux conditions hydrothermales à laquelle la caséine a

été soumise lors de la préparation des zincophosphates. En effet, la coagulation, l'hydrolyse et la déphosphorylation de la caséine ont été indirectement induites par les conditions de synthèse (6 jours à 100 °C) utilisées dans le but de récupérer le phosphore de la protéine, qui est nécessaire pour la synthèse de nos matériaux [17]. Il s'agit de processus/réactions chimiques reconnus pour avoir une influence sur la dénaturation de la caséine et d'autres protéines du lait [18-20].

Afin d'avoir une idée de la nature des fragments de caséine ou de ses dérivés possiblement libérés par nos matériaux dans le milieu de culture, nous avons analysé la composition des milieux d'extraction par électrophorèse sur gel. Une étude similaire a été réalisée avec la caséine (réactif). La Figure IV-6 regroupe les profils d'électrophorèse des milieux d'extractions obtenus pour différents temps d'incubation à 37 °C. Chacun d'eux est comparé au profil d'électrophorèse d'un extrait de caséine commerciale neutre (Sigma-Aldrich) qui n'a pas subi d'incubation à 37 °C (nommée CN commerciale). Ce dernier possède deux bandes de masses moléculaires à 24 et 29 kDa associées aux deux composants majeurs de la caséine, la α_{s1} -CN et la β -CN [21]. Les profils d'électrophorèse des extraits ZnPO/CN et ZnPO/Ag/CN montrent une large bande diffuse située à des masses moléculaires inférieures à 15 kDa qui peut être attribuée à plusieurs fragments de caséine dénaturée ou des peptides produits présentant une masse moléculaire très proche. L'identification de cette bande intense, tout au long des 5 jours d'incubation et même pour de courtes périodes de temps d'incubation de 1 h, met en évidence la présence en quantité importante de ces fragments de protéine dénaturée dans les extraits, qui pourraient être à l'origine de la cytotoxicité.

D'autre part, les profils d'électrophorèse obtenus avec les extraits de la caséine préparés à différents temps d'incubation révèlent la présence de deux bandes principales et intenses situées à des masses moléculaires visiblement similaires à celles de la référence CN commerciale (à confirmer par analyse de leur profil de migration d'électrophorèse avec le logiciel ImageJ[®] par exemple). Par contre, à partir de ~ 24 h d'incubation, des bandes étroites de faible intensité et de masses moléculaires inférieures à 24 kDa sont détectées. En outre, au bout des 5 jours d'incubation la bande à 29 kDa de la caséine a même quasiment disparu au profit de bandes de faibles poids moléculaires (inférieurs à 10 kDa). Les conditions de température et la durée d'incubation auraient donc été suffisantes pour déclencher l'hydrolyse et la dénaturation de la caséine, ce qui est révélé par des bandes à bas poids moléculaires qui pourraient correspondre à des morceaux de peptides possiblement toxiques pour les cellules.

L'analyse de la cytotoxicité *in vitro* des extraits de caséine après des périodes de temps d'incubation courtes et longues pourrait nous aider à mieux comprendre l'effet de la dénaturation de la caséine sur la cytotoxicité. Il est possible que pour de courtes périodes la caséine ne soit pas cytotoxique car d'après les résultats d'électrophorèse elle commence à se dénaturer seulement à partir d'environ 24 h. Dans le cas contraire, une apparente cytotoxicité pourrait être associée à la nature et à la qualité de la caséine.

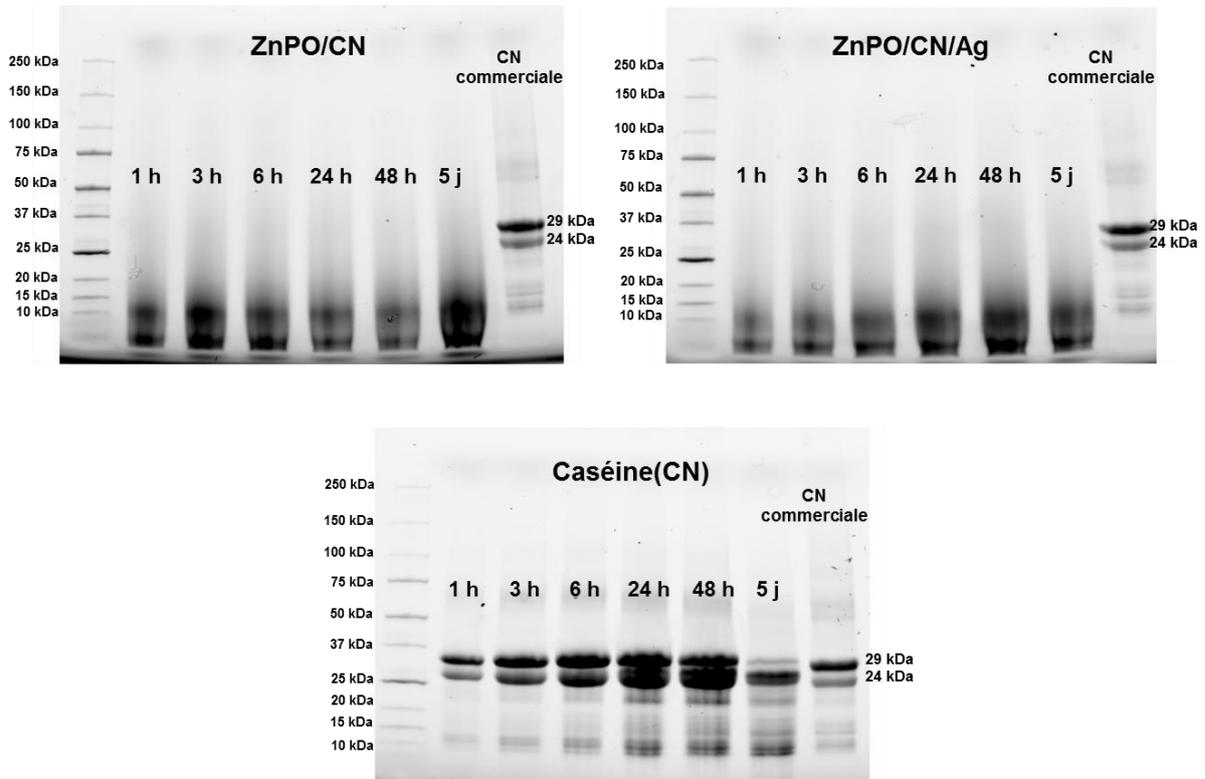


Figure IV-6. Electrophorèse des milieux d'extraction des échantillons ZnPO/CN, ZnPO/Ag/CN et de la caséine (CN) dans le milieu de culture cellulaire après incubation pendant différents intervalles de temps à 37 °C.

Un dernier test a consisté à évaluer l'influence de la dilution des extraits de caséine, ZnPO/CN et ZnPO/Ag/CN sur leur cytotoxicité. Les résultats obtenus (Figure IV-7) indiquent que la cytotoxicité élevée de ces extraits par rapport au contrôle MF peut être réduite par diminution de la quantité des éventuels composants toxiques libérés dans le milieu de culture. Le graphique montre que les extraits de caséine, ZnPO/CN et ZnPO/Ag/CN avec des concentrations égales ou inférieures à 10 % en volume présentent une viabilité cellulaire

au-delà de 75 % du contrôle négatif MF. Ces résultats assez intéressants méritent d'être répétés car il s'agit à nouveau de tests préliminaires non répétés.

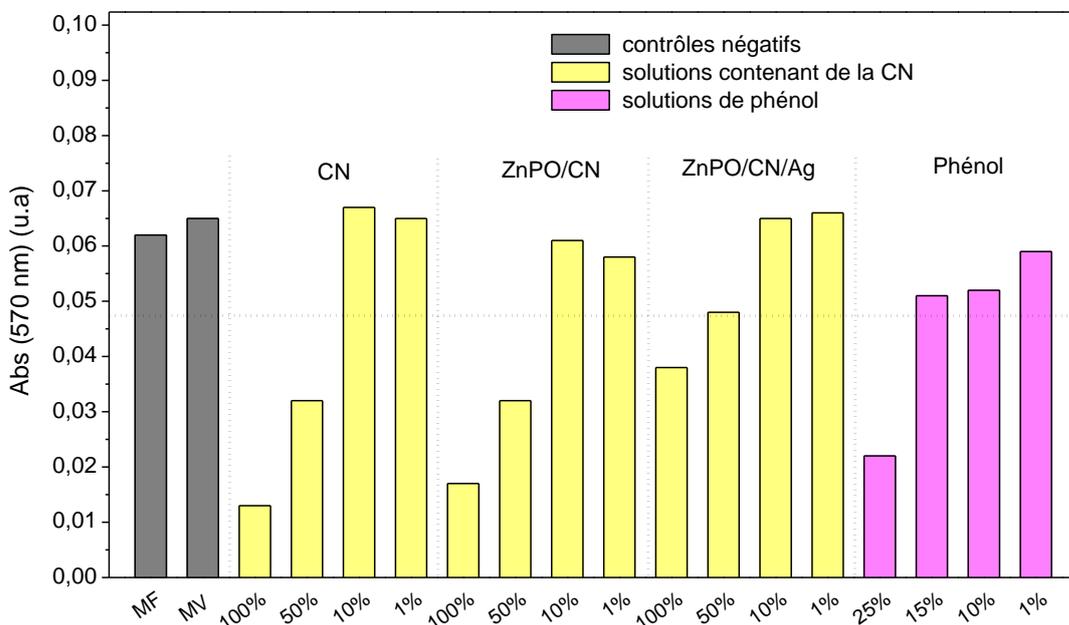


Figure IV-7. Influence de la dilution des extraits de CN et des zincophosphates contenant de la CN sur la toxicité des cellules. Les résultats ne présentent pas d'écart-type car ils sont associés à un seul essai préliminaire. Les concentrations sont exprimées en pourcentage volumique (v/v%).

VI.4. Conclusion

Les résultats préliminaires présentés dans cette étude révèlent que les zincophosphates ZnPOs-750 et ZnPOs/Ag-750 ne possèdent pas de propriétés cytotoxiques sur des cellules ostéoprogénitrices STRO1A+ par rapport aux contrôles. Il apparaît en particulier que la concentration d'ions argent libérés du matériau ZnPOs/Ag-750 n'a pas d'effet toxique sur les cellules, ce qui représente un résultat très important pour envisager l'application de ce zincophosphate comme biomatériaux antibactériens. Pour cela, il serait intéressant d'effectuer des études *in vitro* par contact direct avec les cellules.

Au contraire, les zincophosphates ZnPO/CN et ZnPO/Ag/CN et la caséine en poudre ont démontré avoir un effet toxique notable sur les cellules. Pour expliquer ce comportement différentes expériences ont été réalisées. Les principaux résultats indiquent que la cytotoxicité détectée avec les solides ZnPO/CN et ZnPO/Ag/CN est un effet de la caséine dénaturée qu'ils

contiennent et que la caséine en poudre tend à se dénaturer lors de l'étape d'incubation qu'implique l'essai de cytotoxicité. L'effet de possibles impuretés présentes dans la caséine en poudre est aussi à considérer.

S'il existe encore plusieurs études à réaliser sur l'évaluation biologique de nos matériaux, les résultats présentés ici constituent de premiers avancements importants dans l'objectif de développer des applications biomédicales pour les zincophosphates.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) W. Li, J. Zhou, Y. XU. *Biomed. Rep.* 3, 2015, 617–620.
- (2) K. A. McCall, C. Huang, C. A. Fierke. *J. Nutr.* 130, 2000, 1437S–1446S.
- (3) A. Peretz, T. Papadopoulos, D. Willems, A. Hotimsky, N. Michiels, V. Siderova, P. Bergmann, J. Neve. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 15, 2001, 175–178.
- (4) I. S. Kwun, Y. E. Cho, R. A. Lomeda, H. I. Shin, J. Y. Choi, Y. H. Kang, J. H. Beattie. *Bone (N. Y., NY, U. S.)*, 46, 2010, 732–741.
- (5) D. Chen, L. C. Waite, W. M. Pierce. *Biol. Trace Elem. Res.* 68, 1999, 225–234.
- (6) B. S. Moonga, D. W. Dempster. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1995, 453–457.
- (7) M. Calasans-Maia, G. V. O. Fernandes, A. M. Rossi, E. P. Dias, G. D. S. Almeida, F. F. Mitri, J. M. Granjeiro. *Key Eng. Mater.* 361–363, 2008, 1273–1276.
- (8) H. Kawamura, A. Ito, S. Miyakawa, P. Layrolle, K. Ojima, N. Ichinose, T. Tateishi. *J. Biomed. Mater. Res.* 50, 2000, 184–190.
- (9) Y. Sogo, T. Sakurai, K. Onuma, A. Ito. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 2002, 457–463.
- (10) P. Bosch, D. S. Musgrave, J. Y. Lee, L. Huard. *J. Orthop. Res.* 18, 2000, 933–944.
- (11) B. O. Oyajobi, A. Lomri, M. Hott, P. J. Marie. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1999, 351–361.
- (12) ISO 10993-5, International Standard, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3th Edn, International Organization for Standardization, Switzerland, 01 juin 2009, 34 p.
- (13) J. M. Edmondson, L. S. Armstrong, A. O. Martinez, *J. Tissue Cult. Methods*, 11, 1988, 15–17.
- (14) M. Yamaguchi, H. Oishi, Y. Suketa. *Biochem. Pharmacol.* 36, 1987, 4007–4012.
- (15) J. R. Popp, B. J. Love, A. S. Goldstein. *Biomed. Mater. Res A.* 81, 2007, 766–769.
- (16) J. Pien, M. Weissmann. La détermination du pH des caséines lactiques. *Le Lait*, INRA Editions, 1938, 18, 455–462. Site web : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00895322/document>
- (17) J. Hinostroza-Ramos, L. Ploux, K. Anselme, L. Balan, A. Simon-Masseron. *Cryst. Growth Des.* 16, 2016, 4897–4904.
- (18) V. Raikos. *Food Hydrocolloids.* 24, 2010, 259–265.
- (19) M. Akkerman, V. M. Rauh, M. Christensen, L. B. Johansen, M. Hammershoj, L. B. Larsen. *J. Dairy. Sci.* 99, 2016, 152–166.
- (20) M. A. J. S. Van Boekel. *Int. Dairy J.* 9, 1999, 237–241.
- (21) Y. D. Livney. *Curr. Opin. Colloid In.* 15, 2010, 79–83.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été essentiellement consacrés au développement de voies de synthèse hydrothermale simples, originales et respectueuses de l'environnement de métallophosphates poreux à partir de biomolécules phosphorées.

Nous avons pu synthétiser des zinco- et aluminophosphates biosourcés en utilisant uniquement la caséine, l'AMP ou l'ATP comme source de P (et éventuellement comme agent directeur de structure), un milieu aqueux basique pour la dissolution de la biomolécule et une solution de sel de Zn^{2+} ou Al^{3+} , en gardant dans la mesure du possible des conditions de synthèse similaires pour chaque biomolécule.

Les synthèses réalisées en présence de caséine ont montré que parmi les systèmes Zn/P(caséine)/eau/NaOH et Al/P(caséine)/eau/NaOH, les ions Zn^{2+} réagissent plus facilement avec les phosphates libérés de la protéine que les ions Al^{3+} . Les systèmes zincophosphates ont conduit à la cristallisation de l'hopéite $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (non poreuse) accompagnée d'une phase amorphe de caséine à pH acide (pH = 4,5) et 100 °C. Des zincophosphates macroporeux (phases α - $Zn_3(PO_4)_2$ et α - $Zn_2P_2O_7$) ont cristallisés au cours de l'élimination de la protéine à 750 °C, monopolisant 71,4 % de la masse de P initialement introduit dans le milieu de synthèse. Quant aux systèmes aluminophosphates préparés dans des conditions similaires de pH et de température, des matériaux $Al(PO_4)$ de structure tridymite + cristobalite présentant une macroporosité irrégulière ont uniquement cristallisé après élimination de la protéine des produits bruts de synthèse après calcination à 750 °C. Dans le cas des zincophosphates nous avons déterminé que la caséine joue les rôles de source de P ainsi que d'agent directeur de structure, alors que dans le cas des aluminophosphates elle joue essentiellement le rôle de source de P.

En présence de nucléotides, les synthèses dans le système zincophosphates ont conduit à la cristallisation des phases zincophosphates $NaZnPO_4$, $Na_2Zn_5(PO_4)_4$ avec des impuretés de ZnO (pH = 6–12, AMP) et de zincophosphates hydratés $Zn_3(PO_4)_2 \cdot x H_2O$ (x = 1, 2 et 4) (pH = 3,0, ATP) à 160 °C. Des phases cristallines α - $Zn_3(PO_4)_2$, $Na_2Zn_5(PO_4)_4$ et $NaZnPO_4$ ont été formées après calcination à 750 °C toujours en présence de ZnO. Les solides ne présentant que des phases zincophosphates $Zn_3(PO_4)_2 \cdot x H_2O$ (x = 1, 2 et 4) et α - $Zn_3(PO_4)_2$ respectivement avant et après calcination ne sont pas macroporeux. Concernant les systèmes aluminophosphates, il a été obtenu des solides sous formes de billes qui consistent en une phase $AlPO_4$ -H4 (pH = 2,0, ATP, 160 °C) et une phase $AlPO_4$ de structure cristobalite après calcination à 750 °C. Il a été mis en évidence que les nucléotides AMP et ATP jouent le rôle

de source de P dans les deux systèmes métallophosphates étudiés, et possiblement d'agent directeur de structure dans le cas des billes d' AlPO_4 comme déjà révélé dans des travaux de synthèse de sphères de phosphates de calcium biosourcés à partir d'ATP. Cependant leur mécanisme de formation n'a pas été encore éclairci.

Compte tenu des résultats intéressants obtenus sur la synthèse de zincophosphates macroporeux biosourcés à partir de caséine, nous avons développé une nouvelle voie de synthèse hydrothermale de zincophosphates macroporeux enrichis en nanoparticules d'Ag. Un matériau (nommé ZnPO/CN/Ag) composé d'une phase cristalline d'hopéite, de caséine (CN) et de nanoparticules d'Ag a été obtenu (pH = 4,0 et 100 °C). Des nanoparticules d'Ag ont été formées *in situ* grâce à la présence simultanée de soude et de caséine qui joue également le rôle d'agent stabilisateur. De nouveaux solides zincophosphates macroporeux enrichis en argent (nommé ZnPOs/Ag-750) se présentant sous la forme de nanoparticules et de phosphates doubles de zinc et d'argent ont pu être obtenus après élimination de la protéine à 750 °C.

Nous avons montré que les zincophosphates contenant ou non des nanoparticules d'argent ne sont pas favorables à la colonisation bactérienne à court-terme assimilable à l'adhésion bactérienne, par comparaison à un matériau de référence de wafer de silicium. Une étude de la prolifération bactérienne sur les surfaces a révélé différents effets antibactériens : ZnPOs/Ag-750 présente un effet biocide significatif, tandis que ZnPO/CN/Ag présente une tendance à inhiber la prolifération bactérienne par rapport à un matériau similaire sans Ag. La propriété antimicrobienne du matériau ZnPOs/Ag-750 sur *Escherichia coli* est en particulier intéressante pour des applications bactéricides, par exemple dans le traitement de l'eau ou de systèmes humides sensibles à la contamination microbienne.

De plus, les résultats préliminaires d'essais de cytotoxicité *in vitro* de ces matériaux sur cellules ostéoprogénitrices STRO-1A+ ont révélé que les matériaux calcinés contenant ou non de l'Ag, ZnPOs/Ag-750 et ZnPOs-750, ne sont pas toxiques et possèdent une bonne biocompatibilité vis-à-vis des cellules, ce qui est important pour leurs applications comme biomatériaux antibactériens. En revanche, les zincophosphates non calcinés (bruts de synthèse) présentent un effet cytotoxique. Par électrophorèse sur gel, nous avons mis en évidence que ces solides en contact avec le milieu biologique libèrent certains fragments de caséine possiblement dénaturée par la procédure hydrothermale de synthèse (100 °C), et qui semblent toxiques pour les cellules utilisées.

Finalement, grâce à l'ensemble de ces travaux pionniers sur la synthèse de zincophosphates biosourcés, ainsi que le développement d'une voie directe de synthèse de

zincophosphate contenant des nanoparticules d'Ag à partir de caséine, l'application de ces matériaux dans les domaines de l'environnement et du biomédical peut être envisagée tout particulièrement avec le matériau ZnPOs/Ag-750 qui s'est démarqué par ses propriétés antibactériennes et sa bonne biocompatibilité.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse ouvrent les perspectives d'études suivantes :

- D'un point de vue synthèse de métallophosphates biosourcés :

i) Des analyses complémentaires sur la synthèse d'aluminophosphates à partir de caséine telles que la RMN ^{31}P du solide et des analyses élémentaires des poudres seront nécessaires pour établir un bilan matière du P et proposer un mécanisme de synthèse de ces solides.

ii) En vue d'une étude plus approfondie sur l'utilisation de la caséine dans la préparation de zincophosphates macroporeux, il sera indispensable de comparer différentes qualités de caséines commerciales plus ou moins purifiées pour déterminer la plus adéquate et ainsi évaluer le coût du processus complet dans le cas de son utilisation industrielle.

iii) La synthèse de zinco- et aluminophosphates en plus grosses quantités à partir de nucléotides est nécessaire pour compléter certaines analyses de caractérisation non faites en raison de la faible quantité de produit obtenu. Il sera utile de suivre l'évolution des nucléotides au cours des synthèses et d'identifier les espèces organiques qui se forment.

- D'un point de vue applications environnementale et biomédicale des zincophosphates enrichis en nanoparticules d'Ag préparés à partir de caséine :

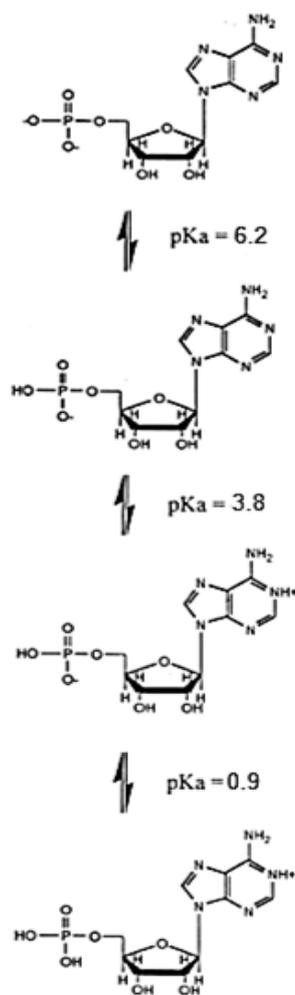
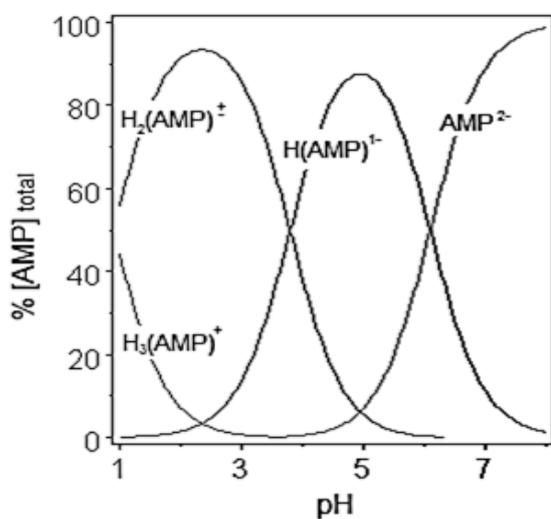
i) Les propriétés de zincophosphates plus concentrés en argent devront être étudiées afin d'établir les seuils des actions biocide et cytotoxique des ions Ag^+ libérés sur des bactéries et cellules eucaryotes.

ii) L'utilisation d'autres souches bactériennes telles que le *S. mutants* permettra d'évaluer l'application de ces matériaux comme ciments dentaires par exemple, compte tenu des propriétés non cytotoxiques des matériaux ZnPOs/Ag-750 et ZnPOs-750 sur les cellules.

iii) Il sera important de continuer l'évaluation biologique des matériaux ZnPOs/Ag-750 et ZnPOs-750 par des essais de cytotoxicité *in vitro* par contact direct sur des cellules pour avoir des informations sur la biocompatibilité de nos matériaux.

ANNEXES

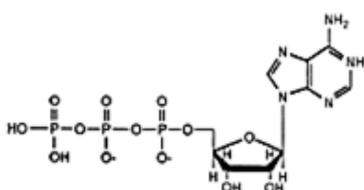
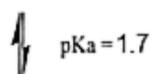
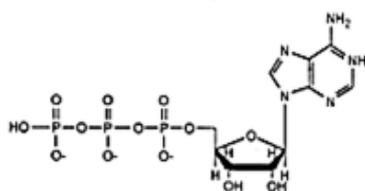
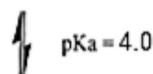
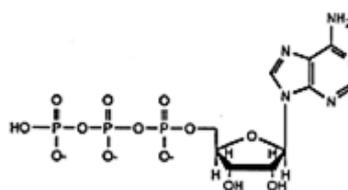
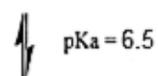
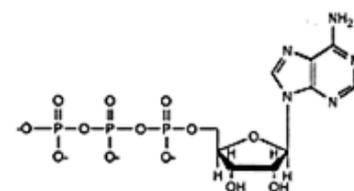
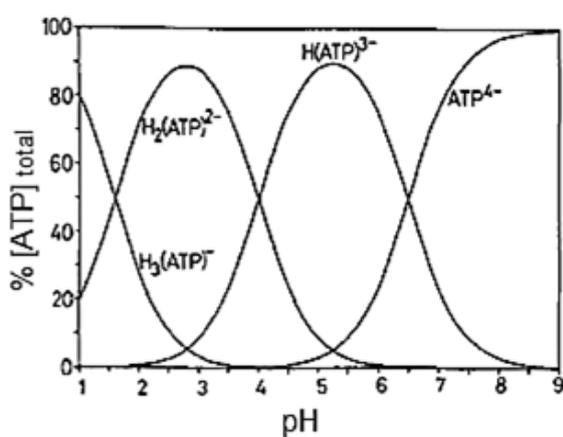
Annexe IV-1. Effet du pH sur la concentration des espèces présentes dans une solution diluée aqueuse d'AMP.^{1, 2}



¹ A. E. Martell, R. M. Smith, Critical Stability Constants, Plenum Press, New York, Vol. 2, 1974.

² R. Tribolet, H. Sigel. *Biophys. Chem.* 27, 1987, 119–130.

Annexe IV-2. Effet du pH sur la concentration des espèces présentes dans une solution aqueuse d'ATP.^{3,4}



³ F. Peral, E. Gallego, *Biophys. Chem.* 85, 2000, 79–92.

⁴ R. Tribolet, H. Sigel. *Eur. J. Biochem.* 170, 1988, 617–626.

Annexe IV-3. Diffractogramme de rayons X de la plaque de verre utilisée comme support d'analyse pour les échantillons préparés avec les nucléotides. Pic large centré vers 24° (2θ).

